

Charakterisierung der mitochondrialen Genexpression in  
CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen des Knochenmarks  
bei myelodysplastischen Syndromen (MDS)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Verena Schildgen  
Köln

März 2007

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie  
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Gattermann

Korreferent: Prof. Dr. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2007

# Inhaltsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | VI |
| <b>I. Einleitung</b>   | 1  |
| 1. Myelodysplastische Syndrome (MDS)   | 1  |
| 2. Mitochondriale Beteiligung an der MDS-Pathogenese?                              | 3  |
| 3. Die mtDNA und ihre Beteiligung an Alterungsprozessen                            | 5  |
| 4. Die mitochondriale Atmungskette und die Untereinheiten ND3, SDHB, CytB und COXI | 9  |
| 5. Zielsetzung   | 12 |
| <b>II. Material und Methoden</b>   | 14 |
| <b>1. Material</b>   | 14 |
| 1.1. Stammlösungen und Puffer  | 14 |
| 1.2. Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese                                 | 15 |
| 1.3. Medien und Medienzusätze für die Bakterienkultur                              | 16 |
| 1.4. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur                                   | 17 |
| 1.5. Zelllinien  | 18 |
| 1.6. Primäre Zellen  | 18 |

|  |           |
|--|-----------|
| 1.7. Antikörper und Farbstoffe   | 19        |
| 1.7.1. Primärantikörper  | 19        |
| 1.7.2. Konjugierte Sekundärantikörper  | 19        |
| 1.7.3. Farbstoffe  | 19        |
| 1.8. MACS-Technologie  | 20        |
| 1.8.1. Magnetische "Beads"   | 20        |
| 1.8.2. Zubehör zur Magnetischen Separierung  | 20        |
| 1.9. Oligonukleotide   | 21        |
| 1.9.1. Oligonukleotide für Klonierungen  | 21        |
| 1.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen   | 22        |
| 1.9.3. Oligonukleotide für quantitative PCR  | 22        |
| <b>2. Methoden</b>   | <b>23</b> |
| 2.1. Präparation von Nukleinsäuren   | 23        |
| 2.1.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA durch Bindung an eine<br>Anionenaustauschersäule | 23        |
| 2.1.2. Schnellpräparation von Plasmid-DNA  | 24        |
| 2.1.3. RNA Präparation   | 24        |
| 2.1.3.1. <i>RNeasy® Mini Kit</i>   | 24        |
| 2.1.3.2. <i>RNeasy® Micro Kit</i>  | 25        |
| 2.1.4. Reinigung von PCR-Produkten für die Klonierung                                    | 26        |
| 2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren                           | 27        |

|  |    |
|--|----|
| 2.3. RNA-Qualitätsbestimmung   | 27 |
| 2.4. Gelelektrophorese   | 28 |
| 2.5. Enzymatische Reaktionen   | 29 |
| 2.5.1. Synthese von cDNA   | 29 |
| 2.5.2. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)                                 | 29 |
| 2.5.2.1. PCR für Klonierung der Standardplasmide                         | 30 |
| 2.5.2.2. PCR zur Identifikation positiver Klone                          | 30 |
| 2.5.2.3. Quantitative LightCycler PCR                                    | 31 |
| 2.5.3. Klonierung der Standardplasmide                                   | 33 |
| 2.5.4. Plasmid-Sequenzierung   | 34 |
| 2.6. Zellkultur  | 35 |
| 2.6.1. Trypsinisierung und Resuspendierung adhärenter Zellen             | 35 |
| 2.6.2. Separation mononukleärer Zellen mittels Dichtezentrifugation      | 35 |
| 2.6.3. Präparation von CD34 <sup>+</sup> -Zellen                         | 36 |
| 2.6.4. Zellzahlbestimmung  | 37 |
| 2.6.4.1. Automatisierte Zellzahlbestimmung                               | 37 |
| 2.6.4.2. Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer | 38 |
| 2.6.5. Präparation von Mitochondrien                                     | 38 |
| 2.6.5.1. Präparation von Mitochondrien aus Zellkultur                    | 38 |
| 2.6.5.2. Immunpräzipitation von Mitochondrien aus Zellkultur             | 39 |
| 2.6.6. Zentrifugation mit Cytospin                                       | 40 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.7. Färbungen   | 41        |
| 2.7.1. Enzymatische Färbung von CD34+-Zellen   | 41        |
| 2.7.1.1. Reaktion der Succinatdehydrogenase  | 41        |
| 2.7.1.2. Reaktion der Cytochrom-c-Oxidase  | 42        |
| 2.7.2. Immunchemische Färbung von Mitochondrien  | 43        |
| 2.7.3. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels CMXRos   | 43        |
| 2.7.3.1. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in Zellen  | 44        |
| 2.7.3.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in isolierten Mitochondrien                          | 44        |
| <b>III. Ergebnisse</b>   | <b>45</b> |
| 1. Funktionalität der Atmungskettenkomplexe in CD34+-Zellen  | 45        |
| 1.1. Aktivität der Succinatdehydrogenase (Komplex II) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) in CD34+-Zellen | 45        |
| 1.2. Fallbeobachtung   | 48        |
| 2. Genexpressionsanalyse der Atmungskettenkomplexe   | 51        |
| 2.1. Generierung der Standardplasmide  | 52        |
| 2.2. Etablierung der Realtime PCR  | 54        |
| 2.3. Vergleich der Genexpression der Atmungskettenkomplexuntereinheiten bei Gesunden und MDS-Patienten         | 57        |
| 2.4. Vergleich der Genexpression der Atmungskettenkomplexuntereinheiten nach Geschlecht                        | 62        |
| 2.5. Vergleich der Genexpression in verschiedenen Altersgruppen  | 65        |
| 3. Etablierung der Mitochondrienisolierung für Proteomanalysen   | 72        |

|                          |    |
|--------------------------|----|
| IV. Diskussion           | 78 |
| V.a) Zusammenfassung     | 96 |
| V.b) Summary             | 97 |
| VI. Literaturverzeichnis | 98 |
| Anhang                   |    |

Abkürzungsverzeichnis

In der deutschen Sprache gebräuchliche Abkürzungen, physikalische Einheiten und von der IUPAC festgelegte Abkürzungen werden nicht gesondert aufgeführt.

|                   |                                    |
|-------------------|------------------------------------|
| AML               | Akute myeloische Leukämie          |
| ADP               | Adenosindiphosphat                 |
| AK                | Antikörper                         |
| AKK               | Atmungskettenkomplex               |
| Amp               | Ampicillin                         |
| <i>aqua dest.</i> | destilliertes Wasser               |
| AS                | Aminosäure                         |
| ATP               | Adenosintriphosphat                |
| bp                | Basenpaar                          |
| BSA               | bovines Serumalbumin               |
| CMXRos            | Derivat von X-Rosamin              |
| Cy3               | Indocarbocyanin 3                  |
| CytB              | Cytochrom b                        |
| COX               | Cytochrom-c-Oxidase                |
| 2-DE              | zweidimensionale Gelelektrophorese |
| DAB               | 3,3-Diaminobenzidin                |
| <i>dest.</i>      | destilliert                        |

|       |   |
|-------|---|
| 1-DLC | eindimensionale „reversed phase high performance liquid chromatography“ |
| 2-DLC | zweidimensionale Flüssigchromatographie                                 |
| DMEM  | Dulbecco's modified Eagle's Medium                                      |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid  |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure  |
| EDTA  | Ethylendiamintetraessigsäure  |
| EtBr  | Ethidiumbromid  |
| EtOH  | Ethanol   |
| YFP   | gelb fluoreszierendes Protein   |
| FCS   | fetales Kälberserum   |
| IU    | internationale Einheit  |
| MACS  | Magnet-gekoppelte Zellsortierung  |
| MDS   | Myelodysplastisches Syndrom   |
| mt    | mitochondrial   |
| MNC   | Mononukleäre Zellen   |
| NBT   | Nitroblautetrazoliumsalz  |
| PBS   | Phosphat-gepufferte Saline  |
| PCR   | Polymerase-Kettenreaktion   |
| PFA   | Paraformaldehyd   |
| RA    | refraktäre Anämie   |
| RARS  | refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten                                 |

|        |  |
|--------|--|
| RAEB   | refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß                                   |
| RAEB-t | Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß<br>in Transformation              |
| RCMD   | refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dyslasie                          |
| RSCMD  | refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dyslasie und<br>Ringsideroblasten |
| RNA    | Ribonukleinsäure   |
| RQ     | relative Quantifizierung   |
| RT     | reverse Transkription  |
| SDH    | Succinatdehydrogenase  |
| TBE    | TrisHCl/Borat/EDTA-Puffer  |
| Tris   | Tris-(hydroxymethyl)-Ammonomethan  |
| UE     | Untereinheit   |
| ÜN     | über Nacht   |

## I. Einleitung

### 1. Myelodysplastische Syndrome (MDS)

Bei den myelodysplastischen (myelon = Knochenmark, dysplastisch = unförmig) Syndromen handelt es sich um seltene klonale Stammzellerkrankungen des Knochenmarks, die vorwiegend bei Menschen ab dem 60. Lebensjahr auftreten (Aul *et al.*, 1995; Kuendgen *et al.*, 2006).

Der klonale Ursprung von MDS aus pluripotenten Progenitorzellen konnte anhand von RFLP- bzw. RFLP-Methylierungsanalysen des X-Chromosoms nachgewiesen werden (Tefferi *et al.*, 1990; Tsukamoto *et al.*, 1993). Zu zytogenetisch erkennbaren Chromosomenaberrationen innerhalb der Zellpopulation kommt es vermutlich erst während einer mehrstufigen Pathogenese (Jacobs *et al.*, 1986; Jacobs, 1991; Mufti *et al.*, 1992). Der pathologische Stammzellklon weist neben einem abnormen Wachstumsvorteil auch Differenzierungs- und Maturationsdefekte auf, die die Produktion funktionstüchtiger Blutzellen einschränken. Die reifungsgestörten Progenitorzellen sind durch dysplastische Morphologie einer oder mehrerer myeloischer Differenzierungslinien sowie eine gesteigerte Apoptoserate gekennzeichnet (Greenberg, 1998; Tehranchi *et al.*, 2005), welche sich vor allem durch Anämie, aber auch durch Leukopenie und Thrombozytopenie bemerkbar macht. Daher leiden die Patienten neben Schwäche und Abgeschlagenheit auch unter Infektanfälligkeit und

hämorrhagischer Diathese. Des Weiteren haben MDS-Patienten ein erhöhtes Risiko, eine akute myeloische Leukämie (AML) zu entwickeln (Layton & Mufti, 1986).

| <b>WHO-Klassifizierung der myelodysplastischen Syndrome</b> |                                 |                                 |                            |
|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------|
| <b>Subtyp</b>   | <b>Medullärer Blastenanteil</b> | <b>peripherer Blastenanteil</b> | <b>andere Kriterien</b>    |
| <b>RA</b><br>(unilineäre Dysplasien)                        | < 5%                            | < 1%                            |                            |
| <b>RARS</b><br>(unilineäre Dysplasien)                      | < 5%                            | < 1%                            | > 15%<br>Ringsideroblasten |
| <b>RCMD</b><br>(RA mit multilineären Dysplasien)            | < 5%                            | < 1%                            |                            |
| <b>RSCMD</b><br>(RARS mit multilineären Dysplasien)         | < 5%                            | < 1%                            | > 15%<br>Ringsideroblasten |
| <b>RAEB I</b>   | 5 - 10%                         | < 5%                            |                            |
| <b>RAEB II</b>  | 11 – 19%                        | < 20%                           |                            |
| <b>5q- Anomalien</b>  | < 20%                           | < 20%                           |                            |

**Tabelle 1.1.:** Einteilung der myelodysplastischen Syndrome in Untergruppen anhand der WHO-Klassifikation (Jaffe *et al.*, 2001): RA (refraktäre Anämie), RARS (refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten), RCMD (refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie), RSCMD (refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie und Ringsideroblasten), RAEB (refraktäre Anämie mit Blastenüberschuß)

Die myelodysplastischen Syndrome werden in verschiedene Untergruppen gegliedert, die anhand morphologischer Merkmale der Zellen des Knochenmarks und des peripheren Bluts definiert sind. Diese MDS-Untergruppen unterscheiden

sich hinsichtlich ihres malignen Potentials voneinander (Mufti & Galton, 1986, Germing *et al.*, 2006). Die Einteilung erfolgt sowohl nach der Klassifikationen der French-American-British (FAB) Cooperative Group (Bennett *et al.*, 1982) als auch nach den Vorschlägen der WHO (Jaffe *et al.*, 2001; Bennett & Komrokji, 2005; **Tabelle 1.1.**). Der vorliegenden Arbeit liegt die Unterteilung gemäß der WHO-Klassifikation zu Grunde.

Die initialen molekularen Veränderungen, die zum Entstehen der MDS-Erkrankung führen, konnten bisher nicht identifiziert werden, allerdings können bei allen MDS-Untergruppen Ringsideroblasten auftreten (siehe I.2.), die jedoch vorwiegend bei RARS-Patienten gefunden werden (**Tabelle 1.1**). Bei diesen Zellen handelt es sich um erythropoietische Progenitorzellen, die Eisen in ihren Mitochondrien akkumulieren (Goodman & Hall, 1967).

## 2. Mitochondriale Beteiligung an der MDS-Pathogenese?

Die Existenz von Ringsideroblasten gibt einen Hinweis auf die mögliche Beteiligung der Mitochondrien an der MDS-Pathogenese. Wie oben erwähnt, handelt es sich bei diesen Zellen um erythropoietische Progenitorzellen, die nach Preußisch-Blau-Färbung lichtmikroskopisch nachweisbare perinukleäre Eisengranula ( $\text{Fe}^{3+}$ ) enthalten. Diese wurden erstmals von Dacie & Doniach (1947) lichtmikroskopisch im Zytoplasma und von Caroli *et al.* (1957) elektronenmikroskopisch in der Mitochondrienmatrix nachgewiesen.

Da das in den Ringsideroblasten dreiwertig vorliegende Eisen (Grasso *et al.*, 1980) nicht für enzymatische Reaktionen, wie z.B. den Einbau in Häm durch die Ferrochelatase (Porra & Jones, 1963), verwendet werden kann, akkumuliert es in den Mitochondrien.

Bei einem zugrunde liegenden nukleär kodierten Defekt wäre zu erwarten, daß alle Zellen gleich stark betroffen sind; die erythropoietischen Progenitorzellen sind aber unterschiedlich stark von der Eisenakkumulation betroffen (Mizoguchi *et al.*, 1983; Amenomori *et al.*, 1987), was für eine Beteiligung mitochondrial kodierter Proteine an der Pathogenese spricht, da Heteroplasmie und mitotische Segregation zu unterschiedlichen Verhältnissen mutierter mtDNA zu Wildtyp (wt)-mtDNA in den einzelnen Zellen führen (Wallace, 1994). Die sideroblastischen Veränderungen in erythropoietischen Vorläuferzellen wurden zytomorphologisch schon früh in klonalen Zellkulturen untersucht (Hutcheson *et al.*, 1979). Die Mechanismen, die zur klonalen Expansion von mutierten mtDNA-Molekülen führen, sind hingegen noch unklar und werden zum einen auf zufälligen „genetic drift“, als auch auf gerichtete Mechanismen zurückgeführt (Elson, 2001; Chinnery *et al.*, 2002; Kraytsberg *et al.*, 2003).

Einen weiteren Hinweis auf eine mögliche mitochondriale Beteiligung an der MDS-Pathogenese liefert das Pearson's Syndrom. Diese Krankheit wird durch Deletionen der mitochondrialen DNA hervorgerufen und äußert sich neben Symptomen wie Pankreasinsuffizienz und gestörtem Energiestoffwechsel in dysplastischen Veränderungen des Knochenmarks einschließlich

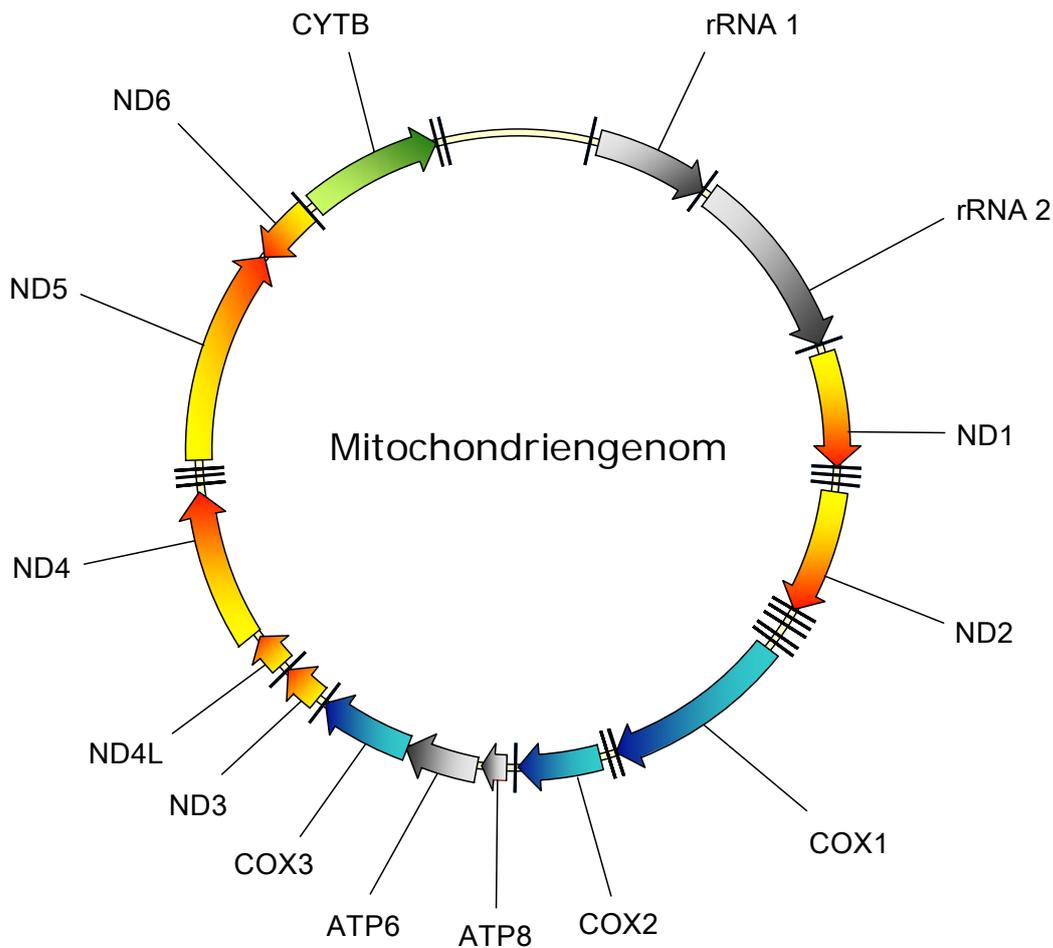
sideroblastischer Anämie, häufig begleitet von Thrombozytopenie und Neutropenie. Bei längerer Chloramphenicolbehandlung werden ebenfalls Knochenmarkdysplasien mit gelegentlich auftretenden Ringsideroblasten beobachtet. Dieses Antibiotikum inhibiert die mitochondriale Proteinsynthese und hat nach langfristiger Behandlung eine ineffektive Hämatopoiese zur Folge (Gattermann, 1999). Eine defekte mitochondriale Atmungskette beeinträchtigt aber auch die Pyrimidin-Nukleotid-Synthese (Gattermann *et al.*, 2004). Dies könnte die megaloblastären Veränderungen im MDS-Knochenmark erklären, die nicht auf einen Folsäure- oder Vitamin B12-Mangel zurückzuführen sind. Darüber hinaus könnte bei mitochondrialer Dysfunktion eine verminderte ATP-Synthese zu genetischer Instabilität beitragen, da sowohl DNA-Reparaturenzyme als auch der bei der Mitose benötigte Spindelapparat ATP-abhängig sind, und die zytogenetischen Veränderungen bei MDS interessanterweise in erster Linie durch Chromosomenfehlverteilungen (z.B. Monosomie 7 oder Trisomie 8) oder ausgedehnte Verluste von genetischem Material (z.B. 5q- oder 7q-) gekennzeichnet sind.

### **3. Die mtDNA und ihre Beteiligung an Alterungsprozessen**

Da es sich bei MDS um ein vorwiegend altersassoziiertes Krankheitsbild handelt und die Ringsideroblasten erste Hinweise auf eine mitochondriale Beteiligung an der Pathogenese geben, muß zusätzlich berücksichtigt werden, dass es bereits

während des normalen Alterungsprozesses zu einer Schädigung der Mitochondrien kommt, die sich u.a. in einer verminderten Enzymaktivität der Atmungskettenkomplexe und einer Zunahme von Deletionen des mitochondrialen Genoms zeigt (Linnane *et al.*, 1989; Wallace, 1999). So finden sich mit zunehmendem Alter auch in hämatopoietischen Stammzellen im Blut und Knochenmark gesunder Probanden vermehrt Mutationen (Gattermann *et al.*, 1995). Die im Vergleich zur nukleären DNA stark erhöhte Mutationsrate der mtDNA (Wallace, 1987) lässt sich sowohl auf das Fehlen von schützenden Histonen und Reparaturenzymen, als auch auf Reaktionen mit den ständig an der inneren Mitochondrienmembran gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zurückführen (Shigenaga, 1994; Bohr *et al.*, 2002a; Bohr, 2002b). Diese reaktiven Sauerstoffspezies führen nach einer Theorie von Harman (1956 und 2006) zu Mutationen der mitochondrialen DNA und damit zu einer Schädigung der mitochondrialen Atmungskette. Dies führt wiederum zu einer verstärkten ROS-Produktion und zu einem „Teufelskreis“, der zum Alterungsprozeß beiträgt. Um jedoch Einfluß auf die Zellphysiologie zu nehmen, muß zunächst ein Schwellenwert an mutierten mtDNA-Molekülen überschritten werden, der durch die Vermehrung mutierter mitochondrialer DNA erreicht werden kann. Die intrazelluläre klonale Vermehrung mutierter mtDNA wurde zunächst in Muskeln durch den Nachweis von Deletionen und später auch anhand von Punktmutationen in Kardiomyozyten gezeigt (Coller *et al.*, 2002). Derartige Veränderungen akkumulieren mit steigendem Lebensalter aber auch im nukleären

Genom; da die Mehrzahl der Atmungskettenuntereinheiten kernkodiert ist (Abb.1.2.), muß folglich auch eine Beeinflussung durch nukleäre Faktoren berücksichtigt werden (Hayashi *et al.*, 1994).



**Abb. 1.1.:** Organisation des mitochondrialen Genoms. Der nicht-kodierende D-loop (displacement loop) befindet sich zwischen CytB und rRNA1. Die mtDNA kodiert neben zwei rRNAs und 22 tRNAs (|) für 13 Proteine der Komplexe I, III, IV und V der mitochondrialen Atmungskette. Die zu jeweils einem Enzymkomplex gehörenden Untereinheiten sind farblich einheitlich gestaltet. Im Folgenden wird diese Farbcodierung (**Abb. 1.2. und Abb. 3.3.**) beibehalten.

Die Zellen eines Menschen enthalten je nach Zelltyp mehrere hundert Mitochondrien, die wiederum mehrere zirkuläre doppelsträngige Mitochondriengenome enthalten (**Abb. 1.1**). Die ca. 16,5 kb große mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert für zwei rRNAs, 22 tRNAs und 13 Proteine (Anderson *et al.*, 1981). Alle mitochondrial kodierten Proteine sind Untereinheiten der Enzymkomplexe I, III, IV und V der mitochondrialen Atmungskette. Bei den beiden Doppelsträngen wird zwischen dem Guanin-reichen schweren Strang (H strand) und dem Cytosin-reichen leichten Strang (L strand) unterschieden. Der leichte Strang kodiert für acht tRNAs und ein Proteingen (ND6), während die übrigen Gene auf dem schweren Strang kodiert sind. Der D-loop (displacement loop) ist eine nicht-kodierende Region, die die Kontrollsequenzen für die Transkription und Replikation enthält (**Abb. 1.1**). Die Mitochondrien verwenden einen veränderten genetischen Code (Barrell *et al.*, 1979; Shoffner *et al.*, 1990) und benötigen nur 22 statt 32 tRNAs für die Translation (Attardi, 1985).

Ein weiterer Unterschied zum nukleären Genom besteht in der vom Zellzyklus unabhängigen Replikation (Bogenhagen & Clayton, 1977); darüber hinaus enthält die mtDNA keine Introns. Daher entstehen polyzistronische Primärtranskripte, aus denen durch Prozessierung die eigentlichen mRNAs entstehen und außerdem die tRNAs und rRNAs freigesetzt werden (Clayton, 1992, Tzagoloff & Myers, 1986).

## 4. Die mitochondriale Atmungskette und die Untereinheiten ND3, SDHB, CytB und COXI

Mitochondrien sind Membran-umschlossene Organellen in eukaryotischen Zellen mit einer Vielzahl an metabolischen Funktionen. Zu diesen gehören neben intrazellulärer Kalziumhomeostase, Regulation von Apoptose und Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern die zelluläre Atmung und oxidative Phosphorylierung zur Energiegewinnung. Eine typische Säugerzelle enthält ca. 1000 Mitochondrien – abhängig von Zelltyp und Zellgröße - mit von Organismus und Gewebe abhängiger heterogener Morphologie ([www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EM MitoE.html](http://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/EM%20MitoE.html)).

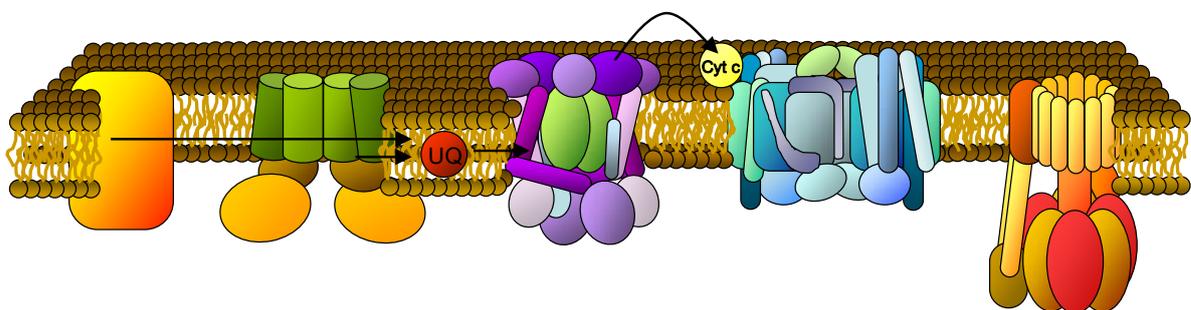
Mitochondrien besitzen eine Doppelmembran, deren äußere Membran durchlässig für kleine Moleküle und Ionen ist. In der inneren Mitochondrienmembran befinden sich die Enzymkomplexe der mitochondrialen Atmungskette (**Abb. 1.2.**). Komplex I (NADH-Coenzym-Q-Reduktase) liefert, durch Oxidation von NADH und Reduktion von Coenzym Q, Elektronen für die Elektronentransportkette. Die Elektronen werden an Komplex III (Coenzym-Q-Cytochrome-c-Reduktase) durch Oxidation von CoQ auf Cytochrom c übertragen. Bei Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase) handelt es sich um den terminalen Enzymkomplex der Elektronentransportkette. Er besteht aus drei mitochondrial kodierten Untereinheiten (COXI, COXII, COXIII), die zum katalytischen Zentrum des Enzymkomplexes gehören, und zehn kernkodierten Untereinheiten (**Abb. 1.2.**). Der Enzymkomplex besitzt vier

Redoxzentren (zwei Häm-Moleküle: a und a<sub>3</sub>; zwei Kupferzentren: CuA und CuB), von denen die beiden Häm-Moleküle und CuB in COXI gebunden sind. Die Struktur des in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten Enzymkomplexes wurde 1996 von der Arbeitsgruppe um Tsukihara aufgeklärt (Tsukihara *et al.*, 1996). Die Cytochrom-c-Oxidase überträgt Elektronen vom reduzierten Cytochrom c auf Sauerstoff, wobei die freigesetzte Energie für den Transport von Protonen über die innere Mitochondrienmembran verwendet wird (Capaldi *et al.*, 1990). Die Translokation von Protonen aus der Mitochondrienmatrix (niedrige H<sup>+</sup>-Konzentration, negatives elektrisches Potential) in den Intermembranraum (hohe H<sup>+</sup>-Konzentration, positives elektrisches Potential) erfolgt auch durch die Komplexe I und III. Der entstehende elektrochemische Gradient ermöglicht durch die in ihm enthaltene freie Enthalpie die endergonische ATP-Synthese, die durch die ATP-Synthase (Komplex V) katalysiert wird.

Die mitochondriale Matrix enthält u.a. die Enzyme des Zitratzyklus. Zu diesen gehört auch die Succinat-Coenzym-Q-Reduktase, die gleichzeitig auch Bestandteil der Elektronentransportkette (Komplex II der mitochondrialen Atmungskette) der Mitochondrien ist und Elektronen für die oxidative Phosphorylierung liefert, aber nicht direkt zur Aufrechterhaltung des Protonengradienten beiträgt. Dieser Enzymkomplex besteht aus vier Untereinheiten und ist als einziger Komplex der Atmungskette ausschließlich kernkodiert (Sun *et al.*, 2005; **Abb.1.2.**).

Bei der Untereinheit B der Succinatdehydrogenase (SDHB) handelt es sich, wie bei ND3 (UE aus Komplex I) um ein Protein aus der Gruppe der Eisen-

Schwefelproteine (FeS-Proteine) (Au *et al.*, 1995; Ragan *et al.*, 1982; Ohnishi *et al.*, 1985; Chomyn *et al.*, 1985). Diese Proteine werden in der Regel posttranskriptionell durch Bindung eines IRP (Iron-Regulatory-Protein) an ein oder mehrere IRE (Iron-Response-Elements) der mRNA reguliert. Durch die Bindung eines IRP kommt es zur Inhibierung der Translation und durch Eisenmangel in der Zelle zu einer verstärkten Bindung der IRP an die mRNA. Dieses Phänomen wurde in *Drosophila* untersucht, und es konnte gezeigt werden, dass die mRNA des Eisen-Schwefel-Proteins der Succinatdehydrogenase (SDH)



| Komplex I | Komplex II | Komplex III | Komplex IV | Komplex V |
|-----------|------------|-------------|------------|-----------|
| 39        | 4          | 10          | 10         | ~14       |
| 7         | 0          | 1           | 3          | 2         |

**Abb.1.2.:** Zusammensetzung der mitochondrialen Atmungskette. Die Atmungskette besteht aus fünf Komplexen: NADH-Coenzym-Q-Reduktase (Komplex I), Succinat-Coenzym-Q-Reduktase (Komplex II), Coenzym-Q-Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III), Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV), sowie ATP-Synthase (Komplex V). Der Enzymkomplex II ist ausschließlich **kernkodiert**, während die anderen Enzymkomplexe sowohl **mitochondrial**, als auch kernkodierte Untereinheiten aufweisen (modifiziert nach: [www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190](http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00190))

ein IRE in der untranslatierten 5'-Region besitzt und die zelluläre Eisenkonzentration Einfluß auf die Translationsregulation nimmt (Gray *et al.*, 1996; Melefors, 1996). Das mitochondrial kodierte Protein CytB enthält zwei Häm-Moleküle, die, wie auch die FeS-Proteine, Eisen im reaktiven Zentrum tragen (Lederer, 1994). Diese Untereinheit ist die einzige mitochondrial kodierte Untereinheit der Coenzym-Q-Cytochrome-c-Reduktase.

## 5. Zielsetzung

Verschiedene Hinweise führten zu der Hypothese, dass es möglicherweise eine Beteiligung der Mitochondrien an der MDS-Pathogenese gibt (siehe I.2.). Untersuchungen des mitochondrialen Genoms auf Mutationen bei MDS-Patienten verschiedener Untergruppen ergaben heteroplasmische mtDNA-Mutationen bei über 50% der Patienten, lieferten jedoch bislang keinen Hinweis auf einen spezifischen „hot spot“ (Wulfert *et al.*, zur Publikation eingereicht). Da aber unterschiedlich lokalisierte mtDNA-Mutationen sehr ähnliche Phänotypen auf Transkriptionsebene (z.B. Stabilität und Menge der Transkripte) oder auf Proteinebene (Stabilität und Aktivität der Atmungskettenkomplexe) hervorrufen können, sollten im Rahmen dieser Arbeit durch Analyse des mitochondrialen Proteoms und der mitochondrialen Genexpression die molekularen Grundlagen der MDS-Pathogenese näher charakterisiert werden.

Für die Analysen wurden aus Knochenmarkaspiraten gewonnene stammzellnahe Progenitorzellen verwendet, da wegen der Fähigkeit dieser Zellen zur identischen Selbstreplikation genetische Läsionen hier persistieren können, während sie in differenzierten Zellen des Bluts wegen deren begrenzter Lebensdauer sehr bald aus dem Organismus eliminiert werden.

Bei MDS mit Ringsideroblasten kommt es in den Mitochondrien der erythropoietischen Vorläuferzellen zu einer Akkumulation von  $\text{Fe}^{3+}$ , das nicht für die Hämsynthese genutzt werden kann. Deshalb sollte bei MDS-Patienten und zum Vergleich bei gesunden Spendern die mitochondriale Genexpression derjenigen Proteine der Elektronentransportkette untersucht werden, die FeS-Zentren und Hämgruppen aufweisen. Dabei sollten möglicherweise vorliegende Defekte und stöchiometrische Veränderungen registriert werden. Bei den ausgewählten Untereinheiten (UE) handelt es sich um ND3 (Komplex I), SDHB (Komplex II), CytB (Komplex III) und COX I (Komplex IV) (s.o.). Weiterhin sollte die Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase in Vergleich mit der ausschließlich kernkodierten Succinatdehydrogenase (SDH) bestimmt werden. Diese Analysen sollten Aufschluß über potentielle Zielmoleküle für Proteomanalysen und mögliche diagnostische Marker geben.

Da es sich bei MDS um ein altersassoziiertes Krankheitsbild handelt, sollte zusätzlich untersucht werden, ob neben vermuteten altersbedingten Veränderungen ein MDS-induzierter Effekt vorliegt, der zu einer schnelleren mitochondrialen Alterung der Zellen führt.

## **II. Material und Methoden**

Die verwendeten Computerprogramme waren:

VectorNTI<sup>®</sup> (Invitrogen), Meta View<sup>®</sup> (Visitron Systems), IC Capture 2.0<sup>®</sup> (The Imaging Source Europe GmbH)

### **1. Material**

#### **1.1. Stammlösungen und Puffer**

##### **PBS**

(Carl Roth, Karlsruhe)

8,0 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4

##### **PBS Dulbecco (1x)**

(Biochrom AG, Berlin)

Formulierung ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>

##### **COX-Färbelösung**

750 mg Sucrose, 20 mg Cytochrom c; 10 mg DAB, 1,7 ml 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 7,3 ml

50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3 µl Katalase (22 mg/ml); H<sub>2</sub>O *add.* 10 ml; pH: 7,4

### **SDH-Färbelösung**

118 mg Succinylsäure; 20 mg NBT; 1 ml 250 mM Tris; 250 µl 200 mM MgCl<sub>2</sub>; H<sub>2</sub>O  
*add.* 20 ml; pH: 7,4

### **MACS-Puffer für Mitochondrienisolierung**

0,5% BSA (Sigma, Seelze/Hannover) und 2 mM EDTA in PBS (pH 7,2)

### **MACS-Puffer für Isolierung von CD34<sup>+</sup>-Zellen**

0,5% humanes Albumin (ZLB Behring, Bern, Schweiz) und 2 mM EDTA in PBS  
(pH 7,2)

## **1.2. Lösungen und Puffer für die Gelelektrophorese**

### **Gel-Ladepuffer für native Agarosegele**

(*Blue/Orange 6x Loading Dye*, Promega, Madison, USA)

Der Puffer besteht aus 15% Ficoll®400, 0,03% Bromphenolblau, 0,03% Xylencyanol FF, 0,4% Orange G, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) und 50 mM EDTA.

### **5x TBE**

54 g Tris (Merck), 27,5 g Borsäure (Merck), 4,65 g EDTA (Roth), mit H<sub>2</sub>O *add.* 1l

### **DNA-Größenmarker**

(100 bp DNA Ladder, Promega, Madison, USA)

Der Marker besteht aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten der Größen: 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp und 1500 bp. Die Konzentration beträgt 130 ng DNA in 1 µl Puffer (1 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl (pH 7,5))

### **1.3. Medien und Medienzusätze für die Bakterienkultur**

Alle Nährmedien werden vor Gebrauch 20 Minuten bei 120°C mit Überdruck autoklaviert. Hitzelabile Zusätze (z.B. Antibiotika) werden dem Medium erst nach dem Autoklavieren bei geeigneter Temperatur zugegeben.

#### **LB-Medium (Lennox)**

(Carl Roth, Karlsruhe)

10g/l Trypton; 10g/l NaCl; 5 g/l Hefe-Extrakt, mit H<sub>2</sub>O add. 1l

#### **LB-Agar**

(Carl Roth, Karlsruhe)

LB-Medium mit 15g/l Agar

### **Ampicillin**

(Carl Roth, Karlsruhe)

Zur Selektion Ampicillin-resistenter Bakterienklone werden 0,1 mg Ampicillin pro ml LB-Medium zugesetzt.

## **1.4. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur**

### **Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM)**

(Gibco/Invitrogen, Eggenheim)

Formulierung mit 4500 mg/l Glukose, GlutaMAX™ I und Pyruvat

### **Fetales Kälberserum (FCS)**

(Gibco/Invitrogen, Eggenheim)

Eingesetzte Konzentration: 10% in DMEM

### **Penicillin-Streptomycin**

(Gibco/Invitrogen, Eggenheim)

Eingesetzte Konzentration: 50 IU/ml Penicillin; 50 µg/ml Streptomycin

### **Puromycin**

(Sigma, Seelze/Hannover)

Eingesetzte Konzentration 0,6 µg/ml. Zur Selektion von H196 Zellen.

## **1.5. Zelllinien**

### **HT1080**

(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig)

Humane Teratoma-Zelllinie

### **H196**

(freundlicherweise erhalten von: AG Prof. Dr. Boege, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

Zellen der Linie HT1080, die MTS-YFP exprimieren. Das Konstrukt besteht aus dem fluoreszierenden Protein (YFP) und einem mitochondrialen Targeting-Signal (MTS) der Cytochrom-c-Oxidase.

## **1.6. Primäre Zellen**

### **Humane mononukleäre Zellen (MNCs)**

Die MNCs werden aus Knochenmarkaspiraten isoliert und stammen von MDS-Patienten und gesunden Spendern des Universitätsklinikums Düsseldorf.

### **Humane CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Die CD34-positiven Zellen werden aus Knochenmarkaspiraten von MDS-Patienten und gesunden Spendern des Universitätsklinikums Düsseldorf isoliert.

## **1.7. Antikörper und Farbstoffe**

### **1.7.1. Primärantikörper**

#### **MAB 1273**

(Chemicon/Millipore, Hampshire, England)

Muriner monoklonaler Antikörper mit einer Spezifität für eine nicht-glykosylierte Proteinkomponente humaner Mitochondrien.

### **1.7.2. Konjugierte Sekundärantikörper**

#### **Cy3-anti-Maus IgG**

(Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, USA)

Es handelt sich um ein F(ab')<sub>2</sub> Ziege-anti Maus IgG (H+L)-Fragment.

### **1.7.3. Farbstoffe**

#### **CMXRos**

Mitotracker<sup>®</sup> Red (Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe)

#### **Nitroblautetrazoliumsalz**

(Serva, Heidelberg)

#### **3,3-Diaminobenzidin**

(Sigma, Seelze/Hannover)

## **1.8. MACS-Technologie**

### **1.8.1. Magnetische "Beads"**

#### **Ziege anti-Maus IgG MicroBeads**

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Die MicroBeads sind mit affinitätsgereinigten Ziege F(ab')<sub>2</sub>-Fragmenten konjugiert und dienen zur indirekten Separierung von MAB1273 markierten Mitochondrien.

#### **Maus anti-human CD34 Beads**

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Die MicroBeads werden zur direkten Separierung von CD34-exprimierenden hämatopoietischen Vorläuferzellen über einen direkt gekoppelten monoklonalen anti-CD34 Antikörper eingesetzt.

### **1.8.2. Zubehör zur Magnetischen Separierung**

#### **Magnetischer Zell-Separator**

(*MACS<sup>TM</sup>-Separator*, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Bei dem MiniMACS<sup>TM</sup> - und MidiMACS<sup>TM</sup> –Separator handelt es sich jeweils um starke Permanentmagneten, die an der MACS<sup>®</sup> Multi Stand Station befestigt werden und als Halterung für die entsprechenden MACS-Säulen dienen.

**Separationssäulen**

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)

Die Matrix der *medium scale* (MS)- bzw. *large scale* (LS)-Säulen dient der positiven Selektion von Bead-gebundenen Zellen oder Mitochondrien.

**1.9. Oligonukleotide**

(MWG-Biotech AG, Ebersberg)

**1.9.1. Oligonukleotide für Klonierungen**

| Primer      | Sequenz                                     |
|-------------|---|
| ND3-A-F     | 5'- ATC AAC ACC CTC CTA GCC TTA CTA CTA -3' |
| ND3-A-R     | 5'- TTG TAG TCA CTC ATA GGC CAG ACT TAG -3' |
| CytB-A-F    | 5'- CAC TAC TCA CCA GAC GCC TCA ACC GCC -3' |
| CytB-A-R    | 5'- GAA GGC TGT TGC TAT AGT TGC AAG CAG -3' |
| CoxI-A-F    | 5'- ATG TTC GCC GAC CGT TGA CTA TTC TCT -3' |
| CoxI-A-R    | 5'- GGC ACC GAT TAT TAG GGG AAC TAG TCA -3' |
| SDHB-A-F    | 5'- GAC CTT AAT AAA TGT GGC CCC ATG GTA -3' |
| SDHB-A-R    | 5'- CAC ATA CAT GTG TGG AAG AGG GTA GAT -3' |
| 18srRNA-A-F | 5'- AGG ACT CTT TCG AGG CCC TGT AAT TGG -3' |
| 18srRNA-A-R | 5'- TTC ACC TCT AGC GGC GCA ATA CGA ATG -3' |

**Tabelle 2.1:** Oligonukleotide für die Klonierung der in der real time RT-PCR eingesetzten Standardplasmide

## 1.9.2. Oligonukleotide für Sequenzierungen

| Primer | Sequenz                        |
|--------|--------------------------------|
| M13-F  | 5'- GTA AAA CGA CGG CCA G -3'  |
| M13-R  | 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3' |

Tabelle 2.2: Oligonukleotide für die Sequenzierung

## 1.9.3. Oligonukleotide für quantitative PCR

| Primer      | Sequenz                                     |
|-------------|---|
| ND3-B-F     | 5'- CCT TAC GAG TGC GGC TTC GAC CCT ATA -3' |
| ND3-B-R     | 5'- TAG GGC TCA TGG TAG GGG TAA AAG GAG -3' |
| CytB-B-F    | 5'- ATC ACT CGA GAC GTA AAT TAT GGC TGA -3' |
| CytB-B-R    | 5'- AAT GCC GAT GTT TCA GGT TTC TGA GTA -3' |
| CoxI-B-F    | 5'- TAC CTA TTA TTC GGC GCA TGA GCT GGA -3' |
| CoxI-B-R    | 5'- TGC ATG GGC TGT GAC GAT AAC GTT GTA -3' |
| SDHB-B-F    | 5'- AGT TGA CTC TAC TTT GAC CTT CCG AAG -3' |
| SDHB-B-R    | 5'- GAC CTT ATT GAG GTT GGT GTC AAT CCT -3' |
| 18srRNA-B-F | 5'- ATT AGA GTG TTC AAA GCA GGC CCG AGC -3' |
| 18srRNA-B-R | 5'- CGT CCC TCT TAA TCA TGG CCT CAG TTC -3' |

Tabelle 2.3: Oligonukleotide für die quantitative real time RT-PCR

## 2. Methoden

### 2.1. Präparation von Nukleinsäuren

#### **2.1.1. Mini-Präparation von Plasmid-DNA durch Bindung an eine Anionenaustauschersäule**

(*QIAprep® Miniprep Kit*, Qiagen, Hilden)

Eine drei Milliliter Bakterien-Übernachtskultur (LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin) wird über Nacht inkubiert. Die Bakteriensuspension wird bei 8000 x g für drei Minuten bei Raumtemperatur sedimentiert und das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien werden durch die Zugabe von 250 µl Puffer P2 lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation wird die Probe mit 350 µl Puffer N3 neutralisiert. Durch 10-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 10000 x g wird die Debris aus der Suspension entfernt. Der Überstand wird anschließend auf eine QIAprep Säule gegeben. Die Säulen werden für 60 Sekunden bei 10000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Anschließend erfolgt ein Waschschrift mit 500 µl Puffer PB für 60 Sekunden bei 10000 x g bei Raumtemperatur. In einem weiteren Waschschrift wird die Säule mit 750 µl Puffer PE für 60 Sekunden bei 10000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um verbliebene Reste von Waschpuffer zu entfernen wird der Durchfluß verworfen und die Säule erneut bei 10000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Für die anschließende Elution wird die Säule in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die

Elution erfolgt mit 50 µl EB Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5), wobei die Probe zunächst eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert wird, bevor sie für eine Minute bei 10000 x g zentrifugiert wird.

### 2.1.2. Schnellpräparation von Plasmid-DNA

Diese Methode wird verwendet, um nach der Klonierung eine schnelle Identifikation von positiven Klonen zu ermöglichen. Zunächst wird eine drei Milliliter Bakterien-Übernachtskultur (LB-Medium; 100 µg/ml Ampicillin) angeimpft und über Nacht inkubiert. Aus dieser Kultur werden 20 µl Bakteriensuspension entnommen und mit 20 µl dest. H<sub>2</sub>O gemischt. Die Probe wird anschließend für zwei Minuten in der Mikrowelle bei 800 Watt denaturiert. Danach werden die Zelltrümmer bei Raumtemperatur für eine Minute bei höchster Geschwindigkeit pelletiert. Der wässrige Überstand kann z.B. für PCR-Reaktionen („colony-PCR“) eingesetzt werden.

### 2.1.3. RNA Präparation

#### 2.1.3.1. *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen, Hilden)

Für die RNA-Präparation werden  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  pelletierte Zellen in 600 µl RLT Puffer resuspendiert und homogenisiert, indem die Probe auf eine QIAshredder-

Zentrifugensäule gegeben und zwei Minuten bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert wird. Zu dem Homogenat werden 600 µl 70% Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. Von der Probe werden 700 µl auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und für 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen. Anschließend werden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und wieder 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Für zwei weitere Waschschrte werden jeweils 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bzw. 2 Minuten bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Danach wird die Säule für eine Minute bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert, um die RNeasy Silica-Membran zu trocknen. Zuletzt wird die Säule in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß überführt und die RNA mit 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert, indem das Wasser direkt auf die Membran pipettiert wird und die Säule eine Minute bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert wird.

#### **2.1.3.2. RNeasy® Micro Kit (Qiagen, Hilden)**

Für die RNA-Präparation werden bis zu  $5 \times 10^5$  Zellen in 350 µl RLT Puffer resuspendiert und durch einminütiges Vortexen lysiert und homogenisiert. Zu dem Homogenat werden 350 µl 70% Ethanol gegeben und durch Pipettieren gemischt. Die Probe wird auf eine RNeasy MinElute Säule gegeben und für 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen. Anschließend werden 350 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und wieder 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$

zentrifugiert und der Durchfluß verworfen. Dann wird eine 15 minütige DNase-Behandlung mit 80 µl DNase I – Lösung (10µl DNase; 70 µl RDD-Puffer) bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wird erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. Für einen weiteren Waschschrift werden 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben und für 15 Sekunden bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert. Im nächsten Schritt werden 500 µl 80%iger Ethanol auf die RNeasy MinElute Säule gegeben und für zwei Minuten bei  $\geq 8000 \times g$  zentrifugiert, um die Silica-Gel-Membran zu trocknen. Zusätzlich wird die Säule noch einmal fünf Minuten nach Herstellerangaben zentrifugiert. Zuletzt wird die Säule in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß überführt und die RNA mit 14 µl DEPC-H<sub>2</sub>O eluiert, indem das Wasser direkt auf die Membran pipettiert und die Säule eine Minute bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert wird. Dieses Kit wird ebenfalls zur Reinigung bereits isolierter RNA verwendet, wenn eine DNase-Behandlung notwendig ist.

#### **2.1.4. Reinigung von PCR-Produkten für die Klonierung**

(*QIAquick PCR Purification Kit*, Qiagen, Hilden)

Die Reinigung der PCR-Ansätze für die Klonierung erfolgt mit dem *QIAquick PCR Purification Kit*. Hierzu wird die PCR-Probe mit dem fünffachen ihres Volumens an PB1 Puffer gemischt. Dieses Gemisch wird auf eine QIAquick Säule gegeben und für eine Minute zentrifugiert. Der Durchfluß wird verworfen. Anschließend wird die Säule mit 750 µl PE Puffer gewaschen. Dann wird die Säule zusätzlich eine

Minute zentrifugiert. Die gebundene DNA wird mit 50 µl EB Puffer in ein sauberes Mikroreaktionsgefäß eluiert.

## **2.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

(*NanoDrop*, Peqlab, Erlangen)

Die Bestimmung der Konzentration einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgt mittels eines UV/Vis Spektralphotometers. Hierbei wird die Extinktion bei 260 nm und 280 nm für DNA und RNA gegen Wasser als Leerwert gemessen. Für die Konzentrationsbestimmung wird ein Mikroliter der zu bestimmenden Probe auf das Ende einer optischen Faser („receiving fiber“) pipettiert. Anschließend wird eine weitere optische Faser („source fiber“) mit der Probe in Kontakt gebracht. Der Lichtweg beträgt 1,0 mm. Der Reinheitsgrad der Lösung wird durch den Extinktionskoeffizient  $E_{260}/E_{280}$  abgeschätzt. Eine DNA-Lösung wird als „rein“ bezeichnet, wenn ihr Extinktionskoeffizient bei  $\sim 1,8$  liegt; bei einer „reinen“ RNA-Lösung beträgt er  $\sim 2$ .

## **2.3. RNA-Qualitätsbestimmung**

(*RNA 6000 LabChip®*, Agilent Technologies, Waldbronn)

Die Überprüfung sowohl der RNA-Qualität als auch der RNA-Integrität wurde beim BMFZ der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mittels eines Agilent 2100 Bioanalyzers durchgeführt.

Je nach Probenkonzentration wird entweder der Agilent RNA 6000 NanoChip® (5-500 ng/µl total RNA) oder der Agilent RNA 6000 PicoChip® (200-5000 pg/µl total RNA) verwendet. Jede Probe eines Chips wird sequentiell in einen zentralen Separationskanal im Chip geleitet und die RNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Passieren sie nach der Separation den Detektionspunkt im Chip, wird die jeweilige Probe dokumentiert.

## 2.4. Gelelektrophorese

(nach Sambrook *et al.*, „Molecular Cloning“, Cold Spring Harbor Laboratory Press 3. Aufl., 2001, New York)

Bei der Gelelektrophorese werden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt. Zur analytischen Auftrennung der DNA werden horizontale Agarosegele verwendet. Die Agarosekonzentration beträgt 2% (w/v). Als Laufpuffer wird 1x TBE verwendet, da sich dieser gut für längere Elektrophoresen eignet und eine gute Auftrennung von DNA-Fragmenten  $\leq 1$  kb liefert. Die Gelelektrophorese wird für 30 min–1h bei 80-110 V durchgeführt. Zur Anfärbung der DNA wird dem Agarosegel EtBr (0,5 µg/ml) zugesetzt. Die Analyse erfolgt unter UV-Licht (245 nm) durch Vergleich mit den oben beschriebenen Größenstandards.

## **2.5. Enzymatische Reaktionen**

### **2.5.1. Synthese von cDNA**

(*ThermoScript™ RT-PCR System*, Invitrogen, Karlsruhe)

Zunächst werden 1 µl 50 µM Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer, 2 µl 10mM dNTP Mix und 9 µl RNA gemischt und für fünf Minuten bei 65°C inkubiert. Während dieser Inkubation werden die Primer und Sekundärstrukturen der RNA denaturiert. Anschließend wird die Probe auf Eis gestellt. Zu der vorbereiteten RNA-Probe werden 8 µl Mastermix (4 µl 5x cDNA Synthese Puffer; 1 µl 0,1M DTT; 1 µl RNaseOUT™ (40 U/µl); 1 µl DEPC-H<sub>2</sub>O; 1 µl ThermoScript™RT(15 U/µl)) gegeben. Dann wird die Probe für eine Stunde bei 55°C inkubiert. Diese Reaktion wird durch eine fünfminütige Inkubation bei 85°C terminiert. Zuletzt wird die Probe mit 1 µl RNaseH für 20 Minuten bei 37°C inkubiert um die komplementäre RNA zu entfernen. Die cDNA wird bei -20°C gelagert.

### **2.5.2. Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)**

Für die Reaktionen werden die Thermocycler von Biometra (*T3 Thermocycler*) und Applied Biosystems (*GeneAmp PCR System 9600*) verwendet.

#### 2.5.2.1. PCR für Klonierung der Standardplasmide

(*Platinum<sup>®</sup>Taq DNA Polymerase High Fidelity*, Invitrogen, Karlsruhe)

Die benötigten Sequenzen werden durch Amplifikation aus cDNA gewonnen (5 µl 10x High Fidelity PCR Puffer; 2 µl 50 mM MgSO<sub>4</sub>; 4 µl 2,5 mM dNTP Mix; 2 µl 10 mM Forward-Primer; 2 µl 10 mM Reverse-Primer; 0,2 µl Platinum<sup>®</sup> *Taq* High Fidelity; 3 µl cDNA; 31,8 µl H<sub>2</sub>O). Zuerst wird die Probe für vier Minuten bei 94°C inkubiert. Der anschließende PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung der DNA bei 94°C für eine Minute. Die folgende Hybridisierung der Oligonukleotide bei 55°C und die Elongation bei 72°C erfolgen ebenfalls für eine Minute. Dieser Zyklus wird 34x wiederholt. Die Reaktion wird mit einem Elongationsschritt von 10 Minuten bei 72°C beendet.

#### 2.5.2.2. PCR zur Identifikation positiver Klone

(*Ampli<sup>®</sup>Taq Gold*, Applied Biosystems, Darmstadt)

Für die PCR werden jeweils 5 µl der in 2.1.2 präparierten Plasmid DNA verwendet. Diese werden mit 45 µl Mastermix (5 µl GeneAmp 10x PCR Gold Puffer; 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 4 µl 2,5 mM dNTP Mix; 2 µl 10 pmol Forwardprimer; 2 µl 10 pmol Reverseprimer; 0,2 µl *Ampli<sup>®</sup>Taq Gold*; 28,8 µl H<sub>2</sub>O) gemischt. Zunächst wird die Probe für vier Minuten bei 94°C denaturiert und die bis dahin inaktive Polymerase aktiviert („hot start“). Der PCR-Zyklus besteht aus der Denaturierung der doppelsträngigen DNA (94°C) mit anschließender Hybridisierung der

Oligonukleotide mit einem der beiden DNA-Einzelstränge (55°C) und abschließender Verlängerung der Moleküle entlang der Matrize (72°C), wobei jeder Schritt jeweils eine Minute dauert. Dieser Zyklus wird 35 mal durchgeführt. Zuletzt erfolgt ein verlängerter Elongationsschritt für 10 Minuten bei 72°C.

### 2.5.2.3. Quantitative LightCycler PCR

(*QuantiTect® SYBR® Green one-step RT-PCR Kit*, Qiagen, Hilden)

Das One-step RT-PCR Kit ermöglicht die Durchführung sowohl der reversen Transkription als auch der anschließenden PCR in einem Reaktionsgefäß. Zunächst erfolgt die reverse Transkription. Während dieser liegt die DNA-Polymerase in inaktivem Zustand vor und kann somit nicht mit der Reaktion interferieren. Erst durch einen „hot start“ wird die HotStar *Taq* DNA Polymerase® aktiviert. Gleichzeitig werden die Enzyme der reversen Transkription inaktiviert, so dass es zu einer zeitlichen Trennung der beiden Prozesse kommt. Für die Quantifizierung werden Zielsequenzen zwischen 130 bp und 150 bp amplifiziert. Die Reaktionen werden in einem *LightCycler®* System der Fa. Roche durchgeführt. Das Probenvolumen beträgt für dieses System 20 µl. In den Ansätzen werden 5 ng bzw. 5 pg RNA eingesetzt, die mit dem Mastermix (10 µl 2x QuantiTect SYBR Green; 1 µl 10 pmol Forwardprimer; 1 µl 10 pmol Reverseprimer; 0,2 µl QuantiTect RT Mix; H<sub>2</sub>O *add.* 20 µl) gemischt werden. Alle Reaktionen werden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Für die

Quantifizierung werden Standardplasmide verwendet, die in vier Verdünnungen (10 pg, 1 pg, 0,1 pg, 0,01 pg) jeweils als Doppelansatz eingesetzt werden.

|                       | Zeit        | Temperatur | Ramp    |
|-----------------------|-------------|------------|---------|
| Reverse Transkription | 20 Minuten  | 50°C       | 20°/sek |
| Aktivierung           | 15 Minuten  | 95°C       | 20°/sek |
| Amplifikation         |             |            |         |
| Denaturierung         | 15 Sekunden | 94°C       | 20°/sek |
| Hybridisierung        | 15 Sekunden | 59°C       | 20°/sek |
| Verlängerung          | 20 Sekunden | 72°C       | 2°/sek  |
| Renaturierung         | 5 Minuten   | 40°C       | 20°/sek |
| Anzahl der Zyklen     | 40          |            |         |

**Tabelle 2.4:** Bedingungen für die real time PCR mit dem LightCycler (Roche)

Um die einzelnen Läufe miteinander vergleichen zu können, wird Zellkultur-RNA aus HT1080 Zellen als interne Kontrolle eingesetzt. Um eine Verfälschung durch Hintergrundfluoreszenz auszuschließen, werden die Ansätze jeweils mit und ohne RT-Mix angesetzt. Die Expressionswerte werden nach folgender Formel berechnet:

$$RQ_{(mtGen/18sRNA)} = \frac{Ex_{mtGen} - Ex_{Hintergrund}}{Ex_{18sRNA} - Ex_{Hintergrund}}$$

Die statistische Auswertung erfolgt mittels zweiseitigem unabhängigen Student's T-Test.

### 2.5.3. Klonierung der Standardplasmide

(*Topo TA Cloning<sup>®</sup> Kit für Sequenzierungen*, Invitrogen, Karlsruhe)

Für die Quantifizierung der Genexpression verschiedener mitochondrialer Gene in unterschiedlichen Proben werden die verwendeten Sequenzen in Plasmide kloniert, um eine möglichst genaue Quantifizierung zu ermöglichen.

Hierzu werden die Sequenzen in den pCR<sup>®</sup> 4-TOPO<sup>®</sup> Vektor kloniert. Der Vektor liegt in linearisierter Form vor, wobei die Topoisomerase I des Vaccinia Virus kovalent über einen Tyrosinrest an das 3'-Phosphat des geschnittenen DNA-Strangs gebunden ist. Da die *Taq*-Polymerase ein einzelnes Deoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produktes anfügt und der Vektor ein einzelnes überhängendes 3'-Deoxythymidin besitzt, können die beiden DNA-Komponenten effizient miteinander ligieren.

Für den Ligationsansatz werden 4 µl PCR-Produkt mit 1 µl Salzlösung (1,2 M NaCl, 60 mM MgCl<sub>2</sub>) und 1 µl Vektor (10 ng/µl DNA) gemischt. Dieser Ansatz wird für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 2 µl des

Ligationsansatzes zu 50 µl chemisch kompetenten TOP10-Bakterien (F<sup>-</sup> *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)*7697 *galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*) pipettiert und vorsichtig gemischt. Die Bakteriensuspension wird für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgt ein Hitzeschock der Bakterien für 30 Sekunden bei 42°C. Anschließend wird die Probe sofort auf Eis abgekühlt. Die transformierten Bakterien werden mit 250 µl S.O.C. Medium (2% Trypton; 0,5% Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glukose) gemischt und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Schließlich werden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten (100 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Analyse werden dann einzelne Klone gepickt.

#### 2.5.4. Plasmid-Sequenzierung

(Seqlab, Göttingen)

Die Sequenzierungen werden von den Sequence Laboratories Göttingen GmbH (Seqlab) durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgen nach der Kettenabbruchmethode als *HOT SHOTS*. Hierzu werden jeweils 5 µl Plasmid-DNA mit entweder 2 µl des Oligonukleotids M13-F (10 pmol) oder M13-R (10 pmol) gemischt und verschickt. Die Sequenzen werden elektronisch übermittelt und mittels VektorNTI<sup>®</sup> ausgewertet.

## **2.6. Zellkultur**

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

### **2.6.1. Trypsinisierung und Resuspendierung adhärenter Zellen**

Nach Abnahme des Zellkulturüberstandes werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sie sich von der Kulturflasche ablösen. Anschließend werden die gelösten Zellen in geeignetem Medium mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum resuspendiert, wodurch die Trypsinaktivität beendet wird. Einige Tropfen der Zellsuspension werden auf die Zellkulturflasche zurückgegeben und in 10-15 ml frischen Mediums aufgenommen. Werden die restlichen Zellen für Versuche benötigt, werden diese mit PBS bei 500 x g für 4 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen und in einem geeigneten Volumen Medium oder PBS resuspendiert.

### **2.6.2. Separierung mononukleärer Zellen mittels Dichtezentrifugation**

*(Lymphoprep<sup>TM</sup>, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norwegen)*

Humane mononukleäre Zellen (MNCs) werden mittels Dichtezentrifugation aus humanem Knochenmark separiert. Dieses Verfahren macht sich die unterschiedliche Dichte der verschiedenen Zellarten des menschlichen Blutes zunutze, indem Knochenmark über eine hochmolekulare Flüssigkeit geschichtet

wird, in welcher sich die Zellen nach der Zentrifugation in verschiedene dichteabhängige Phasen aufteilen.

Hierfür wird das gewonnene Knochenmark zunächst durch ein Nygonsieb gefiltert und 1:2 mit PBS verdünnt. Dann wird die Probe auf 15 ml Lymphoprep-Puffer geschichtet. Anschließend wird der Ansatz für 20 Minuten bei 400 x g bei Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase mit den mononukleären Zellen wird vorsichtig abgenommen und dreimal in ihrem dreifachen Volumen PBS gewaschen. Die so gewonnenen Zellen werden für weitere Versuche eingesetzt.

### 2.6.3. Präparation von CD34<sup>+</sup>-Zellen

*(Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi, Bergisch-Gladbach)*

Jeweils  $\leq 10^8$  aus Knochenmark separierte, pelletierte mononukleäre Zellen werden in 300  $\mu$ l MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wird zunächst mit 100  $\mu$ l FcR-Blocking Reagenz versetzt und sorgfältig gemischt, um eine unspezifische Fc-Rezeptor-vermittelte Bindung zu inhibieren. Danach wird die Probe mit 100  $\mu$ l anti-CD34<sup>+</sup> Beads gemischt und für 30 Minuten bei 6°-12°C inkubiert. Anschließend wird die Probe in dem 20fachen Volumen MACS-Puffer resuspendiert und bei 400 x g für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Je nach Zellzahl und verwendeter Säule wird das Pellet in 500  $\mu$ l bzw. 3 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf eine MS-MACS- bzw. LS-MACS-Säule

gegeben. Die Säulen werden zuvor im Zell-Separator fixiert und mit MACS-Puffer vorinkubiert. Sind die CD34<sup>+</sup>-Zellen über die magnetischen Beads an die Säule gebunden, wird diese dreimal mit 500 µl bzw. 3 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend vom Magneten entfernt. Ohne das Magnetfeld lösen sich die MicroBeads mit den an sie gebundenen Zellen von der Säulenmatrix und können mit 1 ml bzw. 5ml MACS-Puffer durch Druck eluiert werden. Um die Reinheit der Zellpopulation zu erhöhen, kann die eluierte Zellfraktion über eine zweite Säule gegeben werden.

## **2.6.4. Zellzahlbestimmung**

### **2.6.4.1. Automatisierte Zellzahlbestimmung**

(*Coulter® MicroDiff II*, Beckman Coulter, Krefeld)

Für eine Messung werden 12 µl Zellsuspension benötigt, die nach dem Ansaugen im Gerät verdünnt werden. Da die Widerstandsänderung proportional zum Zellvolumen ist, erfolgt die Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen anhand der Widerstandsänderungen, die beim Durchtritt einer Zelle durch die Kapillare auftreten. Bevor die verdünnte Probe mit Lysisreagenz versetzt wird, wird die Erythrozyten/Thrombozytenkonzentration gemessen. Anschließend wird in der lysierten Probe die Leukozytenzahl ermittelt. Diese setzt sich aus der Anzahl an Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zusammen.

#### 2.6.4.2. Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

Für die Zellzahlbestimmung wird eine Zellsuspension mit Trypanblau gemischt. Der Farbstoff diffundiert in Zellen ohne intakte Zellmembran, so dass diese Zellen dunkelblau erscheinen. Diese Zellen werden bei der Zellzahlbestimmung nicht berücksichtigt.

#### 2.6.5. Präparation von Mitochondrien

##### 2.6.5.1. Präparation von Mitochondrien aus Zellkultur

*(Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells, Pierce/Perbio, Bonn)*

Es werden  $2 \times 10^7$  Zellen für die Mitochondrienisolation eingesetzt. Diese werden in 800  $\mu$ l Reagenz A resuspendiert, bei mittlerer Stärke mit einem Vortex gemischt und für zwei Minuten auf Eis inkubiert. Dann wird die Zellsuspension mit 5  $\mu$ l Reagenz B und einigen Glaskügelchen versetzt, auf höchster Stufe gemischt und für weitere fünf Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubation wird die Probe jede Minute gemischt. Anschließend werden 800  $\mu$ l Reagenz C zugegeben und durch „Kippen“ des Reaktionsgefäßes sorgfältig gemischt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1000 x g für 10 Minuten, der Überstand wird abgenommen und bei 2000 x g erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Der abgenommene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Suspension bei 8000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet, welches die Mitochondrien enthält, wird mit

500 µl Reagenz C gewaschen. Das Pellet beinhaltet eine grob gereinigte Mitochondrienfraktion. Für einige Versuche ist eine stärker gereinigte Mitochondrienfraktion nötig. Die hierzu verwendete Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit etabliert (siehe 2.6.5.2).

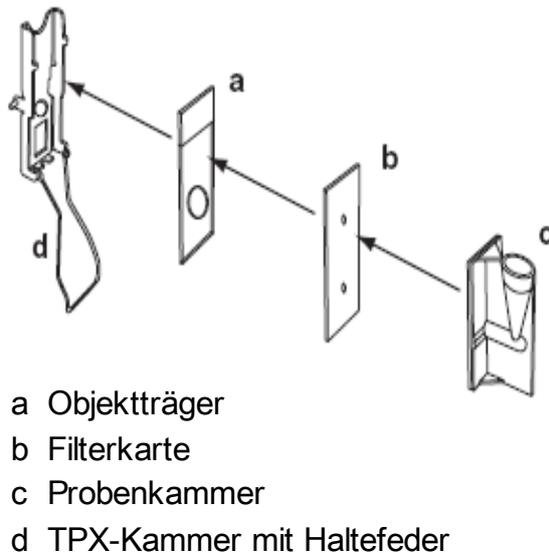
#### **2.6.5.2. Immunpräzipitation von Mitochondrien aus Zellkultur**

Zunächst wird eine grobe Mitochondrienreinigung wie unter 2.6.5.1 beschrieben durchgeführt. Das so gewonnene Mitochondrienpellet wird in 100µl MAB1273 (1:20 verd.) mit Proteaseinhibitor (Roche) resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C unter Rollen inkubiert. Anschließend werden 50 µl PBS mit Proteaseinhibitor zugegeben und die Probe mit 100 µl Ziege anti-Maus IgG MicroBeads gemischt. Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei 4°C unter Rollen. Danach wird die Probe mit einem Milliliter PBS mit Proteaseinhibitor gewaschen und die Mitochondrien bei Raumtemperatur bei 8000 x g für zwei Minuten pelletiert. Das Mitochondrienpellet wird in einem Milliliter PBS mit Proteaseinhibitor resuspendiert und die Suspension wird auf eine MS-Säule (Miltenyi) gegeben. Der Durchfluß wird erneut auf die Säule gegeben. Anschließend wird die Säule mit einem Milliliter PBS gewaschen und die Mitochondrien in einem Milliliter PBS eluiert. Die Mitochondriensuspension wird bei Raumtemperatur bei 8000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die pelletierten Mitochondrien werden in 20 µl PBS resuspendiert und zur Analyse auf einem Objektträger eingedeckt.

### 2.6.6. Zentrifugation mit Cytospin

(*Cytospin™ 3* Shanon, Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)

Mit Hilfe der Zytocentrifuge ist es möglich, Suspensionszellen als Einschichtpräparat auf einen Objektträger zu zentrifugieren. Mittels der Zentrifugation können die Zellen auf einen definierten Bereich des Objektträgers aufgebracht werden. Die Probenkammern werden wie in **Abb. 2.1** gezeigt zusammengesetzt.



**Abb. 2.1:** Aufbau der Probenkammer in der Zytospin (nach Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA)

Anschließend werden die Probenkammern in die Zentrifuge gestellt und  $5-7,5 \times 10^4$  Zellen in 150  $\mu\text{l}$  Zellsuspension bei RT auf adhäsive Objektträger (HistoBond®, Marienfeld, Lauda-Königshofen) sedimentiert (5 min., 500 rpm, medium). So

werden die Zellen abgeflacht und die Restflüssigkeit durch eine Filterkarte absorbiert.

## 2.7. Färbungen

### 2.7.1. Enzymatische Färbung von CD34<sup>+</sup>-Zellen

#### 2.7.1.1. Reaktion der Succinatdehydrogenase

(*HYBrite™*, Abbott Laboratories, Wiesbaden)

Bei der SDH-Färbung handelt es sich um eine enzymatische Färbung, die spezifisch für die Succinatdehydrogenase (Komplex II der mitochondrialen Atmungskette) ist. Es werden Elektronen auf NBT (Nitroblautetrazoliumsalz), das in reduzierter Form einen blauen unlöslichen Niederschlag bildet, übertragen. Für die Färbung werden 150 µl Zellsuspension (ca.  $5-7,5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>-Zellen) auf adhäsive Objektträger (*HistoBond®*, Marienfeld, Lauda-Königshofen) zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann werden die Objektträger mit 250 µl SDH-Färbelösung für eine Stunde bei 37°C im *HYBrite™* inkubiert; als Kontrolle werden Zellen mit einer SDH-Färbelösung ohne Succinat inkubiert. Danach wird der Objektträger in *aqua dest.* gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Durch eine fünfminütige Inkubation mit 4% PFA werden die Zellen fixiert. Das Eindecken der Präparate

erfolgt mit 75% Glycerin in PBS. Anschließend werden die Färbungen mikroskopisch ausgewertet (*Axioskop3*, Zeiss, Göttingen).

#### 2.7.1.2. Reaktion der Cytochrom-c-Oxidase

(*HYBrite™*, Abbott Laboratories, Wiesbaden)

Bei der COX-Färbung handelt es sich um eine enzymatische Färbung, die spezifisch für die Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette) ist. DAB (Diaminobenzidin) wird durch Komplex IV und Cytochrom c oxidiert und bildet ein braunes unlösliches Polymer.

Für die Färbung werden 150 µl Zellsuspension (ca.  $5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>-Zellen) auf adhäsive Objektträger (*HistoBond®*, Marienfeld, Lauda-Königshofen) zentrifugiert. Die Zellen werden anschließend 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Dann werden die Objektträger mit 250 µl COX-Färbelösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert; als Kontrolle werden Zellen mit einer COX-Färbelösung ohne Cytochrom c inkubiert. Danach wird der Objektträger in *aqua dest.* gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Durch eine fünfminütige Inkubation mit 4% Paraformaldehyd (PFA) werden die Zellen fixiert. Das Eindecken der Präparate erfolgt mit 75% Glycerin in PBS. Anschließend werden die Färbungen mikroskopisch ausgewertet (*Axioskop3*, Zeiss, Göttingen).

### **2.7.2. Immunchemische Färbung von Mitochondrien**

In Zellkulturschalen werden Deckgläschen (18 x 18 mm) gelegt. In die Zellkulturschalen werden Zellen der gewünschten adhären wachsenden Zelllinie ausgesät. Zunächst wird das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für eine Stunde bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> in 200 µl MAB1273 (1:500 verd.) inkubiert. Danach werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> mit 200 µl Cy3-anti-Maus IgG (1:1000 verd.) inkubiert. Anschließend werden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für fünf Minuten mit 4% PFA fixiert. Die Auswertung findet mit dem Axiovert 100 Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Göttingen) statt.

### **2.7.3. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials mittels CMXRos**

Mittels CMXRos (Invitrogen, Karlsruhe) kann das Membranpotential von Mitochondrien bestimmt werden. Bei dem Farbstoff handelt es sich um ein Derivat von X-Rosamin, das in aktiven Mitochondrien akkumuliert wird.

### **2.7.3.1. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in Zellen**

In Zellkulturschalen werden Deckgläschen (18 x 18 mm) gelegt und die Zellen der zu untersuchenden Zelllinie ausgesät. Wenn der Zellrasen konfluent ist, wird zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen für 10 Minuten bei 37°C bei 5% CO<sub>2</sub> in 1 ml CMXRos (200 nM in DMEM) inkubiert. Die Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs CMXRos in den Mitochondrien wird im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 (Zeiss, Göttingen) überprüft. Anschließend werden die Mitochondrien isoliert.

### **2.7.3.2. Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials in isolierten Mitochondrien**

Isolierte Mitochondrien werden in 100 µl CMXRos (200 nM in PBS) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Probe zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und das Pellet in 20 µl PBS resuspendiert. Die Mitochondriensuspension wird auf einen Objektträger gegeben und die Akkumulation des Fluoreszenzfarbstoffs in den Mitochondrien wird im Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 (Zeiss, Göttingen) überprüft.

## **III. Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob in hämatopoietischen Progenitorzellen Defekte der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe vorliegen, die zur Pathogenese myelodysplastischer Syndrome (MDS) beitragen könnten. Dazu wurden zunächst enzymatische Färbungen für die Atmungskettenkomplexe Succinatdehydrogenase und Cytochrom-c-Oxidase durchgeführt.

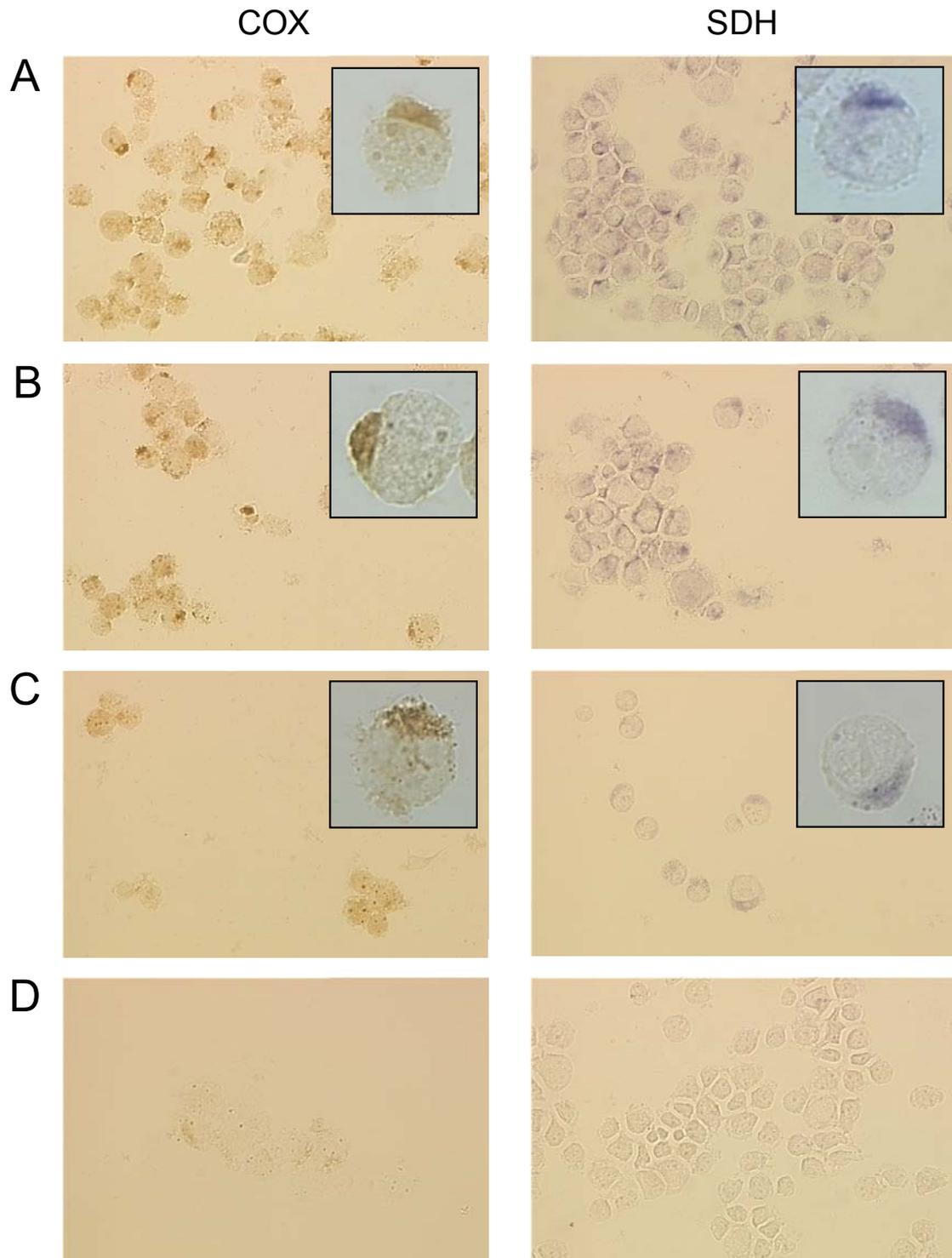
### **1. Funktionalität der Atmungskettenkomplexe in CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Zur Überprüfung der Funktionalität der Succinatdehydrogenase (Komplex II der Atmungskette) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) wurden enzymatische Färbungen angewendet, die zur Untersuchung der Aktivität der Enzymkomplexe bereits in Muskelschnitten und Geweben zur Anwendung kamen (Boerian, 1991; Litwin & Furgal, 1990; Anderson *et al.*, 1975; Perotti *et al.*, 1983). Diese Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit modifiziert und für die Färbung von hämatopoietischen Progenitorzellen etabliert.

#### **1.1. Aktivität der Succinatdehydrogenase (Komplex II) und der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) in CD34<sup>+</sup>-Zellen**

Es wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen von gesunden Spendern und von MDS-Patienten verwendet, die aus Knochenmarkaspiraten gewonnen wurden. Je nach

Präparation wurden für die Histochemie  $5-7,5 \times 10^4$  Zellen mittels Zytozentrifugation auf einen Polylysin-beschichteten Objektträger aufgebracht. Die Zellen wurden mit 200  $\mu$ l Färbelösung für 1h bei 37°C inkubiert. Die SDH-Lösung enthält Succinylsäure als Substrat und NBT als Indikator für die Enzymaktivität. Ist der Komplex II aktiv, wird Succinat zu Fumarat umgewandelt, und die entstehenden Elektronen werden auf das farblose NBT übertragen. Dieses fällt als blaues unlösliches Formazan aus. Man kann erkennen, dass die CD34<sup>+</sup>-Zellen aus einem großen Zellkern bestehen, der von einem dünnen Zytoplasmasaum umgeben ist (**Abb. 3.1.**), welcher unter anderem die Mitochondrien enthält. Bei der COX-Färbung wird die Farbstofflösung von der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) umgesetzt. In dieser Reaktion wird Cytochrom c reduziert und DAB oxidiert. Das oxidierte DAB bildet ein unlösliches Polymer, das als brauner Niederschlag ausfällt. Man kann erkennen, dass die Färbemethode erfolgreich auf hematopoietische Progenitorzellen übertragen werden konnte (blauer bzw. brauner Niederschlag im Zytoplasma (**Abb. 3.1.**)). Die Intensität der Färbung variierte bei unterschiedlichen Patienten- und Spenderisolaten, allerdings färbten sich entgegen der Erwartungen auch die MDS-Zellen positiv. Erwartet wurde, ausgehend von der Hypothese, dass mitochondrial kodierte Atmungskettendefekte zur MDS-Pathogenese beitragen, dass bei Anwendung der COX-Färbung der Farbumschlag bei den MDS-Patienten vermindert ist. Bei der SDH-Färbung sollten alle Proben eine Färbung zeigen, da dieser Komplex nur von nukleären Genen kodiert wird (siehe IV. Diskussion).



**Abb. 3.1.:** Aktivitätsnachweis der Komplexe II und IV. Je nach Zellzahl wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen ( $5-7,5 \times 10^4$ ) auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden jeweils mit 200  $\mu$ l Färbelösung für 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen eines gesunden Spenders (**A**) zeigen sowohl eine COX- als auch eine SDH-Aktivität. (**B**) und (**C**) zeigen exemplarisch die Zellen zweier MDS-Patienten. Bei (**B**) ist eine stärkere Färbung zu erkennen als bei (**C**). Die Negativkontrollen (**D**) zeigen keine spezifische Färbung.

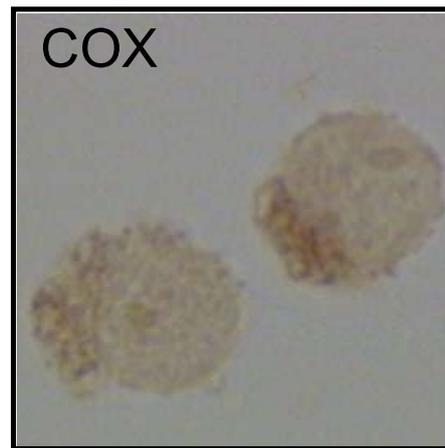
Tatsächlich waren alle Proben gefärbt, aber auch hier waren Varianzen zu erkennen (**Abb. 3.1.**). Insgesamt war kein Unterschied zwischen CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder Spender und CD34<sup>+</sup>-Zellen an MDS erkrankter Menschen zu erkennen. Als Negativkontrolle wurden separierte CD34<sup>+</sup>-Zellen für eine Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> sowohl mit 200 µl SDH- als auch COX-Lösung ohne Substrate inkubiert (**Abb. 3.1. D**). Hier erfolgte –erwartungsgemäß– keine Färbung, so dass man davon ausgehen kann, dass es sich um Reaktionen handelt, die für die jeweiligen Komplexe spezifisch sind.

Die hier angewandte Methode der enzymatischen Färbung erlaubt allerdings keine quantitative Aussage über die Atmungskettenkomplexe II und IV sowie deren Funktionalität in CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Progenitorzellen. Sie führte jedoch, nach Anwendung auf CD34<sup>+</sup>-Zellen einer Patientin (Nr. 44; siehe Anhang) zu einer ungewöhnlichen Fallbeobachtung (**Abs. 1.2.**).

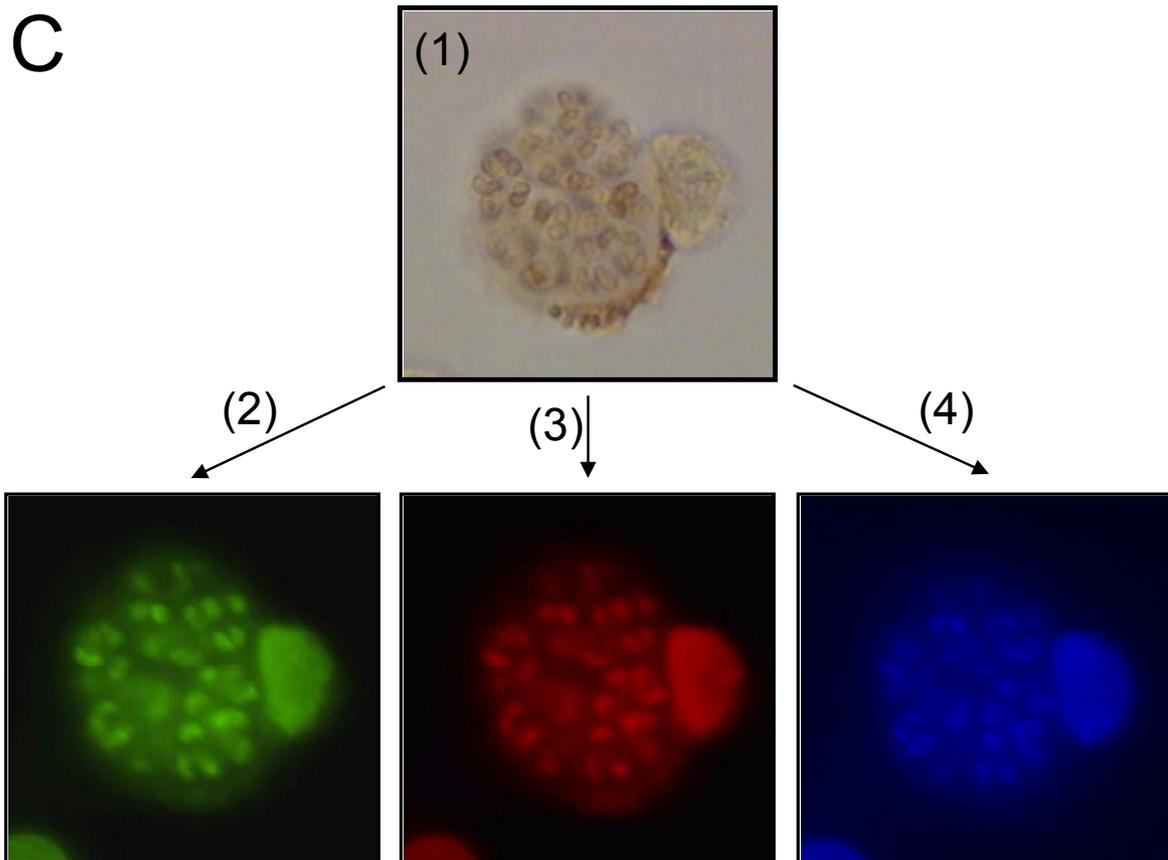
## 1.2. Fallbeobachtung

Von einer 80-jährigen MDS-Patientin wurde ein Knochenmarkaspirat gewonnen und daraus die CD34<sup>+</sup> Zellen isoliert. Zum Zeitpunkt der Punktion war die Patientin unbehandelt. Auch in diesen Zellen wurden mit SDH- bzw. COX- spezifischen Farbreaktionen die Aktivität dieser Enzymkomplexe untersucht. Beide Färbungen waren, analog zu den Färbungen unter 1.1., positiv (**Abb. 3.2. A**). Allerdings

finden sich in den Präparaten Zellen mit bislang nicht identifizierten intrazellulären Strukturen (**Abb. 3.2. B+C**), bei denen es sich um Chromosomen handeln könnte.

**A****B**

**Abb. 3.2. (A+B):** Aktivitätsnachweis der Komplexe II und IV. Es wurden  $7,5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>-Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden jeweils mit 200  $\mu$ l Färbelösung für 1h bei 37°C inkubiert. Die Zellen der MDS-Patientin (Nr. 44, siehe Anhang) zeigten sowohl eine COX- als auch eine SDH-Aktivität (**A**). Außerdem fanden sich in den Präparaten Zellen mit bislang nicht identifizierten Strukturen im Zellinneren (**B+C**), bei denen es sich unter Umständen um Chromosomen handelt (siehe Diskussion).



**Abb.3.2. Fortsetzung (C) :** Aktivitätsnachweis der Komplexe II und IV. Es wurden  $7,5 \times 10^4$  CD34<sup>+</sup>-Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zellen wurden jeweils mit 200  $\mu$ l Färbelösung für 1h bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass man sowohl die COX-Färbung (**C**) als auch die SDH-Färbung (Daten nicht gezeigt) für Fluoreszenzmikroskopie einsetzen kann. **(1)** zeigt exemplarisch eine der ungewöhnlichen Zellen nach COX-Färbung im Durchlicht. Außerdem ist die Fluoreszenz bei verschiedenen Anregungswellenlängen gezeigt **(2)** 495 nm, **(3)** 596 nm und **(4)** 358 nm.

Da sich dieser Befund aber nicht eindeutig belegen ließ, wurden vom Institut für medizinische Mikrobiologie (Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) LightCycler PCRs gegen Bakterien- und Pilz-RNA ohne Befund durchgeführt. Hierfür wurde DNA benötigt, die aus Knochenmark isoliert wurde. Die als Dauerpräparat fixierten und zuvor gefärbten Zellen (**Abb. 3.2**) wurden außerdem, da kein spezifischer hämatologischer Befund erhoben werden konnte, konsiliarisch der Zytopathologie

(Heinrich Heine Universität, Düsseldorf) zur Beurteilung vorgelegt, jedoch ebenfalls ohne eindeutigen Befund.

Da die in den CD34<sup>+</sup>-Zellen angewandten enzymatischen Färbungen es nicht erlauben, einzelne Enzymkomplexe bezüglich ihrer Quantität und Funktionalität zu beurteilen, wurde im Folgenden das Atmungsketten-Transkriptom in hämatopoietischen Progenitorzellen aus Knochenmarkaspiraten gesunder Spender und MDS-Patienten quantitativ analysiert um zu untersuchen, ob mögliche Atmungskettendefekte auf ein Ungleichgewicht in der Stöchiometrie der einzelnen Enzymkomplexuntereinheiten auf Ebene der Transkription zurückgeführt werden können.

## 2. Genexpressionsanalyse der Atmungskettenkomplexe

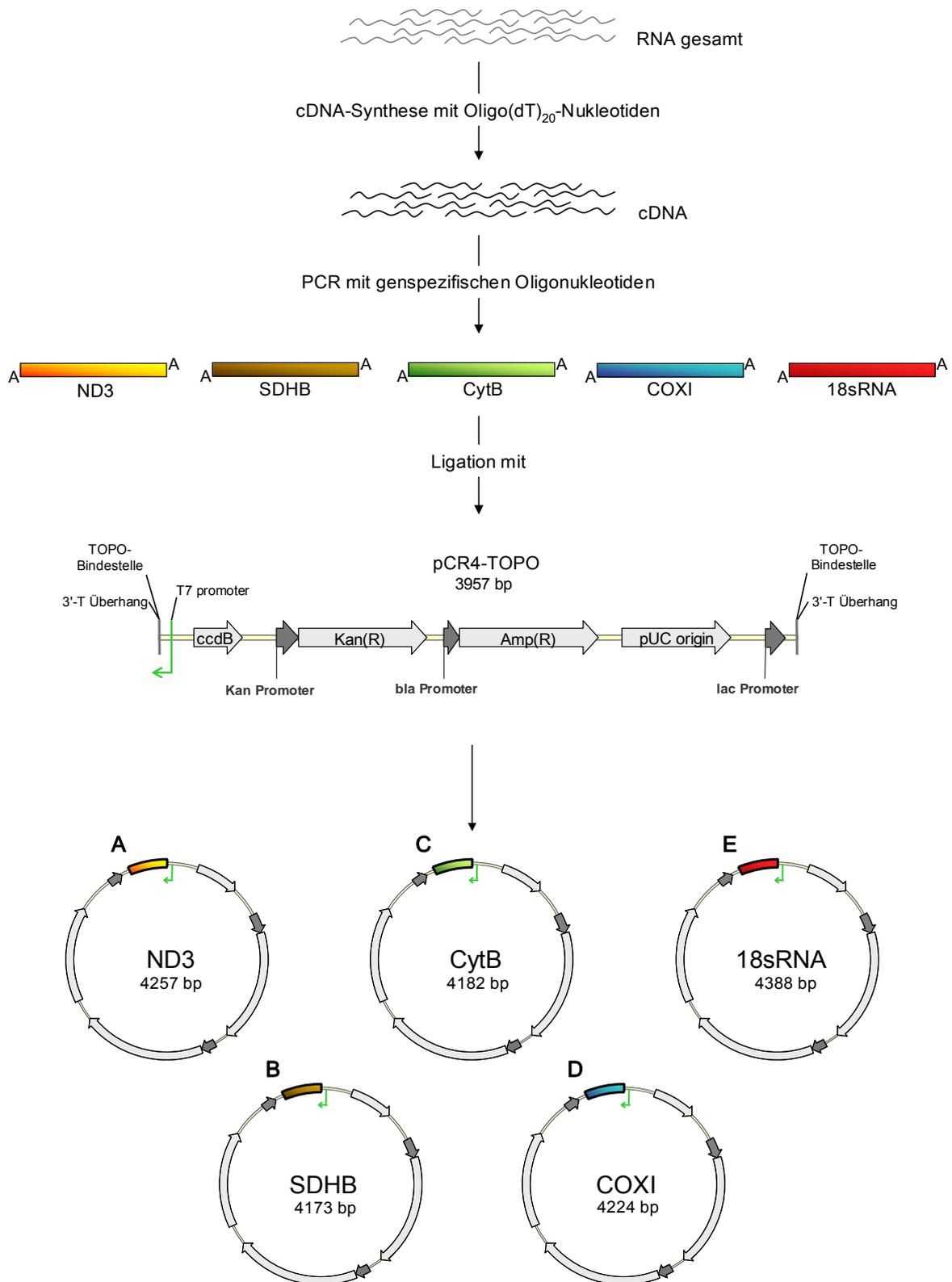
Um zu überprüfen, ob trotz der wenig aussagekräftigen Ergebnisse der enzymatischen Färbungen (**Abs. III.1.1. und III.1.2.**) Defekte der mitochondrial kodierten Atmungskettenuntereinheiten vorliegen, die an der MDS-Pathogenese beteiligt sind, wurde im Folgenden die Genexpression mitochondrialer Gene der Elektronentransportkette analysiert. Die Untersuchung erfolgte mittels quantitativer real time RT-PCR auf dem LightCycler.

## 2.1. Generierung der Standardplasmide

Bei den Genen, deren RNA-Expression untersucht wurde, handelt es sich um die mitochondrial kodierten Untereinheiten ND3 (Komplex I), CytB (Komplex III) und COXI (Komplex IV), sowie um das kernkodierte Gen SDHB (Komplex II). Für die relative Quantifizierung wurde 18sRNA als Bezugsgröße gewählt. Für die Generierung der Standardplasmide wurden Genabschnitte ohne bekannte Polymorphismen aus den oben genannten Genen mittels PCR amplifiziert. Um die Polymorphismus-freien Regionen zu identifizieren wurden die Sequenzen unterschiedlicher Prototyp-Mitochondriengenome (Genbanknummern: X93334; AB055387; D38112; NC\_001807) verglichen und ein Alignment für die entsprechenden Gene und der *Cambridge Reference Sequence* (basiert auf Genbanknummern: J01415, M12548, M58503, M63932, M63933) mittels Vektor NTI erstellt (siehe Anhang).

Zunächst wurde die gesamte RNA aus HT1080 Zellen isoliert und anschließend mittels Oligo(dT)<sub>20</sub>-Nukleotiden die cDNA synthetisiert. Mit Hilfe der genspezifischen Oligonukleotide wurden die erwarteten DNA-Fragmente amplifiziert (**Abb. 3.3.**). Für die Klonierung war es notwendig, eine *Taq*-Polymerase zu verwenden, da diese Enzym an die entstehenden PCR-Produkte endständige 3'-Adenosine anfügt. Diese wiederum benötigt die an den pCRTPO4 Vektor gebundene Topoisomerase I, um das PCR Produkt mit dem Vektor zu ligieren.

### Klonierungsschema



**Abb. 3.3.:** Generierung der Standardplasmide (ausführliche Legende siehe nächste Seite)

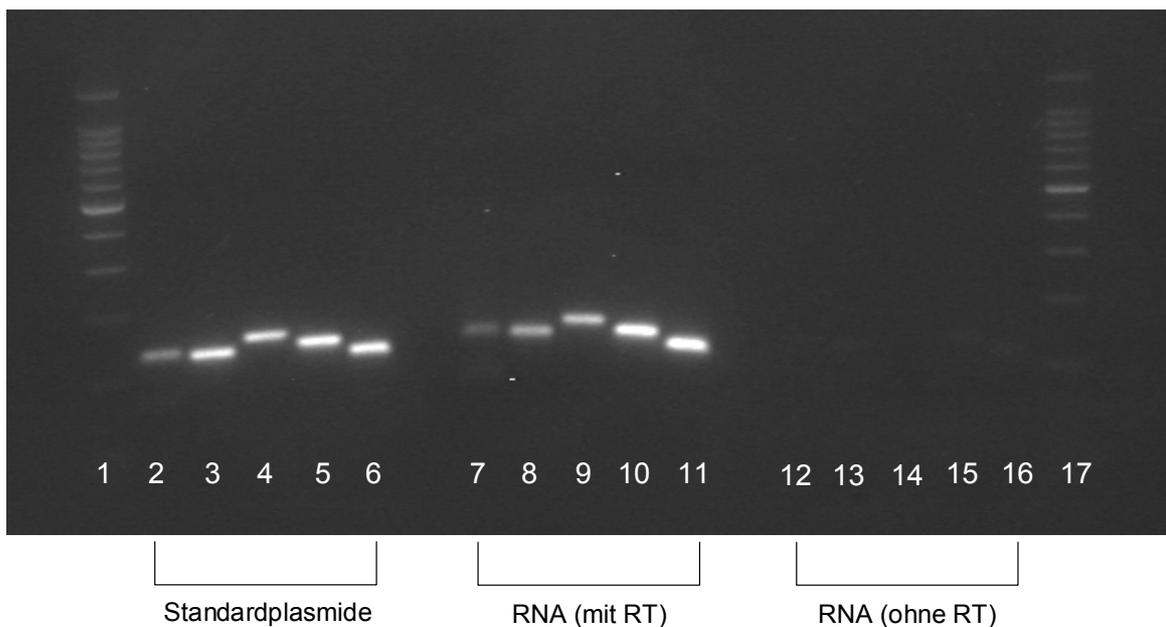
**Abb. 3.3. (Fortsetzung):** Für die Amplifikation der genspezifischen Sequenzen wurde cDNA aus mRNA generiert, die wiederum aus Zellkultur (Zellen der Linie HT1080) isoliert worden war. Die Zielsequenzen wurden mit den genspezifischen Oligonukleotiden ND3-A-F/ND3-A-R, SDHB-A-F/SDHB-A-R, CytB-A-F/CytB-A-R, COXI-A-F/COXI-A-R und 18sRNA-A-F/18sRNA-A-R mittels *Taq*-Polymerase amplifiziert. Durch die 3'-Adeninüberhänge am PCR-Produkt kann dieses über die am pCR-TOPO4 Vektor gebundene Topoisomerase I inseriert werden.

Der Klonierungserfolg und die Orientierung des Inserts im Plasmid wurden in einer PCR mit dem Oligonukleotid M13F und einem genspezifischen Oligonukleotid (ND3-A-R, SDHB-A-R, CytB-A-R, COXI-A-R, 18sRNA-A-R) bzw. dem Oligonukleotid M13R und einem genspezifischen Oligonukleotid (ND3-A-F, SDHB-A-F, CytB-A-F, COXI-A-F, 18sRNA-A-F) überprüft. Die Integrität der Plasmide wurde mittels Gelelektrophorese und Sequenzierung überprüft. Die vollständigen Insert-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

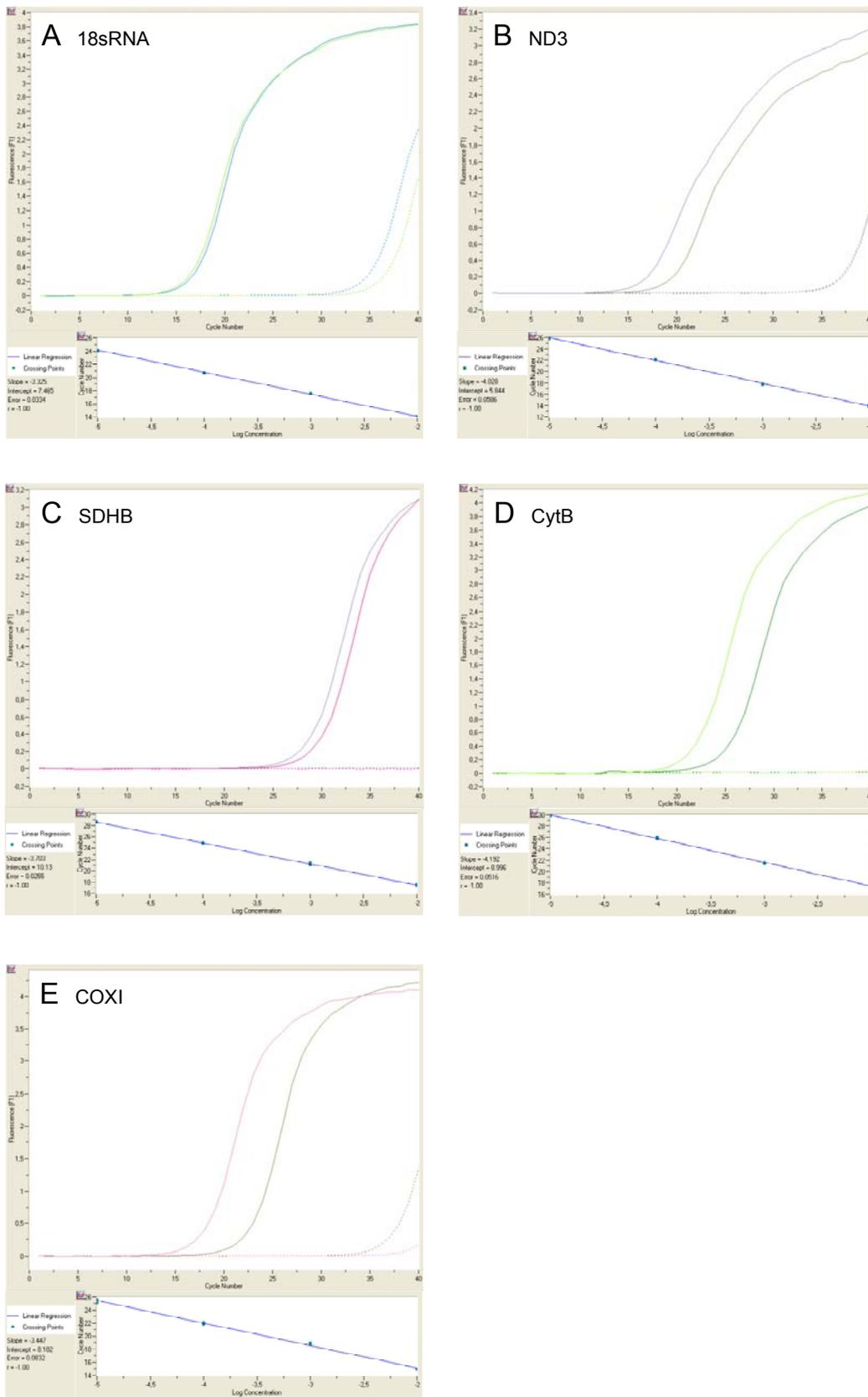
## 2.2. Etablierung der Realtime PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden one-step real time RT-PCRs für den LightCycler (Roche) etabliert. Hierfür wurde zunächst die aus HT1080 Zellen extrahierte, DNase (RNase frei) behandelte RNA verwendet. Um zu überprüfen, ob die korrekten Genabschnitte amplifiziert wurden, wurden sowohl die Standardplasmide als auch die Gesamt-RNA aus Zellen der Linie HT1080 mit den entsprechenden Oligonukleotidpaaren (ND3-B-F/ND3-B-R, SDHB-B-F/SDHB-B-R, CytB-B-F/CytB-B-R, COXI-B-F/COXI-B-R und 18sRNA-B-F/18sRNA-B-R) gemischt und für die real time PCR eingesetzt. Die Negativkontrolle bestand aus

identischen Ansätzen ohne Zusatz reverser Transkriptase. Es wurden je 10 pg, 1 pg, 0,1 pg und 0,01 pg Plasmid DNA eingesetzt. Von der Gesamt-RNA wurden 5 ng für die Amplifikation von ND3, SDHB, CytB und COXI eingesetzt, während für die Amplifikation der 18sRNA 5 pg Gesamt-RNA verwendet wurden. Die Amplifikate wurden gelelektrophoretisch überprüft. Es ist zu erkennen (**Abb. 3.4.**), dass Fragmente der erwarteten Größen von 131 bp (ND3), 126 bp (SDHB), 146 bp (CytB), 131 bp (COXI) und 115 bp (18sRNA) amplifiziert wurden, wobei jeweils



**Abb. 3.4.:** Gelelektrophoretische Überprüfung der real time RT-PCR. Die Reaktionen wurden je mit den Oligonukleotidpaaren ND3-B-F/ND3-B-R, SDHB-B-F/SDHB-B-R, CytB-B-F/CytB-B-R, COXI-B-F/COXI-B-R und 18sRNA-B-F/18sRNA-B-R durchgeführt. Die Reaktionen wurden im ersten Ansatz mit den Standardplasmiden ND3 (**2**), SDHB (**3**), CytB (**4**), COXI (**5**) und 18sRNA (**6**) (je 10 pg DNA) angesetzt. Ein weiterer Ansatz bestand aus je 5 ng Gesamt-RNA aus Zellen der Linie HT1080 für die Amplifikation von ND3 (**7**), SDHB (**8**), CytB (**9**) und COXI (**10**) und 5 pg Gesamt-RNA für die Amplifikation der 18sRNA (**11**). Als Kontrolle dienten die Reaktionsansätze mit Gesamt-RNA ohne reverse Transkriptase (ND3 (**12**), SDHB (**13**), CytB (**14**), COXI (**15**), 18sRNA (**16**)). Es ist zu erkennen, dass bei allen Reaktionen nur ein spezifisches Amplifikat entsteht (**2-11**) und in den Proben keine DNA-Kontamination vorliegt, die die Untersuchung beeinträchtigt (**12-16**).



**Abb. 3.5.:** Vergleich der Genexpression mittels one step real time RT-PCR im LightCycler (ausführliche Legende siehe nächste Seite)

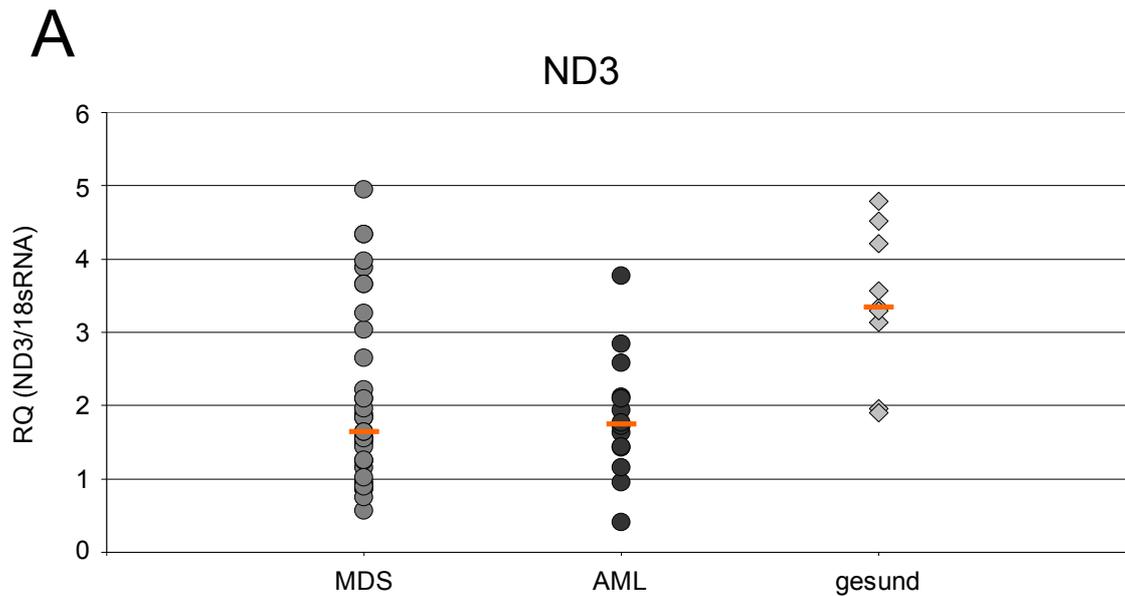
**Abb. 3.5.:** Vergleich der Genexpression mittels one step real time RT-PCR im LightCycler (Roche). Es sind jeweils exemplarisch repräsentative Amplifikationskurven und die zum jeweiligen Lauf gehörenden Standardgeraden gezeigt. Die reverse Transkription und die Amplifikation erfolgten in einem Reaktionsgefäß (one step single tube). In der PCR wurden jeweils 5 ng Gesamt-RNA aus CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkaspiraten zur Amplifikation von ND3 (**B**), SDHB (**C**), CytB (**D**) und COXI (**E**) eingesetzt. Für die Amplifikation der 18sRNA (**A**) wurden 5 pg Gesamt-RNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Ansätze ohne reverse Transkriptase angesetzt. Die Standardgeraden wurden anhand der Standardplasmide definierter Konzentration (10 pg, 1 pg, 0,1 pg 0,01 pg) durch Doppelbestimmung ermittelt. Es werden exemplarisch jeweils zwei Proben für jedes Gen gezeigt.

nur ein spezifisches Amplifikat entstand. Die Negativkontrolle zeigte, dass nach zuvor durchgeführter DNase-Behandlung keine DNA-Kontaminationen in der RNA-Lösung vorlagen, die den Versuchsansatz hätten beeinträchtigen können (**Abb. 3.4.**). Um die Genexpression der Atmungskettenuntereinheiten in MDS-Patienten zu untersuchen, wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkaspiraten separiert und die Gesamt-RNA extrahiert. Diese ebenfalls DNase behandelte RNA wurde in der etablierten One-Step real time RT-PCR eingesetzt (**Abb. 3.5.;** **Abs. 2.3.-2.5.**).

### **2.3. Vergleich der Genexpression der Atmungskettenkomplexuntereinheiten bei Gesunden und MDS-Patienten**

Die Expressionsraten Atmungskettenkomplexuntereinheiten kodierender Gene wurden bei MDS-Patienten und gesunden Spendern verglichen. Hierzu wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkaspiraten isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. Mittels one step real time RT-PCR wurde die Expression der Gene ND3, SDHB,

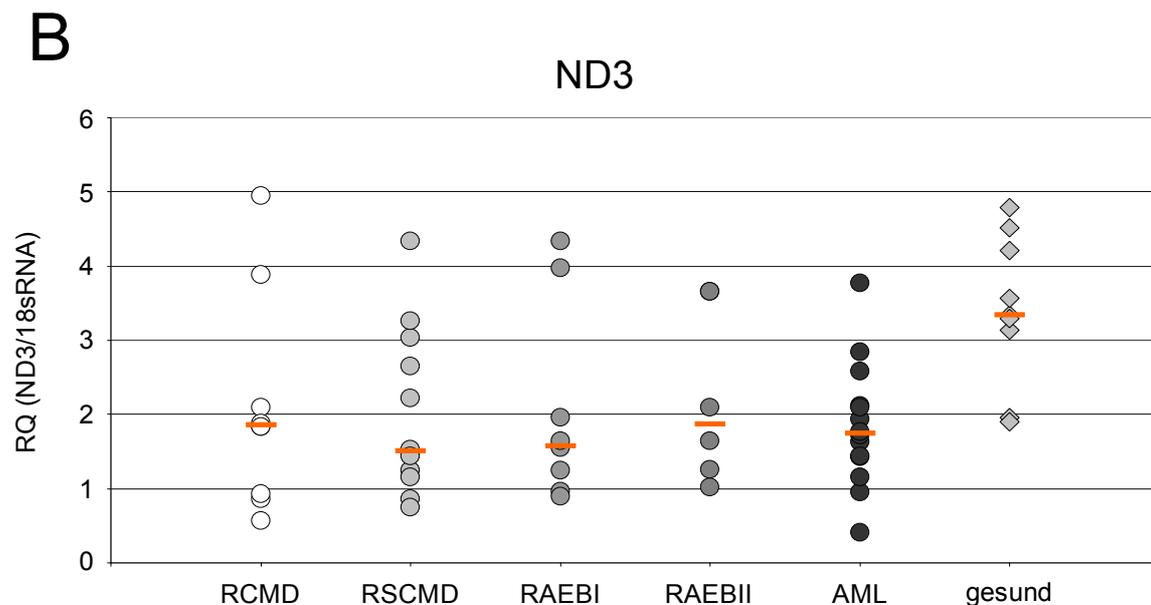
CytB und COXI relativ zur Expression der 18sRNA quantifiziert (RQ). Bei allen Auswertungen wurde der Median bestimmt und mittels Student's T-Test die statistische Signifikanz überprüft. Untersucht wurde ein Kollektiv von 51 MDS Patienten und 9 gesunden Spendern. Da sich die Gruppe der MDS-Patienten aus verschiedenen, zytomorphologisch definierten, Untergruppen zusammensetzt, wurden zunächst diese Untergruppen hinsichtlich ihrer Genexpressionsrate miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass sich die Gruppe der an akuter myeloischer Leukämie Erkrankten (n=14) bezüglich ihrer ND3-Expression nicht signifikant von den übrigen MDS-Patienten (n=37) unterscheiden (**Abb. 3.6. A**). Die Expression des mitochondrial kodierten Gens ND3 in CD34<sup>+</sup>-Zellen ist sowohl bei den MDS-Patienten (p=0,022), als auch bei den AML-Patienten (p=0,002) statistisch signifikant geringer als bei den gesunden Spendern (n=9) (**Abb. 3.6. A**). Sowohl bei der Expression von CytB (MDS: p=0,004; AML: p=0,011) als auch bei der Expression von COXI (MDS: p=0,005; AML: p=0,022) kommt es zu einer signifikanten Reduktion gegenüber den gesunden Spendern. Diese Verminderung betrifft auch das kernkodierte Gen SDHB (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3.6. A:** Vergleich und relative Quantifizierung (RQ) der ND3-Expression mittels one step real time RT-PCR in CD34<sup>+</sup>-Zellen bei AML, MDS und gesunden Spendern. Die relative Quantifizierung erfolgte im Vergleich zu 18sRNA. Die Expression des mitochondrialen Gens ND3 ist sowohl bei den MDS-Patienten (n=37; p=0,022) als auch bei den AML-Patienten (n=14; p=0,002) signifikant niedriger als bei den gesunden Spendern (n=9). Die Gruppen der MDS- und AML-Patienten unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von ND3 nicht voneinander. Es wurde der Median (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die statistische Signifikanz der Ergebnisse überprüft.

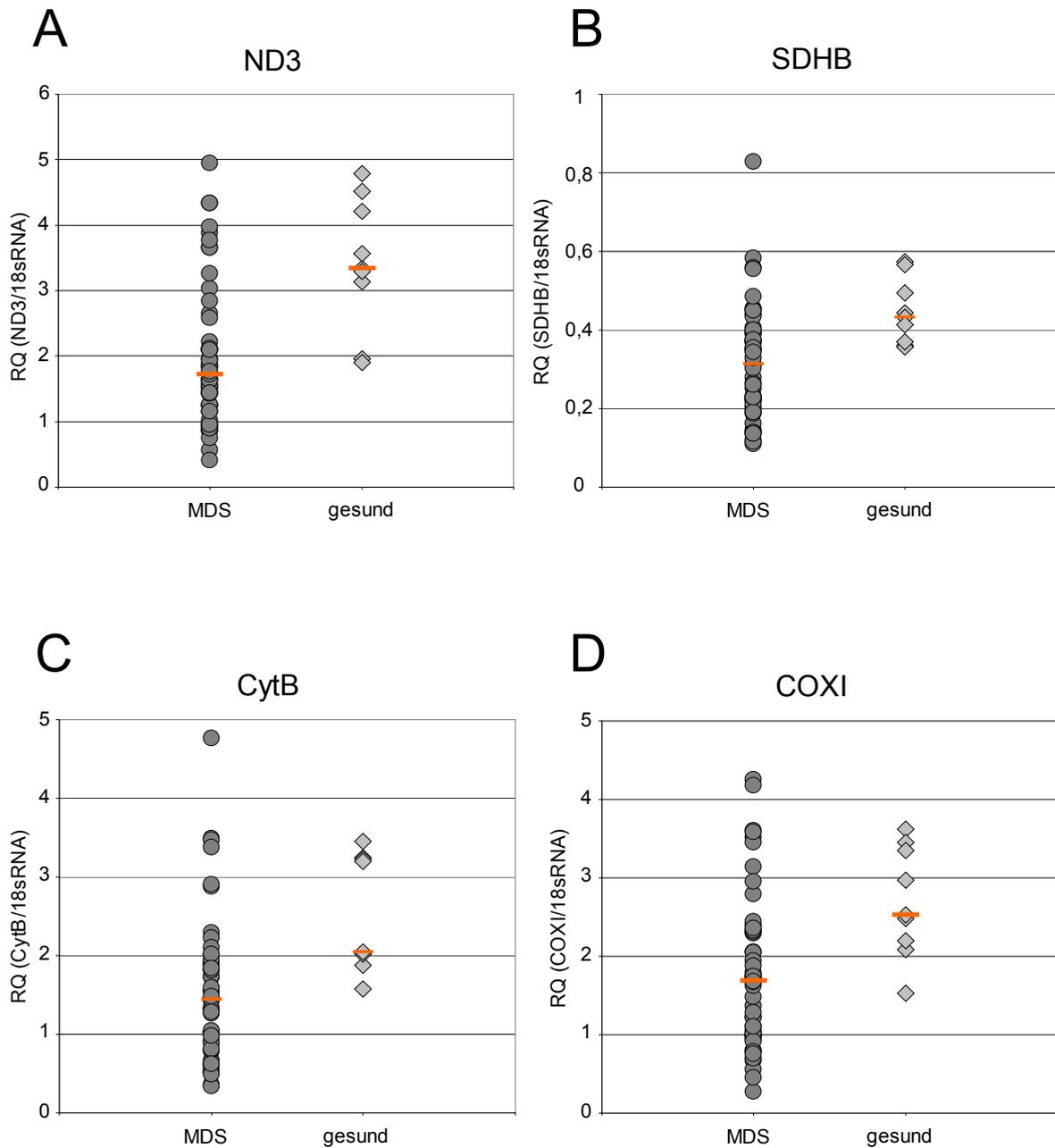
Bei den MDS-Patienten wurde deutlich, dass sich die verschiedenen Untergruppen bezüglich der Genexpression nicht signifikant voneinander unterscheiden. Dies ist exemplarisch anhand des Gens ND3 gezeigt (**Abb. 3.6. B**), ein ähnliches Ergebnis findet sich auch für die anderen untersuchten Gene (Daten nicht gezeigt). Insbesondere die RAEBI- und AML- Patienten zeigen eine signifikante Reduktion der mitochondrialen Genexpression ( $p < 0,05$ ), zusätzlich aber auch eine signifikante Reduktion des kernkodierten Gens SDHB. Man kann folglich, basierend auf den hier durchgeführten molekularen Analysen, die

einzelnen Untergruppen zu einer weitgehend homogenen MDS-Gruppe zusammenfassen, zumal die bestehende MDS-Klassifizierung, abgesehen vom 5q-Syndrom, nicht auf molekularen Markern begründet ist.



**Abb. 3.6. B:** Vergleich und relative Quantifizierung (RQ) der ND3 Expression mittels One step real time RT-PCR in CD34<sup>+</sup>-Zellen von MDS-Untergruppen und gesunden Spendern. Die relative Quantifizierung erfolgte im Vergleich zu 18sRNA. Die Expression des mitochondrialen Gens ND3 ist in allen MDS-Untergruppen (RCMD: n=10; RSCMD: n=12; RAEBI: n=9; RAEBII: n=6; AML: n=14) gegenüber der Genexpression der gesunden Spender (n=9) verringert. Die MDS-Untergruppen unterscheiden sich hinsichtlich der Expression von ND3 nicht voneinander. Es wurde der Median (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die statistische Signifikanz der Ergebnisse überprüft (siehe Text).

Betrachtet man die Gesamtheit der MDS-Patienten, so ist zu erkennen, dass der Median der ND3-Expression bei den MDS-Patienten etwa um die Hälfte im Vergleich zu den gesunden Spendern reduziert ist ( $p=0,008$ ) (**Abb. 3.7. A**).



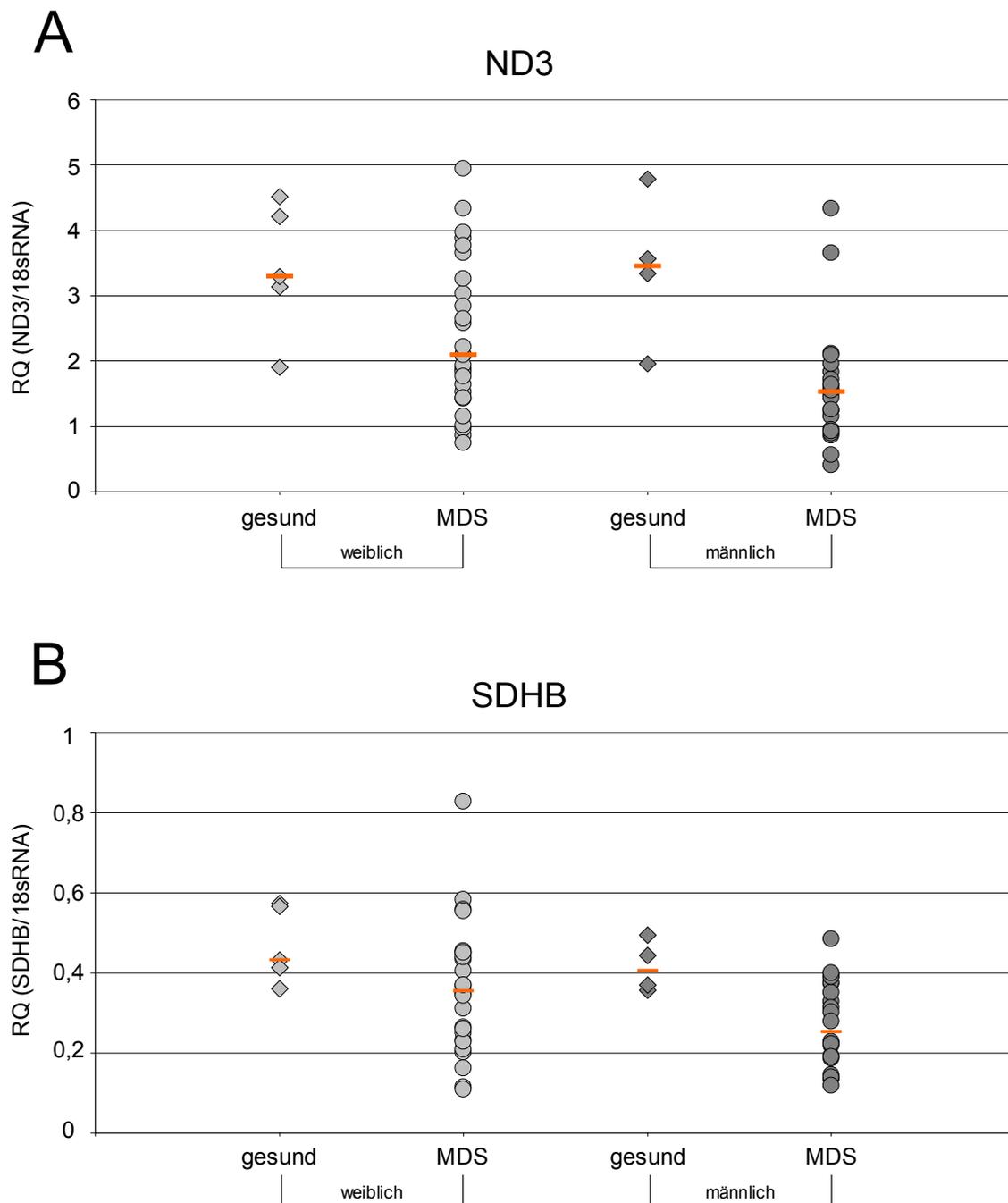
**Abb. 3.7.:** Vergleich der Genexpression in  $CD34^+$ -Zellen gesunder Spender ( $n=9$ ) und MDS-Patienten ( $n=51$ ). Mittels real time RT-PCR wurde die Expression mitochondrialer Gene untersucht. Diese wurde auf die Expression der 18sRNA bezogen und die relativen Werte miteinander verglichen (RQ). Es wurde der Median (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Bei allen untersuchten Genen ist eine signifikante Reduktion der RNA-Menge bei den an MDS erkrankten Personen zu beobachten **(A)**: ( $p=0,008$ ); **(B)**: ( $p=0,044$ ); **(C)** ( $p=0,004$ ); **(D)** ( $p=0,005$ ).

Die Expression des SDHB-Gens beträgt bei den MDS-Patienten nur ca. 75% der mRNA-Menge der Gesunden ( $p=0,044$ ) (**Abb. 3.7. B**). Die CytB-Expression ist um 30% und die COXI-Expression um 40% signifikant reduziert ( $p\leq 0,005$ ) (**Abb. 3.7. C+D**). Zusammenfassend wurde beobachtet, dass die Genexpression der Atmungskettenuntereinheiten bei MDS-Patienten deutlich gegenüber den gesunden Spendern reduziert ist.

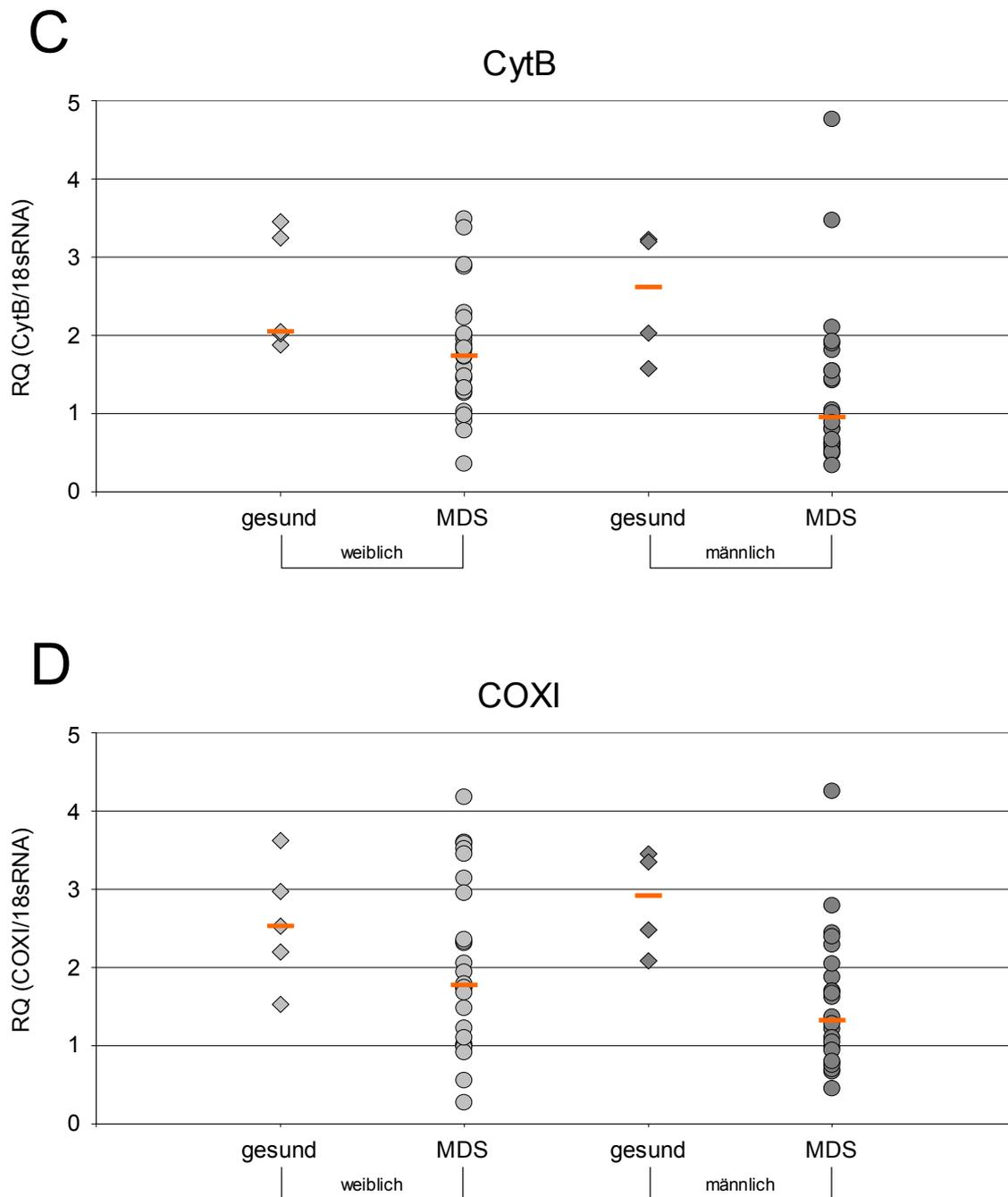
#### **2.4. Vergleich der Genexpression der Atmungskettenkomplexuntereinheiten nach Geschlecht**

Die aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurden nun nach Geschlecht ausgewertet, um zu untersuchen, ob geschlechtsspezifische Unterschiede der Genexpression zwischen gesunden Spendern und MDS-Patienten vorliegen.

Dafür wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkaspiraten isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. Mittels one step real time RT-PCR wurde die Expression der Gene ND3, SDHB, CytB und COXI relativ zur Expression der 18sRNA quantifiziert (RQ). Bei allen Auswertungen wurde der Median bestimmt und mittels Student's T-Test die statistische Signifikanz überprüft. Untersucht wurde ein Kollektiv von 5 gesunden und 27 an MDS erkrankten Frauen, sowie 4 gesunden Männern und 24 männlichen MDS-Patienten.



**Abb. 3.8. (A+B):** Vergleich der Genexpression in CD34<sup>+</sup>-Zellen mittels relativer Quantifizierung (RQ): Auswertung nach Geschlecht. Das Kollektiv bestand aus 5 gesunden Frauen, 4 gesunden Männern, 27 an MDS erkrankten Frauen und 24 an MDS erkrankten Männern. Mittels real time RT-PCR wurde die Expression mitochondrialer Gene untersucht. Diese wurde auf die Expression der 18sRNA bezogen und die relativen Werte miteinander verglichen. Es wurden die Mediane (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Die Expression des Gens ND3 **(A)** ist sowohl bei den an MDS erkrankten Frauen als auch bei den an MDS erkrankten Männern verringert. Beim kernkodierten Gen SDHB **(B)** ist die RNA-Menge bei den männlichen stärker als bei den weiblichen MDS Patienten vermindert ( $p < 0,05$ ).



**Abb. 3.8. Fortsetzung (C+D):** Vergleich der Genexpression in  $CD34^+$ -Zellen mittels relativer Quantifizierung (RQ): Auswertung nach Geschlecht. Mittels real time RT-PCR wurde die Expression mitochondrialer Gene untersucht. Diese wurde auf die Expression der 18sRNA bezogen und die relativen Werte miteinander verglichen. Es wurden die Mediane (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Zu erkennen ist, dass jeweils die Mediane bei gesunden Frauen und Männern ähnlich sind (**A-D**), bei männlichen MDS-Patienten die Genexpression jedoch stärker als bei den weiblichen MDS-Patienten vermindert ist. Sowohl bei CytB (**C**) als auch bei COXI ( $p=0,019$ ) (**D**) ist der krankheitsbedingte Unterschied bei den Männern stärker ausgeprägt als bei den Frauen.

Hierbei stellte sich heraus, dass bei beiden Geschlechtern die Genexpression bei MDS verringert ist (**Abb. 3.8. A-D**). Die Genexpression von SDHB ist bei den an MDS erkrankten Männern signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) als bei den gesunden männlichen Spendern (**Abb. 3.8. B**). Die CytB Expression zeigt nur eine geringe Abnahme der RNA-Menge bei den weiblichen MDS-Patienten, aber eine starke Reduktion bei den erkrankten Männern (**Abb. 3.8. C**). Auch der krankheitsbedingte Unterschied in der Transkriptmenge des Gens COXI ist bei den Männern größer (**Abb. 3.8. D**). Insgesamt zeigte sich, dass es zu einer Verminderung der Transkriptmenge bei den an MDS erkrankten Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern kommt. Auffällig ist außerdem, dass die Genexpression bei den männlichen MDS-Patienten niedriger als bei den weiblichen MDS-Patienten ist, dieser Unterschied aber nicht zwischen gesunden Männern und Frauen zu beobachten ist (**Abb. 3.8. A-D**). Es scheint folglich ein geschlechts-spezifischer Effekt vorhanden zu sein, der bei gesunden Menschen nicht ins Gewicht fällt und erst durch MDS verstärkt oder ausgelöst wird.

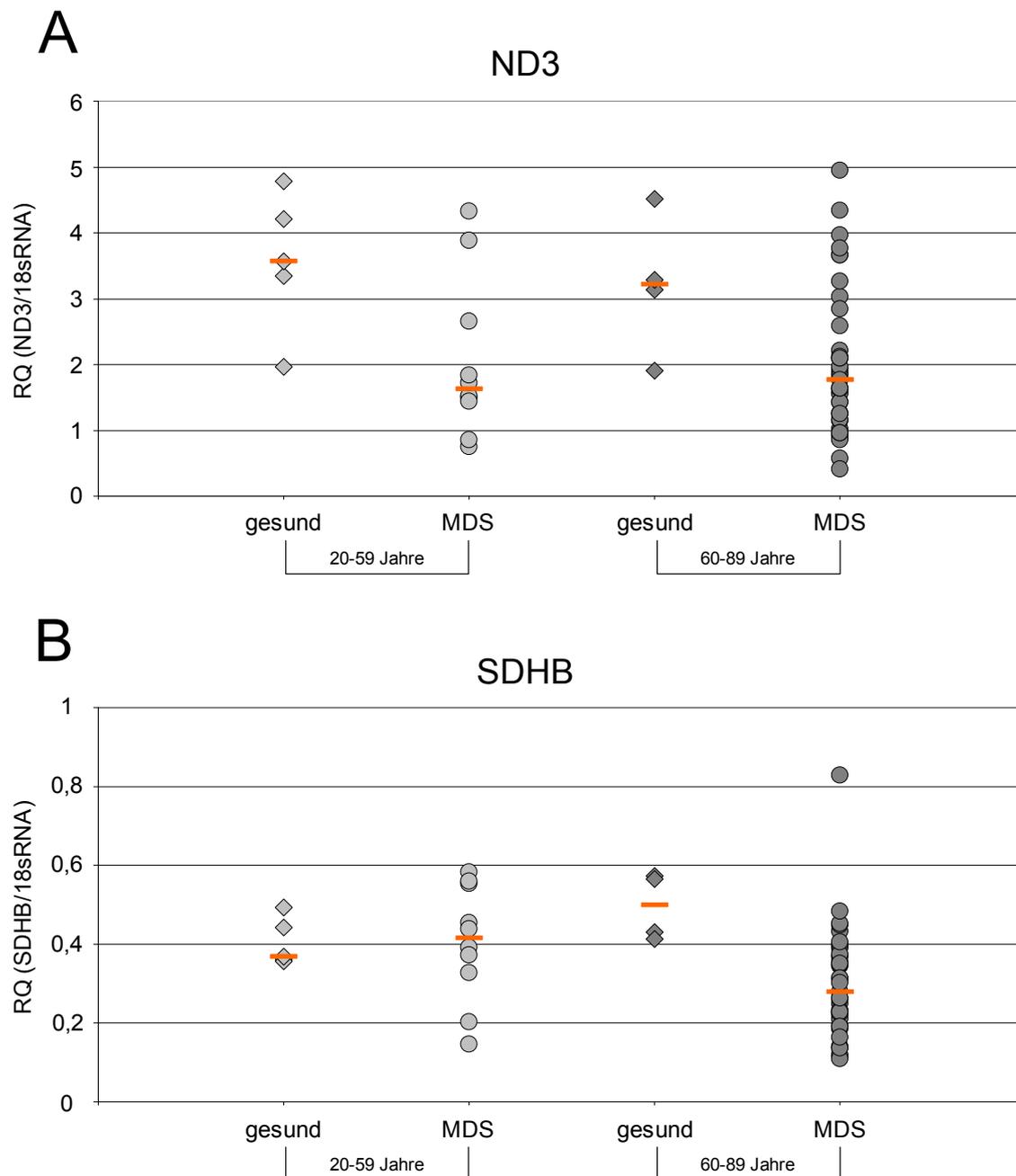
## 2.5. Vergleich der Genexpression in verschiedenen Altersgruppen

Die aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten wurden weiterhin nach Altersgruppen ausgewertet, wobei eine Einteilung in eine jüngere (20-59 Jahre) und eine ältere (60-89 Jahre) Gruppe, vorgenommen wurde, da MDS-Erkrankungen hauptsächlich ab dem 60. Lebensjahr auftreten. So sollte überprüft

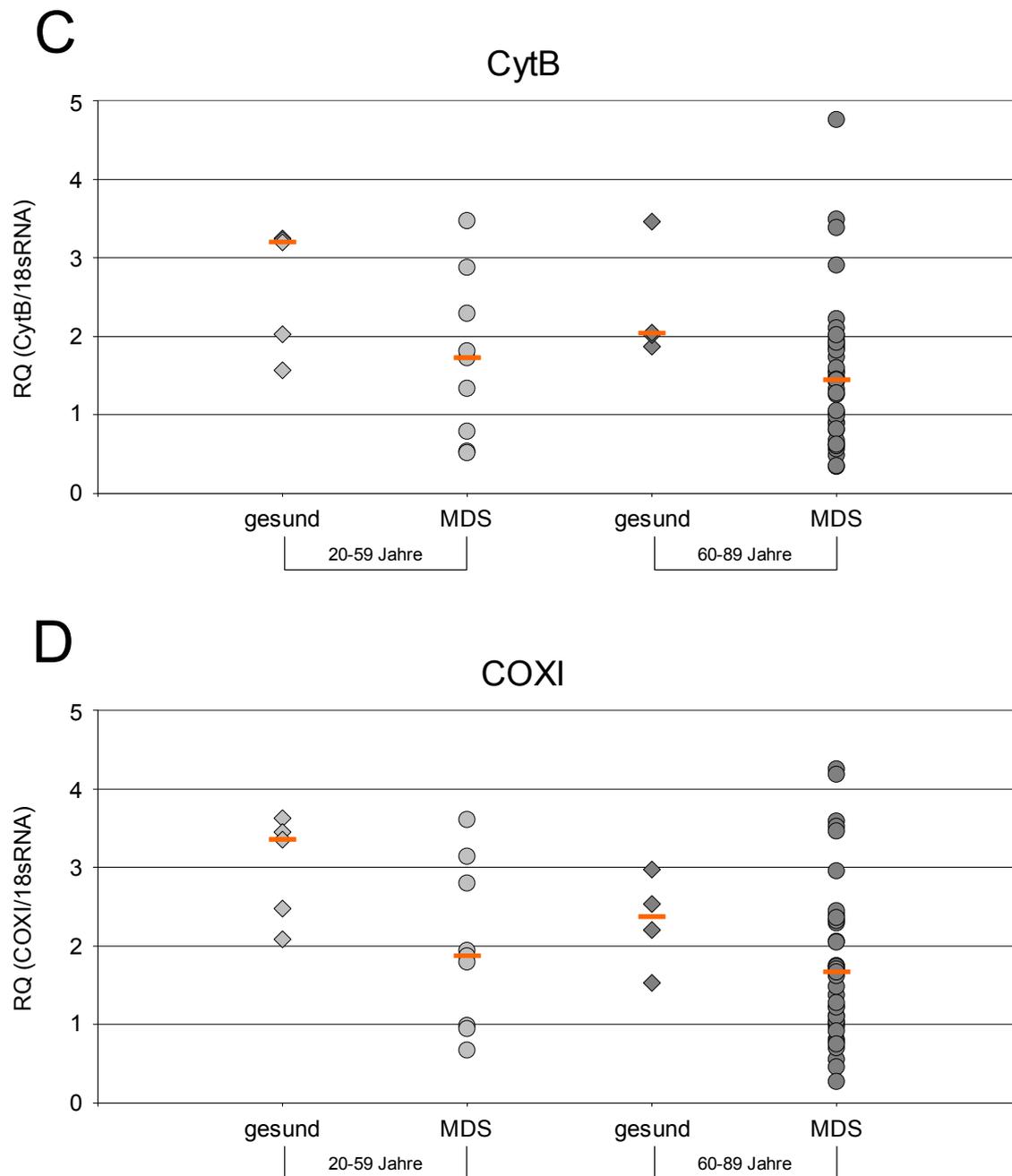
werden, ob die veränderten Genexpressionsmuster bei MDS-Patienten auf Alterungseffekte zurückzuführen sind, oder MDS-spezifisch auftreten.

Es wurden CD34<sup>+</sup>-Zellen aus Knochenmarkaspiraten isoliert und die Gesamt-RNA extrahiert. Mittels one step real time RT-PCR wurde die Expression der Gene ND3, SDHB, CytB und COXI relativ zur Expression der 18sRNA quantifiziert (RQ). Bei allen Auswertungen wurde der Median bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz überprüft. Verglichen wurde ein Kollektiv von 5 jungen und 4 alten gesunden Spendern mit 10 jungen und 41 alten MDS Patienten. Beim Vergleich der Altersgruppen wurde deutlich, dass bereits bei den jungen MDS-Patienten eine verminderte Transkript-Menge der mitochondrial kodierten Untereinheiten vorliegt, die mit zunehmendem Alter noch weiter reduziert wird (**Abb. 3.9. A, C u. D**). Auffällig ist, dass sich bei den mitochondrial kodierten Genen ausschließlich im Fall von ND3 keine altersabhängige Änderung der Genexpression findet (**Abb. 3.9. A**). Daher kann man die Reduktion der ND3-Transkriptmenge nahezu vollständig auf einen, noch im Detail zu untersuchenden, MDS-Effekt zurückführen. Bei der Expression der anderen hier untersuchten mitochondrial kodierten Gene (CytB und COXI) kommt es dagegen bei gesunden Spendern zu einer deutlichen Abnahme der RNA-Menge im Alter (**Abb. 3.9. C+D**).

Neben der stark reduzierten mitochondrialen Genexpression konnte bei der Gruppe der über 60-jährigen MDS-Patienten eine ebenfalls deutliche Abnahme des kernkodierten Transkripts SDHB beobachtet werden, die bei jüngeren MDS-Patienten nicht nachweisbar war (**Abb. 3.9. B**).



**Abb. 3.9. (A+B):** Vergleich der Genexpression in  $CD34^+$ -Zellen mittels relativer Quantifizierung (RQ), wobei die Auswertung nach Altersgruppen (20-59 Jahre= jung; 60-89 Jahre= alt) erfolgte. Das Kollektiv bestand aus 5 jungen und 4 alten gesunden Spendern, sowie 10 jungen und 41 alten MDS-Patienten. Mittels real time RT-PCR wurde die Expression mitochondrialer Gene untersucht. Diese wurde auf die Expression der 18sRNA bezogen und die relativen Werte miteinander verglichen. Es wurden die Mediane (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Bei ND3 (**A**) erkennt man sowohl in der jungen Gruppe (gesund vs. MDS ( $p=0,033$ )) als auch in der Gruppe der alten Menschen eine stark verringerte Transkriptmenge bei den MDS-Patienten. Die Genexpression von SDHB (**B**) sinkt dagegen nur bei den alten MDS-Patienten (gesund vs. MDS ( $p=0,023$ )).



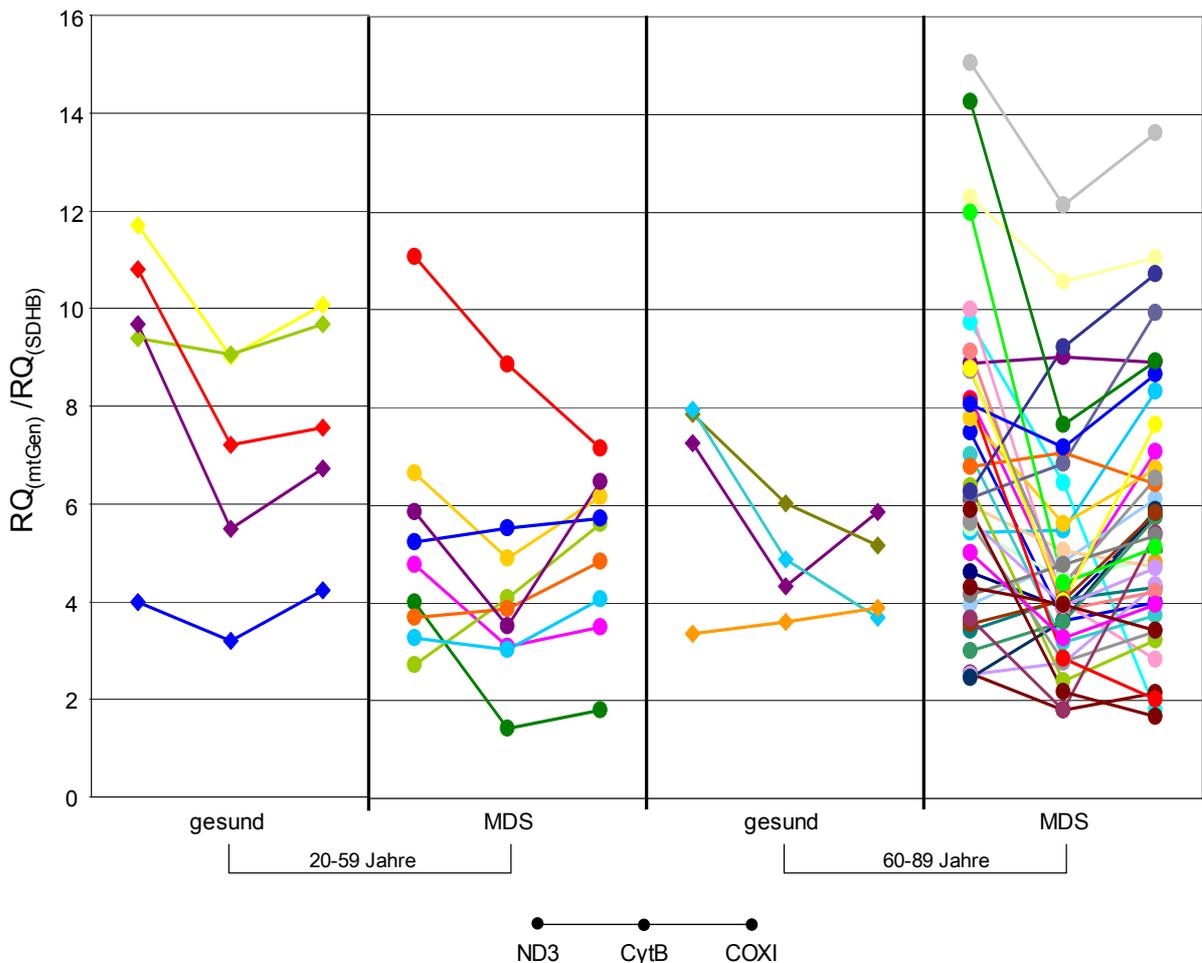
**Abb. 3.9. Fortsetzung (C+D):** Vergleich der Genexpression in  $CD34^+$ -Zellen mittels relativer Quantifizierung (RQ), wobei die Auswertung nach Altersgruppen (20-59 Jahre= jung; 60-89 Jahre= alt) erfolgte. Mittels real time RT-PCR wurde die Expression mitochondrialer Gene untersucht. Diese wurde auf die Expression der 18sRNA bezogen und die relativen Werte miteinander verglichen. Es wurden die Mediane (—) bestimmt und mittels Student's T-Test die Signifikanz der Ergebnisse überprüft. Auch die Genexpressionen von Cyt B (**C**) und COXI (gesund jung vs. MDS jung ( $p=0,045$ )) (**D**) zeigen in beiden Altersgruppen eine verminderte Expressionsrate bei MDS-Patienten verglichen mit gesunden Spendern. Zusätzlich fällt bei den mitochondrial kodierten Genen CytB und COXI auf, dass bereits eine altersbedingte Abnahme der Transkriptmenge vorliegt, die bei ND3 (**A**) nicht zu beobachten ist.

Um zu überprüfen, ob es im Rahmen der reduzierten mitochondrialen Genexpression bei der MDS-Erkrankung zu einer stöchiometrischen Veränderung der mRNA-Spezies kommt, wurden die relativen Genexpressionswerte der mitochondrial kodierten Atmungskettenuntereinheiten ND3, CytB und COXI ins Verhältnis zu der kernkodierten Untereinheit SDHB gesetzt ( $RQ_{mtGen}/RQ_{SDHB}$ ) (Abb. 3.10. A). Hierbei stellte sich heraus, dass bei den MDS-Patienten diese Quotienten individuell deutliche Unterschiede aufwiesen.

Bei den gesunden Spendern verminderte sich die Menge der mitochondrial kodierten Transkripte in Relation zu SDHB mit steigendem Alter. Eine noch stärkere Verringerung der mitochondrial kodierten Transkripte im Verhältnis zur kernkodierten Untereinheit ließ sich bei den jungen MDS-Patienten erkennen. Bei den über 60-jährigen MDS-Patienten war eine breite Variabilität bezüglich der jeweiligen Verhältnisgrößen ( $RQ_{mtGen}/RQ_{SDHB}$ ) zu beobachten. Beispielsweise lagen sie für den Quotienten ND3:SDHB in dieser Gruppe zwischen 2,5 und 10, während sie in der jüngeren gesunden Gruppe mit einer Ausnahme zwischen 9 und 12 lagen. Auch in der älteren Gruppe der Gesunden variierte die Verhältnisgröße ND3:SDHB mit einer Ausnahme kaum (zwischen 7 und 8) (Abb. 3.10. A). Betrachtet man die Quotienten CytB:SDHB und COXI:SDHB, ist im Vergleich zu den Kontrollen eine besonders auffällige interindividuelle Varianz bei den älteren MDS-Patienten zu erkennen (CytB: zwischen 1,8 und 12; COXI: zwischen 1,7 und 13,6). Bei einigen älteren MDS-Patienten kommt es darüber

hinaus auch zu auffälligen Unterschieden im Verhältnis der mitochondrial kodierten Transkripte zueinander.

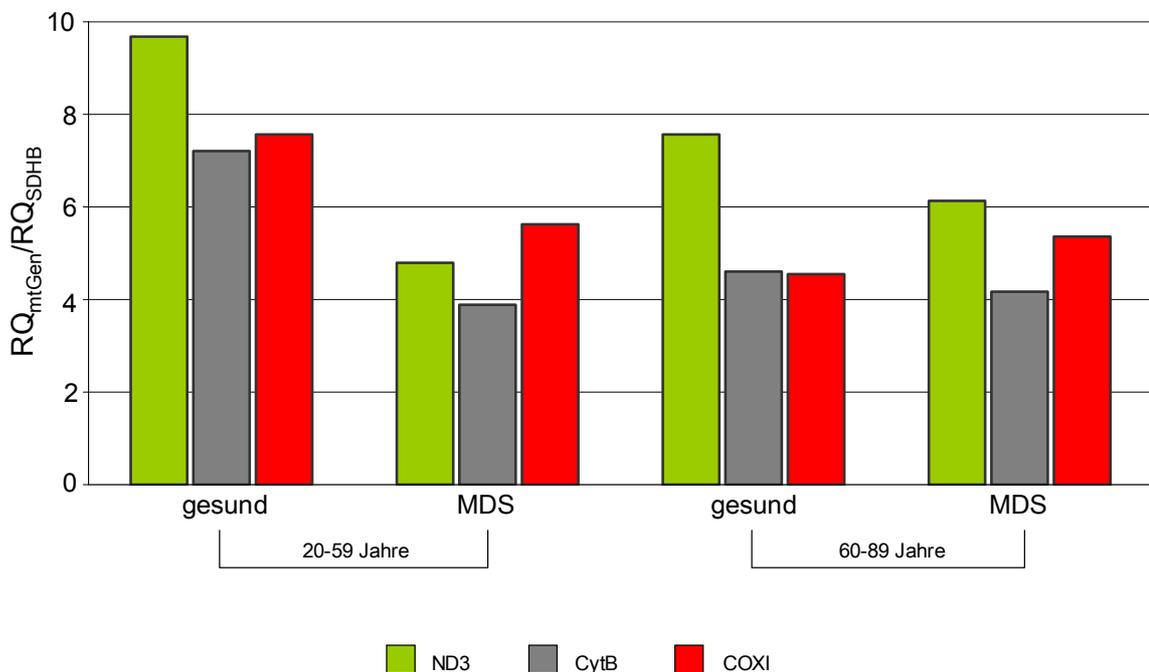
A



**Abb. 3.10. A:** Transkriptmenge der mitochondrial kodierten Untereinheiten ( $RQ_{mtGen}$ ) in Relation zur kernkodierten Untereinheit SDHB ( $RQ_{SDHB}$ ). Bei den MDS-Patienten kommt es beim Quotienten ND3:SDHB zu deutlichen interindividuellen Unterschieden (jung = zwischen 2,5 und 6,7; alt = zwischen 2,5 und 10). Diese interindividuellen Unterschiede sind bei den Gesunden weniger stark ausgeprägt (jung = zwischen 9 und 12; alt = zwischen 7 und 8). Bei den Genen CytB und COXI findet man dagegen lediglich bei den alten MDS-Patienten eine deutliche Varianz innerhalb der jeweiligen Verhältnisgrößen. CytB:SDHB (gesund jung = zwischen 3 und 9; MDS jung = zwischen 1,4 und 5,5; gesund alt = zwischen 3,6 und 6; MDS alt = zwischen 1,8 und 12) und COXI:SDHB (gesund jung = zwischen 4 und 10; MDS jung = zwischen 1,8 und 7,1; gesund alt = zwischen 3,7 und 5,8; MDS alt = zwischen 1,7 und 13,6).

In den einzelnen Gruppen liegen offensichtlich deutliche interindividuelle Unterschiede vor. Beim Vergleich der Mediane der jeweiligen Verhältnisse von ND3, CytB und COXI zu SDHB stellte sich heraus, dass sich das Verhältnis von ND3 zu SDHB zwischen Gesunden und MDS-Patienten am stärksten unterscheidet (**Abb. 3.10. B**).

B



**Abb. 3.10. B:** Transkriptmenge (Mediane) der mitochondrial kodierten Untereinheiten ( $RQ_{mtGen}$ ) in Relation zur kernkodierten Untereinheit SDHB ( $RQ_{SDHB}$ ). Beim Vergleich von ND3, CytB und COXI, jeweils in Relation zu SDHB, fällt auf, dass der größte Unterschied zwischen Gesunden und MDS-Patienten die Verhältnisgröße ND3:SDHB betrifft. Außerdem ist zu erkennen, dass es bei den Gesunden lediglich altersbedingt zu einer Verringerung sämtlicher mtDNA-kodierten Untereinheiten im Verhältnis zu SDHB kommt, während sich bei den MDS-Patienten zusätzlich die Quotienten von COXI:SDHB und CytB:SDHB gegeneinander verschieben.

Darüber hinaus ist zu erkennen, dass es bei den MDS-Patienten zu einer Änderung der Verhältnisgrößen von COXI:SDHB in Relation zu CytB:SDHB

kommt. Während bei den Gesunden die mRNA-Menge zwischen CytB und COXI bezogen auf SDHB ähnlich ist, ändert sich bei den MDS-Patienten dieser Quotient zugunsten von COXI:SDHB. Dieses Ungleichgewicht könnte zu einer Funktionsstörung der mitochondrialen Atmungskette führen und damit zu den pathophysiologischen Prozessen der MDS-Erkrankung beitragen.

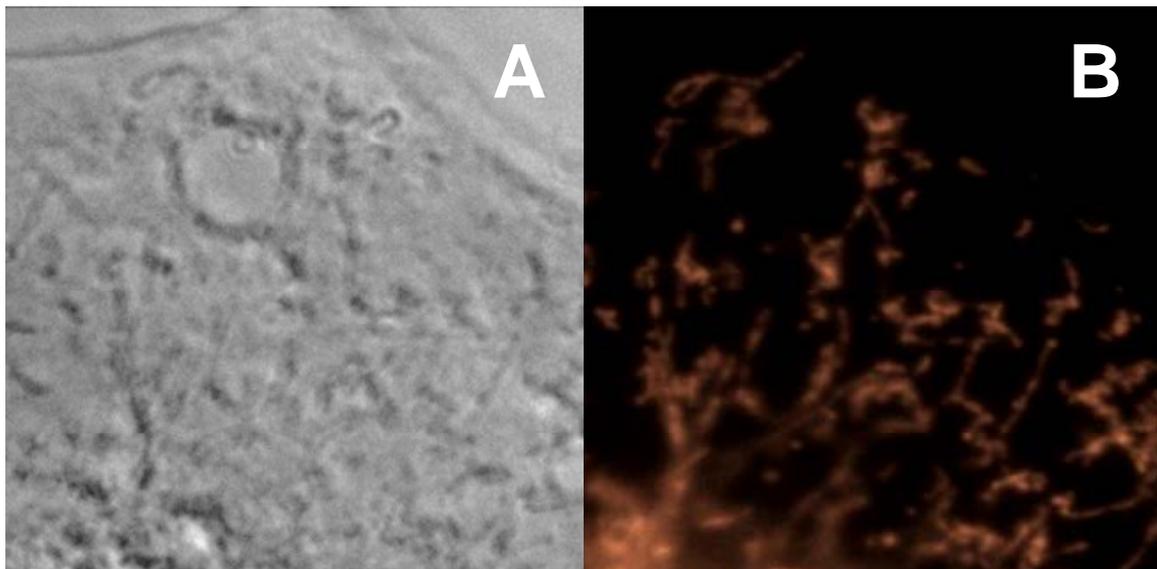
### **3. Etablierung der Mitochondrienisolierung für Proteomanalysen**

Da im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte (**siehe Kapitel III.2.**), dass es in CD34<sup>+</sup>-Zellen MDS-Patienten zu einem Ungleichgewicht im mitochondrialen Transkriptom kommt, ist es nahe liegend, die Auswirkungen in CD34<sup>+</sup>-Zellen auf mitochondrialer Proteinebene zu untersuchen.

Die Untersuchung des mitochondrialen Proteoms, insbesondere bei Patienten mit vermuteten Defekten im mitochondrialen Stoffwechsel, ermöglicht evtl. neue Ansatzpunkte für das pathophysiologische Verständnis und für pharmakologische Interventionen. Zur Analyse des Mitochondrienproteoms ist die Isolierung reiner Mitochondrien wichtig, da Proteine anderer Zellkompartimente mit der Analyse empfindlich interferieren könnten. Bislang erfolgt die Reinigung von Mitochondrien meist über Dichtegradienten und Ultrazentrifugation. Diese Methoden sind zeitaufwändig und erfordern große Probenmengen, die aus Knochenmarkaspiraten von MDS-Patienten nicht gewonnen werden können. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die hier beschriebene Methode zur

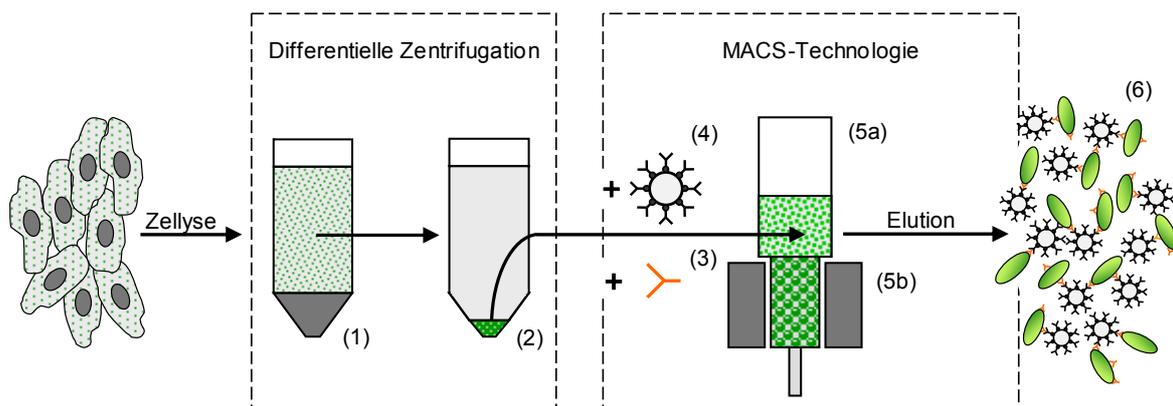
Isolierung reiner Mitochondrien aus kleinen Probenvolumina entwickelt (**Abb. 3.12.**).

Für die Etablierung der Methode wurden Zellen der Linie H196 verwendet. Diese Zellen sind auf Zellen der Linie HT1080 zurückzuführen, die von Ilaria Dalla Rosa (AG Prof. Dr. Boege, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) stabil mit einem an eine mitochondriale Signalsequenz gekoppelten YF-Protein (YFP) transfiziert wurden. Das YFP befindet sich in der mitochondrialen Matrix.



**Abb. 3.11.:** Detektion der Mitochondrien in HT1080 Zellen mit MAB1273. Um die Bindung des anti-Mitochondrien Antikörpers MAB1273 für spätere Immunpräzipitationen zu überprüfen, wurden konfluent gewachsene Zellen der Linie HT1080 mit 200  $\mu$ l (1:500 verd.) Antikörperlösung für 1h bei 37°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen wurde der gebundene mAK MAB1273 mit 200  $\mu$ l eines Cy3 gekoppelten anti-Maus AK (1:1000 verd.) detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss). Man kann erkennen, dass es zu einer spezifischen Bindung des Antikörpers an die Mitochondrien kommt; **(A)** zeigt den Phasenkontrast und **(B)** die Fluoreszenz.

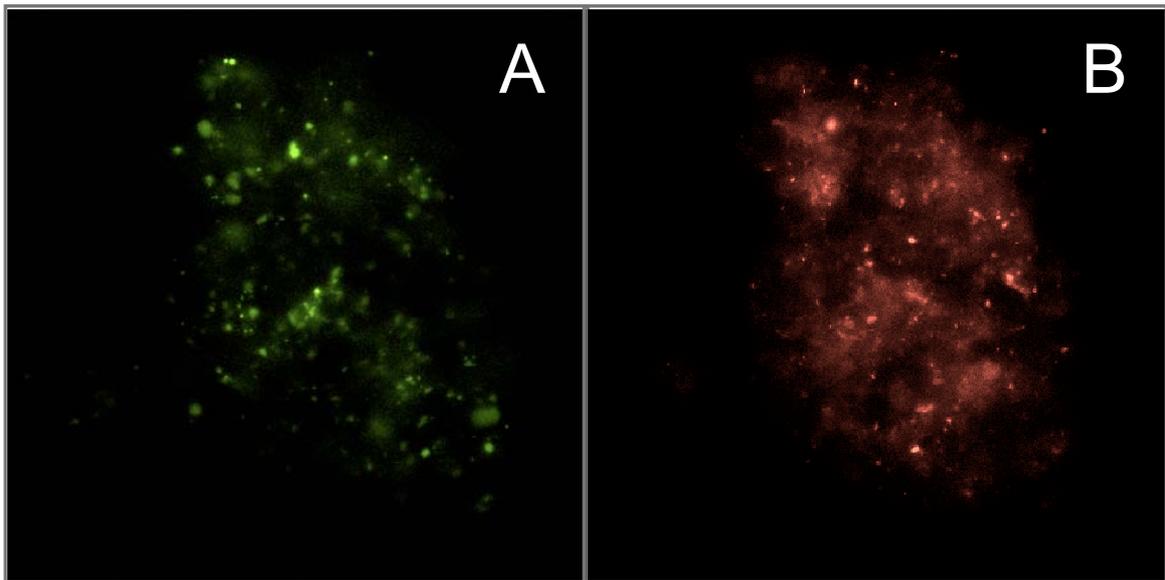
Zunächst wurde überprüft, ob der monoklonale anti-Mitochondrien Antikörper MAB1273 (Chemicon) an die Mitochondrien bindet. Um dieses zu untersuchen, wurden konfluent gewachsen Zellen für eine Stunde mit 100  $\mu\text{l}$  Antikörper (1:500 verd.) inkubiert. Anschließend wurde der gebundene Antikörper mit einem Cy3-gekoppelten anti-Maus mAK detektiert. Da eine spezifische Bindung von MAB1273 gezeigt werden konnte (Abb.3.11.), wurde als nächstes überprüft, ob MAB1273 für die Präzipitation von Mitochondrien eingesetzt werden kann (Abb.3.12.).



**Abb. 3.12.:** Mitochondrienisolierung mittels Immunpräzipitation. Zellen ( $2 \times 10^7 - 5 \times 10^5$ ) werden lysiert, und mittels Zentrifugation wird die Debris (1) abzentrifugiert. Der Überstand wird in einem weiteren Zentrifugationsschritt eingesetzt und ein grobes Mitochondrienpellet (2) generiert. Das Pellet wird mit 100  $\mu\text{l}$  MAB1273 (1:20 verd.) (3) bei 4°C für 1h inkubiert. Die Suspension wird anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  anti-Maus IgG MACS-Beads (4) gemischt, auf 250  $\mu\text{l}$  mit PBS aufgefüllt und bei 4°C für 1h inkubiert. Die Probe wird dann mit PBS auf 1 ml aufgefüllt und auf eine vorbereitete MS-Säule (5a) in einem Separator (5b) gegeben. Nach einem Waschschrift werden die Mitochondrien (6) von der Säule eluiert.

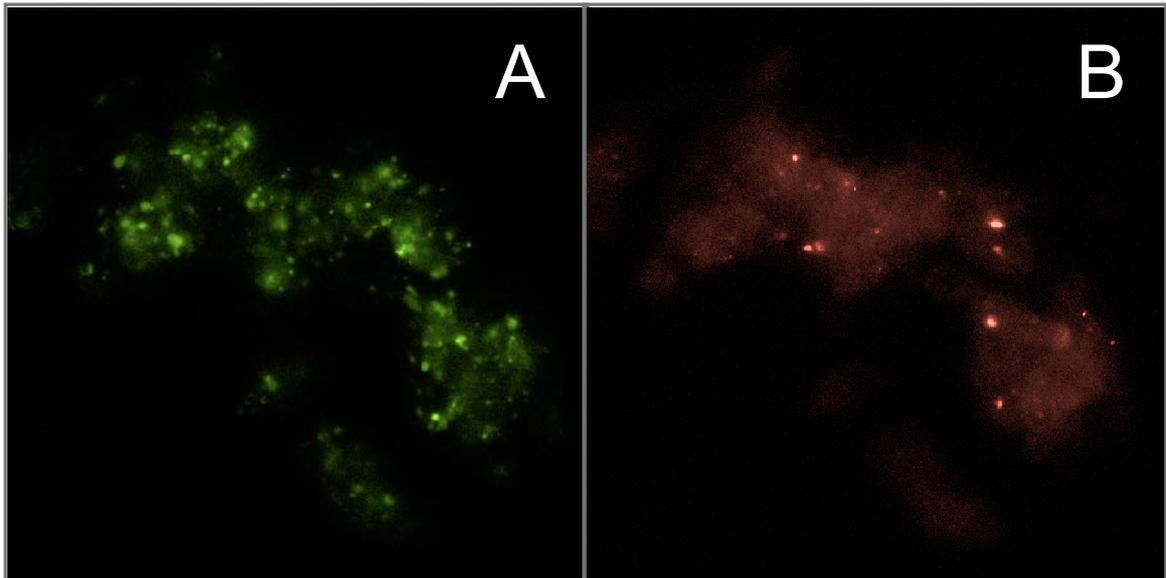
Zunächst wurde ein grobes Mitochondrienpellet mittels des *Mitochondria Isolation Kits* (PerBio) und differentieller Zentrifugation gewonnen. Nach der Zellyse wurden zunächst Zellkerne und Debris aus der Probe entfernt und anschließend die im Überstand befindlichen Mitochondrien sedimentiert. Diese groben Mitochondrienpellets wurden in MAB1273-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen resuspendiert und für 1h bei 4°C inkubiert.

Die höchste Ausbeute wurde mit 100 µl MAB1273 (1:20 verd.) erzielt. Gemischt wurde die Mitochondriensuspension mit 100 µl MACS-Beads, auf 250 µl aufgefüllt und für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die mit PBS auf 1 ml aufgefüllte Probe auf eine MACS-Säule gegeben. Der Durchfluß wurde wie oben beschrieben noch ein weiteres Mal auf die Säule gegeben. Zuletzt wurden die gewaschenen Mitochondrien von der Säule eluiert (**Abb. 3.12.**). Da die Mitochondrien der H196-Zellen aufgrund des exprimierten YFP grün fluoreszieren, konnte die Effizienz der Mitochondrienreinigung mittels Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Um die Integrität der Mitochondrien nach der Isolation zu untersuchen, wurden H196-Zellen mit 200 nM CMXRos (Molecular Probes) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei diesem Farbstoff handelt es sich um ein Derivat von X-Rosamin, das in aktiven Mitochondrien akkumuliert. Nach der Isolation wurden die Mitochondrien unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (**Abb. 3.13.**) und die Effizienz der Isolation anhand der YFP-Fluoreszenz überprüft.



**Abb. 3.13.:** Inkubation von Zellen der Linie H196 mit CMXRos vor der Mitochondrienisolation. Die Zellen werden mit 200 nM CMXRos für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei der Farbstoff in den aktiven Mitochondrien akkumuliert. Nach der Isolation wird die Effizienz der Isolation mittels YFP-Fluoreszenz (**A**) und die Mitochondrienintegrität mittels CMXRos-Fluoreszenz (**B**) überprüft. Es ist evident, dass die Mitochondrien intakt bleiben. Die Auswertung erfolgte mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss).

Die Integrität der Mitochondrien konnte mittels CMXRos-Fluoreszenz bestimmt werden, da intakte Mitochondrien den Farbstoff nicht verlieren. Es zeigte sich, dass die Mitochondrien während der Prozedur intakt bleiben (**Abb. 3.13.**). Zusätzlich sollte geprüft werden, ob die Mitochondrien auch nach der Isolation metabolisch aktiv bleiben. Hierfür wurden die Mitochondrien zuerst aus den H196 Zellen separiert und anschließend für 10 Minuten mit 200 nM CMXRos bei RT inkubiert (**Abb. 3.14**). Die Auswertung fand wiederum mittels Fluoreszenzmikroskopie statt und zeigte, dass die Mitochondrien auch nach der Isolation aktiv waren.



**Abb. 3.14.:** Inkubation von Mitochondrien mit CMXRos nach der Isolierung. Die isolierten Mitochondrien werden mit 200 nM CMXRos für 10 Minuten bei RT inkubiert, wobei der Farbstoff in den aktiven Mitochondrien akkumuliert. Nach der Isolation wird die Effizienz der Isolation mittels YFP-Fluoreszenz (**A**) und die Mitochondrienaktivität mittels CMXRos-Fluoreszenz (**B**) überprüft. Da es auch nach der Separation zu einer Akkumulation von CMXRos kommt, kann davon ausgegangen werden, dass die Mitochondrien während der Isolierung aktiv bleiben. Die Auswertung erfolgte mit dem Axiovert 100 Mikroskop (Zeiss).

Anschließend wurde anhand von Verdünnungsreihen festgestellt, dass aus  $5 \times 10^5$  Zellen ausreichend viele Mitochondrien gewonnen werden konnten, um diese fluoreszenz-mikroskopisch nachzuweisen. Diese Zellzahl entsprach der realistisch zu gewinnenden Menge an CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von MDS-Patienten. Man kann diese Methode also anwenden, um aus kleinen Probenvolumina gereinigte, intakte und aktive Mitochondrien zu gewinnen. Die Methode kann somit, die Entwicklung geeigneter hochsensitiver Analysemethoden vorausgesetzt, eingesetzt werden, um das mitochondriale Proteom z.B. in CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von MDS-Patienten zu untersuchen.

## IV. Diskussion

Die myelodysplastischen Syndrome sind klonale Erkrankungen des Knochenmarks, die vorwiegend in höherem Lebensalter auftreten. Ihre Inzidenz liegt bei etwa 5 pro 100.000 pro Jahr. Ab dem 70. Lebensjahr steigt die Inzidenz auf mehr als 30 pro 100.000. Im Hinblick auf die zunehmend alternde Bevölkerung in den Industrieländern wird sich die Zahl der MDS-Erkrankungen in Zukunft erhöhen.

Es gibt verschiedene Hinweise auf eine mitochondriale Beteiligung an den myelodysplastischen Syndromen (siehe I.2.). Defekte in Mitochondrien führen zu unterschiedlichen Krankheiten (Kadowaki, 1994; DiMauro & Schon, 2003), da diese Zellorganellen an wichtigen zellulären Prozessen (z.B.: ATP-Synthese, Apoptose, Hämsynthese) beteiligt sind. Mutationen der mtDNA können zu einer ineffizienten mitochondrialen Atmungskette und daraus resultierend zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen führen, was wiederum eine Schädigung der betroffenen Zelle bewirkt. Ausgehend von der Hypothese, dass Defekte der mitochondrialen Atmungskette zur Pathogenese von MDS beitragen, wurden in unserer Arbeitsgruppe hämatopoietische Zellen aus Knochenmark von MDS-Patienten auf Mutationen der mtDNA-Moleküle untersucht. Dabei wurden keine spezifischen „hot spots“ identifiziert (Wulfert *et al.*, zur Publikation eingereicht), was sich möglicherweise dadurch erklären lässt, dass

unterschiedliche Mutationen der mtDNA zum selben Phänotyp führen können, da sie letzten Endes eine defekte Atmungskette zur Folge haben. Dass Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung darüber hinaus eine schlechte Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp aufweisen ist, bereits länger bekannt (Wallace, 1993; Lin & Beal, 2006; Hall & Unwin, 2007).

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst das mitochondriale Proteom der CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen aus Knochenmarkaspiraten von MDS-Patienten im Hinblick auf Alters- und MDS-bedingte Veränderungen untersucht werden. Für die Untersuchung des Mitochondrienproteoms ist die Isolierung reiner Mitochondrien wichtig, da andere Zellkompartimente (Lysosomen, Peroxysomen) die Analyse empfindlich stören können. Bislang erfolgt die Reinigung meist über Dichtegradienten und Ultrazentrifugation (Da Cruz *et al.*, 2005). Diese Separationsmethoden für Zellorganellen benötigen große Probenmengen, die mit Knochenmarkaspiraten nicht erreicht werden, da lediglich 1% des Knochenmarks aus CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen besteht. Daher wurde hier eine Methode weiterentwickelt, die fraktionelle Zentrifugation und spezifische indirekte Immunpräzipitation mittels magnetischer Separation verbindet. Entgegen einer früheren Arbeit der Arbeitsgruppe um Herrstadt (1999), in der der Erfolg der Mitochondrienseparation mittels DynaBeads anhand von spezifischen PCR-Produkten mitochondrial kodierter Gene überprüft wurde, wurde hier die MACS-Technologie für die Immunpräzipitation eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit

konnte die Effizienz der Methode und die Integrität der Mitochondrien durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Dabei war es möglich, die für die Gewinnung intakter Mitochondrien benötigte Zellzahl auf  $5 \times 10^5$  Zellen zu reduzieren, die der realistisch zu gewinnenden Menge an CD34<sup>+</sup>-Zellen aus MDS-Knochenmarkaspiraten entspricht, für umfassende Proteomanalysen aber keine ausreichende Materialmenge darstellt.

So benötigten Burri *et al.* (2006) für die Analyse integraler Membranproteine der äußeren Mitochondrienmembran aus *Saccharomyces cerevisiae* Hefezellen einer 30 Liter Kultur. In weiteren Studien wurden für mitochondriale Proteomanalysen meist Muskeln, Herzen und Lebern von Mäusen, Ratten und Rindern verwendet (Fandino *et al.*, 2005; Forner *et al.*, 2006; Kiri *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006), was die durchschnittliche Probenmenge aus MDS-Knochenmarkaspiraten von  $3 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  Zellen um ein Vielfaches übersteigt. Des Weiteren gibt es bislang keine Analysemethoden, die sensitiv genug wären, um das Proteom derart kleiner Probenmengen umfassend zu untersuchen. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob man ausreichend große Mengen an Ausgangsmaterial gewinnen kann, um gleichzeitig verschiedene biochemische und proteinanalytische Methoden für die Proteomanalyse zum Einsatz zu bringen. Die Arbeitsgruppe von van Eyk (2006) hat in diesem Zusammenhang die Methode der 2-DLC, der 1-DLC und der 2-DE miteinander verglichen (McDonald *et al.*, 2006) und dabei festgestellt, dass lediglich 7% aller identifizierten Proteine mit allen drei Methoden detektiert werden konnten.

In Zukunft eignet sich, die Entwicklung ausreichend sensitiver Analysemethoden vorausgesetzt, die in der vorliegenden Arbeit etablierte Methode zur Mitochondrienisolierung, um intakte und reine Mitochondrien aus kleinen Probenmengen für Proteomanalysen zu separieren. Bei Patienten mit Defekten im mitochondrialen Stoffwechsel könnten somit Ansatzpunkte für pharmakologische Interventionen identifiziert und damit die Etablierung spezifischer Therapien ermöglicht werden.

Um die Hypothese zu überprüfen, dass eine auf Mutationen der mtDNA beruhende Ineffizienz der Atmungskette zur Pathogenese von MDS beitragen könnte, wurde die Enzymaktivität der Cytochrom-c-Oxidase im Vergleich zur ausschließlich kernkodierten Succinatdehydrogenase in CD34<sup>+</sup> Progenitorzellen von MDS-Patienten und gesunden (freiwilligen) Spendern untersucht. Hierfür wurden im Rahmen dieser Arbeit enzymatische Färbungen der beiden Atmungskettenkomplexe, die u.a. für Gewebeschnitte publiziert sind (Litwin & Furgal, 1990; Boerian *et al.*, 1991; Taylor *et al.*, 2003), für hämatopoietische Vorläuferzellen etabliert.

Obwohl interindividuell unterschiedlich intensive Färbereaktionen auftraten, war kein quantifizierbarer Unterschied zwischen den CD34<sup>+</sup>-Zellen gesunder Spender und den CD34<sup>+</sup>-Zellen von MDS-Patienten zu erkennen. Über die Menge der Atmungskettenkomplexe II und IV sowie deren Funktionalität in CD34<sup>+</sup> hämatopoietischen Progenitorzellen erlaubten die enzymatischen Färbungen

keine genauere Aussage. Diese immunhistochemischen Färbungen werden für die Diagnostik von COX-negativen und SDH-positiven Zellen verwendet (Tanji & Bonilla, 2001, Taylor *et al.*, 2003), aber nur schwerwiegende Defekte des Komplex IV können mit dieser Methodik detektiert werden (Schmiedel *et al.*, 2003). Auch gravierende Defekte können in hämatopoietischen Stammzellen möglicherweise nur schwer detektiert werden, da diese vorwiegend in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase ruhenden Zellen im Stande zu sein scheinen, ihren geringen Energiebedarf größtenteils durch anaeroben Metabolismus zu decken (Piccoli *et al.*, 2005). In ihren Untersuchungen über den Sauerstoffverbrauch von hämatopoietischen Stammzellen konnten Piccoli und Mitarbeiter zeigen, dass diese Zellen neben einem zehnfach geringeren mitochondrialen Sauerstoffverbrauch auch eine wesentlich kleinere Menge an Atmungskettenkomplexen, verglichen mit anderen Zelltypen, aufweisen. Weiterhin zeigte sich auf Proteinebene, dass die Stöchiometrie der Enzymkomplexe der CD34<sup>+</sup>-Zellpopulation verglichen mit HepG2-Zellen (Leberzellen) ähnlich war (Piccoli *et al.*, 2005). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Stöchiometrie der Atmungskettenuntereinheiten von MDS-Patienten und Gesunden auf Transkriptionsebene miteinander verglichen. Dabei ergab sich eine veränderte Stöchiometrie der mitochondrial kodierten Atmungsketten-untereinheiten in Relation zur kernkodierten Untereinheit SDHB (Abb. 3.10. A+B; siehe S. 91).

Hinsichtlich der enzymatischen Färbungen ergaben sich auffällige Befunde bei einer 80-jährigen, zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme unbehandelten, MDS-Patientin. Hier waren in einigen Zellen sowohl in den positiven Färbungen als auch in den Negativkontrollen ungewöhnliche intrazelluläre Strukturen zu erkennen. Aufgrund der Struktur und Anzahl könnte es sich hierbei um Chromosomen handeln, zumal real time PCRs zur Detektion von Bakterien- oder Pilzbefall negativ blieben. Allerdings stellt sich die Frage, warum es zum Umsatz der Farbstoffe durch Chromosomen kommen sollte.

Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus verschiedenen Arbeiten, die sich mit der nicht-enzymatischen Glykosylierung von Aminen beschäftigen. So konnte die Arbeitsgruppe um Mironova zeigen, dass es unter physiologischen Bedingungen in *E.coli* zu einer nicht-enzymatischen Glykosylierung von Proteinen kommt (Mironova *et al.*, 2005). Die so entstehenden Amadoriprodukte können NBT reduzieren und auf diese Weise photometrisch nachgewiesen werden. Die entstehenden Endprodukte akkumulieren in langlebigen Proteinen von diabetischen und urämischen Patienten, sowie mit zunehmender Lebensdauer auch bei Gesunden (Ulrich & Cerami, 2001). Die zu Grunde liegende, ursprünglich von Maillard beschriebene gleichnamige Reaktion (Maillard, 1913) bezeichnet die nicht-enzymatische Reaktion von Aminosäuren und reduzierenden Zuckern; es wurde aber gezeigt, dass diese Reaktionen auch zwischen anderen *in vivo* entstehenden Carbonylen einerseits und biologischen Aminen (z.B. DNA) andererseits erfolgen kann (Bucala *et al.*, 1984; Bucala *et al.*, 1993). Diese

Reaktionen führen zur Vernetzung von Nukleotiden sowie zur Depurinierung und Zerstörung des Phosphatrückgrats der DNA (Kasai *et al.*, 1998; Pischetsrieder *et al.*, 1999), was zu Mutationen mit carcinogenem Effekt führen könnte. Trotz dieser Hinweise wurden, abgesehen von *E.coli* (Mironova *et al.*, 2005), bislang noch keine nicht-enzymatischen Glykosylierungsprodukte von chromosomaler DNA *in vivo* nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich bei den hier beobachteten intrazellulären Strukturen der unbehandelten Patientin um solche modifizierten Chromosomen. Um zu überprüfen, ob sich der hier diskutierte Befund verifizieren lässt, wäre es daher notwendig, die NBT-Färbungen im Rahmen einer erweiterten Untersuchung von CD34<sup>+</sup>-Zellen bei anderen unbehandelten MDS-Patienten durchzuführen.

Da die Enzymkomplexe der Atmungskette sowohl aus nukleär kodierten als auch aus mitochondrial kodierten Untereinheiten bestehen, ist eine Interaktion der beiden Genome erforderlich, um Ungleichgewichte zwischen nukleärer und mitochondrialer Genexpression sowie daraus resultierende Veränderungen in der Stöchiometrie der mitochondrialen Atmungskettenuntereinheiten zu vermeiden, die zu einer zellulären Dysfunktion führen können (Ross, 2004). Bislang ist nicht bekannt, ob es bei MDS zu einem Ungleichgewicht der Atmungskettenuntereinheiten kommt. Für Proteomanalysen aus CD34<sup>+</sup>-Zellen aus MDS-Patienten standen nicht genug Material und darüber hinaus keine ausreichend sensitiven Analysemethoden zur Verfügung (s.o.); daher wurde die Expression

Atmungsketten-relevanter Gene hämatopoietischer Stammzellen aus Knochenmarkspiraten von gesunden Spendern und MDS-Patienten auf Transkriptionsebene miteinander verglichen.

Da es bei MDS aufgrund vermuteter Defekte der mitochondrialen Atmungskette zu einer Akkumulation von  $\text{Fe}^{3+}$  in den Mitochondrien und damit zu einem gestörten Eisenmetabolismus kommt, wurde die Expression von Untereinheiten der Elektronentransportkette mit FeS-Zentren (ND3 aus Komplex I und SDHB aus Komplex II) oder Hämgruppen (CytB aus Komplex III und COX I aus Komplex IV) untersucht.

Die Untereinheiten ND3 und CytB weisen in Säugetieren die stärkste Korrelation zwischen Varianz der Aminosäuresequenz und Lebensspanne eines Organismus auf. Dabei findet eine adaptive Selektion von Mutationen statt, die die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) minimiert (Rottenberg, 2006). Die theoretischen Berechnungen von Rottenberg werden von Daten einer japanischen Arbeitsgruppe unterstützt, die die mitochondrialen CytB-Varianten 100jähriger mit denen von Parkinson-Patienten verglichen hat. Hierbei stellte sich heraus, dass bei der Gruppe der 100jährigen kaum Aminosäureabweichungen von der Konsensussequenz vorlagen (Tanaka *et al.*, 2002). Daten der Arbeitsgruppe von J.A. Enríquez, die den Einfluß verschiedener mitochondrialer Haplotypen auf die ROS-Produktion in Zellkultur belegen, unterstützen diese Hypothese ebenfalls (Moreno-Loshuertos *et al.*, 2006).

Die an MDS erkrankten Patienten werden, ausgehend von der Zellmorphologie ihres Knochenmarks und des peripheren Bluts, gemäß WHO-Klassifikation verschiedenen Untergruppen zugeordnet (Jaffe *et al.*, 2001; Bennett & Komrokji, 2005). Da die Klassifikation der Untergruppen bislang nicht auf molekularen Markern beruht, wurden die Untergruppen in der vorliegenden Arbeit zunächst hinsichtlich ihrer Genexpressionsrate der oben aufgeführten mitochondrialen Untereinheiten untereinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass man basierend auf den in dieser Arbeit durchgeführten molekularen Analysen die einzelnen Untergruppen zu einer weitgehend homogenen MDS-Gruppe zusammenfassen kann, und sich die Gruppe der an akuter myeloischer Leukämie Erkrankten (nach vorheriger MDS-Erkrankung) bezüglich ihrer Expression nicht signifikant von den übrigen MDS-Patienten unterscheidet. Im Gegensatz dazu war die Expression der Atmungskettenuntereinheiten der MDS-Patienten gegenüber den gesunden Spendern deutlich reduziert (**Abb. 3.7.**).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen zeigten die Gruppen der RAEBI- und AML- Patienten in CD34<sup>+</sup>-Zellen sowohl eine statistisch signifikante Reduktion der mitochondrialen Genexpression als auch eine signifikante Reduktion des kernkodierten Gens SDHB ( $p < 0,05$ ). Die Arbeitsgruppe um Selak wiederum stellte fest, dass eine defiziente SDH-Aktivität zu einer Akkumulation von Succinat in den Mitochondrien führt, welches ins Zytosol transportiert wird und dort die Prolyl-Hydroxylasen (PDH) und damit auch die

Hydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  inhibiert (Selak *et al.*, 2005). Als Folge wird HIF-1 $\alpha$  nicht abgebaut und kann Gene, die die Tumorentstehung und Metastasierung begünstigen, induzieren (Kilic *et al.*, 2006) und dabei die Apoptoseneigung von Tumor- bzw. Tumovorläuferzellen verringern. Eine verringerte Apoptoseneigung beobachteten Berger *et al.* (2001) durch Messung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\psi_m$ ) auch in CD34<sup>+</sup>-Zellen von MDS-Patienten, die den blastären Gruppen RAEB, RAEB-t und sAML (FAB-Klassifikation) angehörten. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtete Abnahme der SDHB-Expression bei MDS-Patienten, vor allem in blastären Gruppen RAEBI und AML (WHO-Klassifikation), könnte zu einer Anreicherung von Succinat führen. Gemäß der Hypothese von Selak *et al.* (2005) könnte Succinat bei der Tumorprogression als Botenmolekül zwischen Mitochondrium und Zellkern dienen. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung der Succinat-Coenzym-Q-Reduktase an der Tumorentstehung liefern Mutationen u.a. im SDHB-Gen, die mit Phaeochromocytomata und Paragangliomata assoziiert sind (Maher & Eng, 2002; Baysal, 2002; Neumann *et al.*, 2004).

Bei hämatologischen Krankheiten wie z.B. Non-Hodgkin Lymphomen, Multiplem Myelom und MDS ist eine erhöhte Krankheitsinzidenz bei Männern zu beobachten (Cartwright *et al.*, 2002; Mauritzson *et al.*, 2001). Aber auch bei Erkrankungen mit mitochondrialer Beteiligung sind Männern häufiger als Frauen betroffen (Chinnery & Turnbull, 2001; Frank & Hurst, 1996). Die Gründe für die erhöhte Krankheitsinzidenz der Männer sind bislang noch ungeklärt. Dieses Phänomen

wurde jedoch auch bei Experimenten mit *Drosophila* beobachtet. So exprimierte die Arbeitsgruppe von D.M. Rand die mitochondrialen Genome verschiedener *Drosophila*-Stämme vor dem nukleären Hintergrund anderer Stämme gleicher Spezies oder anderer Spezies und untersuchte die COX-Aktivität der Individuen (Sackton *et al.*, 2003). Hierbei zeigte sich, dass bei interspezifischen Genotypen ausschließlich die Männchen unter einer verminderten COX-Aktivität litten. Die maternale Vererbung von Mitochondrien scheint somit die Evolution von Mechanismen zu verhindern, die bei männlichen Individuen eine Kompensation mitochondrialer Dysfunktion bewirken könnten. Ein mitigierender Effekt bei Frauen wiederum ist nur dann möglich, wenn man postuliert, dass es zu geschlechtsspezifischen Interaktionen von mitochondrial kodierten Genen mit nukleären Genen kommt (Rand *et al.*, 2004).

Es stellte sich bei den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsanalysen von ND3, SDHB, CytB und COXI heraus, dass es bei gesunden Menschen keine geschlechtsspezifischen Unterschiede bezüglich der Transkriptmenge gibt. Auffällig ist jedoch, dass neben der deutlich verminderten Expression dieser Gene bei MDS-Patienten die männlichen Patienten eine zusätzliche Reduktion der mitochondrialen RNA-Menge im Vergleich zu den erkrankten Frauen aufweisen. Die MDS-Erkrankung scheint folglich einen geschlechtsspezifischen Effekt zu haben, der die Expression mitochondrial

lokalisierter Proteine beeinflusst. Ein solcher Effekt könnte auf Ebene der Transkriptionsregulation hervorgerufen werden.

Die Transkriptionsregulation wiederum kann über die Methylierung von DNA erfolgen, wobei die Methylierung von Promotorregionen häufig eine Rolle bei der Regulation gewebs-spezifischer Genexpression spielt (Müller *et al.*, 2006). Das Methylierungsmuster wiederum wird parental festgelegt und darüber hinaus bei einigen Genen geschlechtsspezifisch durch genetische Prägung („imprinting“) determiniert (Swain *et al.*, 1987). Von dieser genetischen Prägung sind u.a. die Chromosomen 7 (Katz *et al.*, 1992; Hannula *et al.*, 2001), 11 (Sato *et al.*, 2006; Rossignol, 2006), 15 und 20 (Butler, 2002) betroffen, die auch mit verschiedenen zytogenetischen Untergruppen von MDS assoziiert sind (Haase, 2006). Allerdings kann es im Laufe der Differenzierung zu einer Umgestaltung der allelischen Expression kommen. Ein Beispiel hierfür ist der IGF-2 (insulin-like growth factor 2), der im Knochenmark biallelisch, im peripheren Blut hingegen ausschließlich paternal exprimiert wird (Morison *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe von Reeve führt diese Beobachtung darauf zurück, dass die biallelische Genexpression in unreifen hämatopoietischen Zellen des Knochenmarks, durch eine Veränderung des imprintings während der Differenzierung, in eine monoallelische Expression des IGF-2 in reifen Zellen des peripheren Bluts übergeht.

Eine solche monoallelische Expression von kernkodierten Genen könnte einen möglichen Regulationsmechanismus für ein stabiles Gleichgewicht zwischen Kern- und Mitochondriengenomen darstellen. Da die Enzymkomplexe der

mitochondrialen Atmungskette sowohl aus nukleär kodierten als auch mitochondrial kodierten Untereinheiten bestehen, muß eine präzise Interaktion zwischen Zellkernen und Mitochondrien sichergestellt werden (Ross, 2004). Wenn diese strikten Regulationsmechanismen im Alter nachlassen, könnte dies zu ineffizienter Mitochondrienfunktion und somit zu Alterserscheinungen führen.

Da es sich bei MDS um ein vorwiegend altersassoziiertes Krankheitsbild handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit weiterhin untersucht, inwieweit Veränderungen der mitochondrialen Genexpression bei MDS-Patienten altersbedingt sind oder auf MDS-induzierte Effekte zurückgeführt werden können.

In beiden hier zu Grunde gelegten Altersgruppen (20-59 Jahre und 60-89 Jahre; siehe Einleitung) zeigte sich ein deutlich vermindertes Atmungsketten-Transkriptom bei MDS-Patienten gegenüber gesunden Spendern. Auffällig war dabei, dass die Genexpression von CytB und COXI auch bei den Gesunden im Alter vermindert war, wohingegen sich die ND3-Expression bei den Gesunden kaum änderte. Während es sich bei der verminderten Expression von CytB und COXI daher vermutlich um einen altersbedingten Effekt handelt, der bei den MDS-Patienten verstärkt wird, scheint die reduzierte Expression von ND3 ein MDS-assoziiertes Phänomen zu sein. Daher könnte ND3 als früher diagnostischer Marker in Betracht gezogen werden. In Zukunft sollten auch die übrigen Untereinheiten (mitochondrial- und kernkodiert) des Enzymkomplexes I untersucht werden, da auch ND3-unabhängige Dysfunktionen des Komplex I zu einer

verminderten ATP-Synthese und anderen metabolischen Folgen wie Übersäuerung der Zelle durch verstärkte Glykolyse oder verstärkte ROS-Produktion führen könnten.

Verstärkte ROS-Produktion führt zu erhöhter mtDNA-Schädigung, die aufgrund entstehender Mutationen/Deletionen eine defekte Atmungskette zur Folge haben kann. In diesem Teufelskreis begünstigt eine defekte Atmungskette wiederum die Entstehung weiterer reaktiver Sauerstoffspezies. Deren Bildung wird aber auch durch nicht-Transferrin-gebundenes Eisen (NTBI) katalysiert und kann durch Gabe von Eisenchelatoren vermindert werden (Breuer *et al.*, 1997). Eine weitere Möglichkeit, ROS-bedingte Zellschädigungen einzuschränken, besteht in einer verringerten Elektroneneinspeisung in die mitochondriale Atmungskette. Dies könnte möglicherweise durch verminderte Expression der Komplex I-Untereinheiten (hier: ND3) erreicht werden.

In der Literatur ist bislang erst wenig über die Funktion und Regulation von ND3 bekannt. Eine mögliche Regulation der ND3-Expression könnte über die Thyroidhormonkonzentration erfolgen. Iglesias *et al.* konnten zeigen, dass das ND3-Gen der Ratte eine (TR)/c-erbA Bindungsstelle für den Thyroidhormon-Rezeptor enthält und es bei Hypothyroidismus zu einer Abnahme an ND3-Transkript kommt (Iglesias *et al.*, 1995).

Dass hämatopoietische Stammzellen, insbesondere aus MDS-Knochenmark, empfindlich auf Sauerstoff reagieren, zeigten auch Experimente der Arbeitsgruppe um Thompson *et al.* (2007). Diese amerikanische Arbeitsgruppe kultivierte u.a.

CD34<sup>+</sup>-Zellen von MDS-Patienten unter hypoxischen, der physiologischen O<sub>2</sub>-Spannung im Knochenmark ähnlichen, Bedingungen. Dabei zeigten die Zellen, verglichen mit gesunden hämatopoietischen Zellen, ein normales Wachstum. Unter atmosphärischer Sauerstoffkonzentration (18,6%) dagegen zeigten die MDS-Zellen eine stark eingeschränkte Wachstumskapazität. Die CD34<sup>+</sup>-Zellpopulation von MDS-Patienten wies also eine erhöhte Sensitivität gegenüber der unphysiologisch hohen, aber üblichen Sauerstoffspannung in Zellkultur auf (Thompson *et al.*, 2007). Dies könnte daran liegen, dass ein mitochondrialer Atmungskettendefekt zu verstärkter Bildung von ROS führt.

Dass es sich bei der, in der vorliegenden Arbeit beobachteten, herabgesetzten Expression der Gene CytB und COXI in CD34<sup>+</sup>-Progenitorzellen in gesunden alten Spendern um eine normale altersbedingte Veränderung handelt, wird u.a. durch Ergebnisse der Gruppe um Manczak unterstützt, die zeigen konnte, dass es im Alter zu einer Reduktion mitochondrial kodierter Transkripte im Mäusehirn kommt (Manczak *et al.*, 2005). Hierfür wurde die Expression verschiedener mitochondrial kodierter Gene (u.a. CytB und COXI) in Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen miteinander verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass es nach einem Anstieg der Expression bis zum 12. Monat zu einer massiven Verminderung der Transkriptmenge bis zum 24. Monat kommt, wobei die verschiedenen Atmungskettenuntereinheiten unterschiedlich stark betroffen sind. Die MDS-Erkrankung allerdings scheint über die normale altersbedingte Beeinträchtigung

der Genexpression von CytB und COXI hinaus zu einem frühzeitigen bzw. verstärkten Alterungsprozeß der hämatopoietischen Zellen zu führen, da das Transkriptionsniveau bei jüngeren MDS-Patienten bereits genauso niedrig wie bei älteren MDS-Patienten ist.

Bezogen auf das kernkodierte Gen SDHB (UE im Komplex II der Atmungskette) ergaben sich unterschiedliche Expressionsmuster der mitochondrial kodierten Gene beim Vergleich zwischen MDS-Patienten und gesunden Spendern (**Abb. 3.10. A+B**). Während bei den Gesunden in beiden Altersgruppen die mRNA-Menge von ND3 in Relation zur SDHB-mRNA am höchsten und die Verhältnisgrößen von CytB:SDHB und COXI:SDHB ähnlich waren, waren bei den MDS-Patienten Abweichungen von diesem Muster erkennbar. Der Quotient von ND3:SDHB war bei den MDS-Patienten deutlich gegenüber den gesunden Spendern reduziert, während die Verhältnisgröße von COXI:SDHB gegenüber CytB:SDHB erhöht war. Es scheint somit aufgrund eines MDS-spezifischen Defekts zu einer stöchiometrischen Änderung der mitochondrial kodierten Transkripte zu kommen. Dass aber ein bestimmtes gewebsspezifisches stöchiometrisches Verhältnis für eine voll funktionstüchtige Elektronentransportkette unerlässlich ist, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (Blakely *et al.*, 2005; Bernard *et al.*, 2006; D'Aurelio *et al.*, 2006). Dieses Ungleichgewicht bewirkt vermutlich eine Dysfunktion der Atmungskette, die eine vorzeitige Alterung der Zellen zur Folge haben kann.

Da das Knochenmark der MDS-Patienten versucht, den apoptotischen Zellverlust durch eine gesteigerte Proliferation auszugleichen, werden die Mitochondrien der Stamm- und Progenitorzellen stärker als im gesunden Knochenmark gefordert, so dass sie möglicherweise schneller altern. Dieser Kreislauf könnte zu einem immer schnelleren Alterungsprozeß führen und damit die niedrige mitochondriale Genexpression vor allem bei den jüngeren MDS-Patienten erklären.

Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen also tatsächlich auf eine bislang nicht näher zu charakterisierende mitochondriale Beteiligung an der MDS-Pathogenese schließen.

Weitere Untersuchungen können vielleicht in Zukunft am Tiermodell durchgeführt werden. Am Karolinska Institut (Schweden) wurde 2004 in der Arbeitsgruppe von N.-G. Larsson eine Knock-in Maus mit einer defekten Polymerase gamma generiert (Trifunovic *et al.*, 2004). Wie zu erwarten, kam es bei dieser Maus zu einer 3-5fach erhöhten Mutationsrate der mtDNA und zu frühzeitigen Alterserscheinungen. Interessanterweise sind diese Mäuse auch anämisch, so dass es sich lohnen würde, ihr Knochenmark hinsichtlich zytomorphologischer Veränderungen, die einem MDS entsprechen, zu untersuchen.

Ein experimenteller Atmungskettendefekt könnte auch durch den Einsatz der siRNA-Technologie erreicht werden. Durch die Inhibierung unterschiedlicher Atmungskettenuntereinheiten in hämatopoietischen Progenitorzellen könnte man

unter Umständen während der erythropoietischen Differenzierung in Zellkultur weitere Einblicke in die MDS-Pathogenese gewinnen.

## V.a) Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Methoden etabliert und eingesetzt, um der Hypothese nachzugehen, dass erworbene Defekte der mitochondrialen Atmungskette zur Pathogenese myelodysplastischer Syndrome beitragen.



Zunächst wurde eine Methode zur Isolierung reiner, intakter Mitochondrien aus kleinen Probenmengen ( $5 \times 10^5$  Zellen) etabliert. In Zukunft kann diese Kombination aus differentieller Zentrifugation und MACS-Immunpräzipitation dazu verwendet werden, aus klinischem Probenmaterial reine, metabolisch aktive Mitochondrien für Proteomanalysen zu gewinnen. Für die aktuell zur Verfügung stehenden proteinanalytischen Methoden ist die Menge des aus Knochenmarkaspiraten gewonnenen Materials jedoch nicht ausreichend.



Um die Aktivitäten des teilweise mitochondrial kodierten Atmungskettenenzymkomplexes Cytochrom-c-Oxidase und des ausschließlich nukleär kodierten Enzymkomplexes Succinatdehydrogenase in CD34<sup>+</sup>-Zellen aus dem Knochenmark von MDS-Patienten und gesunden Probanden zu untersuchen, wurden enzymatische Färbungen eingesetzt. In beiden Gruppen zeigten sich deutliche intraindividuelle Unterschiede; ein signifikanter Unterschied zwischen MDS und Kontrollpersonen konnte jedoch nicht festgestellt werden. In der Probe einer, zum Zeitpunkt der Entnahme unbehandelten, 80-jährigen Patientin färbten sich in einigen Zellen abnorme subzelluläre Strukturen an, deren Identität auch nach Konsultation verschiedener Experten noch nicht geklärt werden konnte.



Expressionsanalysen der Gene ND3 (Untereinheit des Atmungskettenenzymkomplexes I), SDHB (Komplex II), CytB (Komplex III) und COXI (Komplex IV) mittels real time RT-PCR zeigten eine deutliche Reduktion der Transkriptmenge bei den MDS-Patienten gegenüber gesunden Probanden. Es fiel auf, dass männliche gegenüber weiblichen MDS-Patienten eine zusätzliche Verminderung der Expression aufwiesen. Im Vergleich verschiedener Altersgruppen kam es bei den gesunden Probanden zu einer altersassoziierten Reduktion der Transkripte von CytB und COXI. Ein solcher Rückgang der Transkriptmenge konnte bei ND3 nicht festgestellt werden. Wegen dieser „Altersstabilität“ könnten Verminderungen der ND3-Transkription möglicherweise als diagnostischer Marker für MDS gewertet werden. Beim Vergleich der Transkription der mitochondrial kodierten Atmungskettenuntereinheiten mit der kernkodierten Untereinheit SDHB zeigte sich bei MDS-Patienten ein stöchiometrisches Ungleichgewicht zwischen den verschiedenen mitochondrialen mRNA-Spezies, das bei gesunden Probanden nicht zu beobachten war.

Die erzielten Ergebnisse sind mit einer mitochondrialen Beteiligung an der MDS-Pathogenese vereinbar. Anscheinend existiert ein MDS-assoziiertes Effekt, der eine frühzeitige bzw. verstärkte mitochondriale Alterung der hämatopoietischen Progenitorzellen bewirkt.

## V.b) Summary

In this work, several techniques were established and employed to explore the possibility that acquired defects of the mitochondrial respiratory chain may contribute to the pathogenesis of myelodysplastic syndromes.



First, a method was developed to isolate pure intact mitochondria from samples as small as  $5 \times 10^5$  cells. This method combines differential centrifugation and immunoprecipitation by MACS-technology. The effort was successful in generating samples of pure, metabolically active mitochondria. This technology was established to provide material from clinical samples, e.g. bone marrow aspirates, for proteomic analysis. However, it turned out that the quantity of the mitochondrial material out of bone marrow aspirates is too small for the current techniques of proteome analysis.



Cytochemical stainings were used to assess the activity of the partially mitochondrial encoded respiratory chain complex cytochrome c oxidase as well as the exclusively nuclear encoded respiratory chain complex succinate dehydrogenase in CD34<sup>+</sup> bone marrow cells from MDS patients and healthy donors. Marked intra-individual differences were found in both groups. However, no significant difference was found between MDS patients and controls. In one of the patient samples from an 80-year-old female who was treatment naïve at the time point of bone marrow sampling hitherto unknown intracellular structures were observed in some of the CD34<sup>+</sup> cells. Despite consultation with several experts, their identity remains to be clarified.



Gene expression analysis of ND3 (subunit of respiratory chain complex I), SDHB (complex II), CytB (complex III), and COXI (complex IV) by real time RT-PCR revealed a statistically significant reduction of transcript levels in CD34<sup>+</sup> cells from MDS bone marrow as compared with healthy volunteers. In addition, male patients showed a more pronounced decrease in transcription than female patients. Healthy volunteers showed an age-related decrease in transcript levels of CytB and COXI, which did not apply to ND3. Therefore, this age-independence of ND3 expression may provide a basis for interpreting a decrease in ND3 expression as a diagnostic marker for MDS. Looking at mitochondrial gene expression in comparison to transcription of the nuclear encoded subunit SDHB, MDS patients displayed a stoichiometric imbalance in the expression of their mitochondrial genes, which was not observed in healthy controls.

The results of the aforementioned studies are compatible with a role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. Apparently, an MDS-related mechanism produces earlier and more pronounced mitochondrial ageing in hematopoietic progenitor cells.

## VI. Literaturverzeichnis

- Amenomori, T.;** Tomonaga, M.; Jinnai, I.; Soda, H.; Nonaka, H.; Matsuo, T.; Yoshida, Y.; Kuriyama, K.; Ichimaru, M. and Suematsu, T. (1987): Cytogenetic and cytochemical studies on progenitor cells of primary acquired sideroblastic anemia (PASA): involvement of multipotent myeloid stem cells in PASA clone and mosaicism with normal clone. *Blood*, 70, 1367-1372
- Anderson, S.;** Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; de Bruijn, M.H.; Coulson, A.R.; Drouin, J.; Eperon, I.C.; Nierlich, D.P.; Roe, B.A.; Sanger, F.; Schreier, P.H.; Smith, A.J.; Staden, R. and Young, I.G. (1981): Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290, 457-465
- Anderson, W.A.;** Bara, G and Seligman, A.M. (1975): The ultrastructural localization of cytochrome oxidase via cytochrome *J.Histochem.Cytochem*, 23,13-20
- Attardi, G.** (1985): Animal mitochondrial DNA: an extreme example of genetic economy. *Int Rev Cytol*, 93, 93-145
- Au, H.C.;** Ream-Robinson, D.; Bellew, L.A.; Broomfield, P.L.E.; Saghbini, M. and Scheffler, I.E. (1995): Stuctural organization of the gene encoding the human iron-sulfur subunit of succinate dehydrogenase. *Gene*, 159, 249-53
- Aul, C.;** Gattermann, N. and Schneider, W. (1995): Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*, 16, 247-262
- Barrell, B.G.;** Bankier, A.T. and Drouin, J. (1979): A different genetic code in human mitochondria. *Nature*, 282, 189-194

- Baysal, B.E.** (2002): Hereditary paraganglioma targets diverse paraganglia. *J Med Genet*, 39, 617-622
- Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.; Gralnick, H.R and Sultan, C.** (1982): Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 51, 189-199
- Bennett, J.M. and Komrokji, R.S.** (2005): The myelodysplastic syndromes: diagnosis, molecular biology and risk assessment. *Hematology*, 10, 258-269
- Berger, G.; Hunault-Berger, M.; Rachieru, P.; Fontenay-Roupie, M.; Baranger, L.; Ifrah, N. and Zandecki, M.** (2001): Increased apoptosis in mononucleated cells but not in CD34<sup>+</sup> cells in blastic forms of myelodysplastic syndromes. *Hematol J*, 2, 87-96
- Bernard, G.; Faustin, B.; Passerieux, E.; Galinier, A.; Rocher, C.; Bellance, N.; Delage, J.P.; Casteilla, L.; Letellier, T. and Rossignol, R.** (2006): Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1172-1182
- Blakely, E.L.; Mitchell, A.L.; Fisher, N.; Meunier, B.; Nijtmans, L.G; Schaefer, A.M.; Jackson, M.J.; Turnbull, D.M. and Taylor, R.W.** (2005): A mitochondrial cytochrome b mutation causing severe respiratory chain enzyme deficiency in human and yeast. *FEBS J*, 272, 3583-3592
- Boerian, M.L.; Baarends, W.M. and Ruven, H.J** (1991): A cytochemical staining procedure for succinate dehydrogenase activity in pre-ovulatory mouse oocytes embedded in low gelling temperature agarose. *J Histochem Cytochem*, 39, 135-138

- Bogenhagen, D.** and Clayton, D.A. (1977): Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. *Cell*, 11, 719-727
- Bohr, V.A.;** Stevnsner, T. and de Souza-Pinto, N.C. (2002a): Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene*, 286, 127-134
- Bohr, V.A.** (2002b): Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some Changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med*, 32, 804-12
- Breuer, W.;** Greenberg, E. and Cabantchik, Z.I. (1997): Newly delivered transferrin iron and oxidative cell injury. *FEBS Letters*, 403: 213-219
- Bucala, R.;** Model, P. and Cerami, A. (1984): Modification of DNA by reducing sugars: a possible mechanism for nucleic acid aging and age-related dysfunction in gene expression. *PNAS*, 81, 105-109
- Bucala ,R.;** Lee, A.T.; Rourke, L. and Cerami, A. (1993): Transposition of an Alu-containing element induced by DNA-advanced glycosylation endproducts. *PNAS*, 90, 2666-2670
- Burri, L.;** Vascotto, K.; Gentle, I.E.; Chan, N.C.; Beilharz, T.; Stapleton, D.I.; Ramage, L. and Lithgow, T. (2006): Integral membrane proteins in the mitochondrial outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J*, 273, 1507-1515
- Butler, M.G.** (2002): Imprinting disorders: non-Mendelian mechanisms affecting growth. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 15, 1279-1288
- Capaldi, R.A.** (1990): Structure and function of cytochrome c oxidase. *Annu Rev Biochem*, 59, 569-

- Caroli, J;** Bernard, J.; Bessis, M.; Combrisson, A.; Malassenet, R. and Breton, J. (1957): Hémochromatose avec anemie hypochrome et absence d'hémoglobine anormale. *Presse Med*, 65, 1991-1996
- Cartwright, R.A.;** Gurney, K.A and Moorman, A.V. (2002): Sex ratios and the risk of haematological malignancies. *Br J Haematol*, 118, 1071-1077
- Chinnery, P.F.** and Turnbull, D.M. (2001): Epidemiology and treatment of mitochondrial disorders. *Am J Med Genet*, 106, 94-101
- Chinnery, P.F.;** Samuels, D.C.; Elson, J. and Turnbull, D.M. (2002): Accumulation of mitochondrial DNA mutations in aging, cancer, and mitochondrial disease: is there a common mechanism? *Lancet*, 360, 1323-1325
- Chomyn, A.;** Mariottini, P.; Cleeter, W.J.; Ragan, C.I.; Matsuno-Yagi, A.; Hatefi, Y.; Doolittle, R.F. and Attardi, G. (1985): Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, 314, 592-597
- Clayton, D.A.** (1992): Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *Int Rev Cytol*, 141, 217-232
- Coller, H.A.;** Bodyak, N.D. and Khrapko, K. (2002): Frequent intracellular clonal expansions of somatic mtDNA mutations: significance and mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 959, 434-447
- Dacie, J.V. &** Doniach, I. (1947): The basophilic property of the iron-containing granules in siderocytes. *J Pathol*, 59, 684-686
- Da Cruz, S.;** Parone, P.A. and Martinou, J.-C. (2005): Building the mitochondrial proteom. *Expert Rev Proteomics*, 2, 541-551

- D'Aurelio, M.;** Gajewski, C.D.; Lenaz, G. and Manfredi, G. (2006): Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids. *Hum Mol Genet*, 15, 2157-2169
- DiMauro, S.** and Schon, E.A. (2003): Mitochondrial respiratory chain diseases. *N Engl J Med*, 348, 2656-2668
- Elson, J.L.;** Samuels, D.C.; Turnbull, D.M. and Chinnery, P.F. (2001): Random intracellular drift explains the clonal expansion of mitochondrial DNA mutations with age. *Am J Hum Genet*, 68, 802-806
- Fandino, A.S.;** Rais, I.; Vollmer, M.; Elgass, H.; Schagger, H. and Karas, M. (2005): LC-nanospray-MS/MS analysis of hydrophobic proteins from membrane protein complexes isolated by blue-native electrophoresis. *J Mass Spectrom*, 40, 1223-1231
- Fornier, F.;** Foster, L.J.; Campanaro, S.; Valle, G. and Mann, M. (2006): Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart and liver. *Mol Cell Proteomics*, 5, 608-619
- Frank, S.** and Hurst, L.D. (1996): Mitochondria and male disease. *Nature*, 383, 224
- Gattermann, N.;** Berneburg, M.; Heinisch, J.; Aul, C. and Schneider, W. (1995): Detection of the ageing-associated 5-kb deletion of mitochondrial DNA in blood and bone marrow of hematologically normal adults. Absence of the deletion in clonal bone marrow disorders. *Leukemia*, 9, 1704-1710
- Gattermann, N.** (1999): From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 24, 141-151

- Gattermann, N.;** Dadak, M.; Hofhaus, G.; Wulfert, M.; Berneburg, M.; Loeffler, M.L. and Simmonds, H.A. (2004): Severe impairment of nucleotide synthesis through inhibition of mitochondrial respiration. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 23, 1275-1279
- Germing, U.;** Strupp, C.; Kuendgen, A.; Isa, S.; Knipp, S.; Hildebrandt, B.; Giagounidis, A.; Aul, C.; Gattermann, N. and Haas, R (2006): Prospective validation of the WHO proposal for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, 91, 1596-1604
- Goodman, J.R.** and Hall, S.G. (1967): Accumulation of iron in mitochondria of erythroblasts. *Br J Haematol*, 13, 335-340
- Grasso, J.A.;** Myers, T.J.; Hines, J.D. and Sullivan, A.L. (1980): Energy-dispersive X-ray analysis of the mitochondria of sideroblastic anaemia. *Br J Haematol*, 46, 57-72
- Gray, N.K.;** Pantopoulos, K.; Dandekar, T.; Ackrell, B.A. and Hentze, M.W. (1996): Translational regulation of mammalian and *Drosophila* citric acid cycle enzymes via iron-responsive elements. *PNAS*, 93, 4925-4930
- Greenberg, P.L.** (1998): Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leuk Res*, 22, 1123-1136
- Haase, D.;** Germing, U.; Schanz, J.; Pfeilstöcker, M.; Noesslinger, T.; Hildebrandt, B.; Kuendgen, A.; Luebbert, M.; Giagounidis, A.; Aul, C.; Truemper, L.; Mueller, T.; Valent, P.; Fonatsch, C. and Steidl, C. (2006): New and comprehensive cytogenetic prognostication and categorization in MDS, *ASH Annual Meeting Abstracts*, Part1, 108, Abstract # 248

- Hall, A.M.** and Unwin, R.J. (2007): The not so “mighty chondrion”: emergence of renal diseases due to mitochondrial dysfunction. *Nephron Physiol*, 105, 1-10
- Hannula, K.;** Lipsanen-Nyman, M.; Scherer, S.W.; Holmberg, C.; Hoglund, P. and Kere, J. (2001): Maternal and paternal chromosome 7 show differential methylation of many genes in lymphoblast DNA. *Genomics*, 73, 1-9
- Harman, D.** (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11, 298-300
- Harman, D.** (2006): Free radical theory of aging: an update: increasing the functional life span. *Ann N Y Sci*, 1067, 10-21
- Hayashi, J.;** Ohta, S.; Kagawa, Y.; Kondo, H.; Kaneda, H.; Yonekawa, H.; Takai, D. and Miyabayashi, S. (1994): Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects. *J Biol Chem*, 269, 6878-6883
- Herrnstadt, C.;** Clevenger, W.; Ghosh, S.S.; Anderson, C.; Fahy, E.; Miller, S. Howell, N. and Davis, R. (1999): A novel mitochondrial DNA-like sequence in the human nuclear genome. *Genomics*, 60, 67-77
- Hutcheson, J.R.;** Ogawa, M.; Eguchi, M. and Spicer, S.S. (1979): Idiopathic sideroblastic anemia: presence of sideroblastic changes in the erythropoietic precursors cultured from peripheral blood. *Exp Hematol*, 7, 328-333
- Iglesias, T.;** Caubin, J.; Zaballos, A.; Bernal, J. and Munoz, A. (1995): Identification of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3) as a thyroid hormone regulated gene by whole genome PCR analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 210, 995-1000

- Jacobs, A.** (1991): Genetic abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 56, 1-6
- Jacobs, R.H.;** Cornbleet, M.A.; Vardiman, J.W.; Larson, R.A.; LeBeau, M.M.; and Rowley, J.D. (1986): Prognostic implications of morphology and karyotype in primary myelodysplastic syndromes. *Blood*, 67, 1765-1772
- Jaffe, E.S.;** Harris, N.L; Stein, H.; Vardiman, J.W. (2001): Classification of tumours: tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. *IARC Press*, Lyon
- Kadowaki, T.;** Kadowaki, H.; Mori, Y.; Tobe, K.; Sakuta, R.; Suzuki, Y.; Tanabe, Y.; Sakura, H.; Awata, T.; Goto Y.-I.; Hayakawa, T.; Matsuoka, K.; Kawamori, R.; Kamada, T.; Horai, S.; Nonaka, I.; Hagura, R.; Akanuma, Y. and Yazaki, Y. (1994): A subtype of diabetes mellitus associated with a mutation of mitochondrial DNA. *New Engl J Med*, 330, 962-968
- Kasai, H.;** Iwamoto-Tanaka, N. and Fukada, S. (1998): DNA modifications by the mutagen glyoxal. adduction to G and C , deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis*, 19, 1459-1465
- Katz, F.;** Webb, D.; Gibbons, B.; Reeves, B.; McMahon, C.; Chessells, J. and Mitchell, C. (1992): Possible evidence for genomic imprinting in childhood myelodysplastic leukemia associated with monosomy for chromosome 7. *Br J Haematol*, 80, 332-336
- Kilic, M.;** Kasperczyk, H.; Fulda, S. and Debatin, K.M. (2006): Role of hypoxia inducible factor-1 alpha in modulation of apoptosis resistance. *Oncogene*, [Epub ahead of print]

- Kiri, A.N.;** Tran, H.C.; Drahos, K.L; Lan, W.; McRorie, D.K. and Horn, M.J. (2005): Proteomic changes in bovine heart mitochondria with age: using a novel technique for organelle separation and enrichment. *J Biomol Tech*, 16, 371-379
- Kraytsberg, Y.;** Nekheava, E.; Bodyak, N.D. and Khrapko, K. (2003): Mutation and intracellular clonal expansion of mitochondrial genomes: two synergistic components of the aging process? *Mech Ageing Dev*, 124, 49-53
- Kuendgen, A.;** Strupp, C.; Aivado, M.; Hildebrandt, B.; Haas, R.; Gattermann, N. and Germing, U. (2006): Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50. *J Clin Oncol*, 24, 5358-5365
- Layton, D.M.** and Mufti, G.J. (1986): Myelodysplastic syndromes: their history, evolution and relation to acute myeloid leukaemia, *Blut*, 53, 423-436
- Lederer, F.** (1994): The cytochrome b<sub>5</sub>fold: an adaptable module. *Biochimie*, 76, 674-692
- Lin, M.T.** and Beal, M.F. (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795
- Linnane, A.W.;** Marzuki, S.; Ozawa, T. and Tanaka, M. (1989): Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*, 1, 642-645
- Litwin, J.A.** and Furgal, A. (1990): Different levels of reactive endogenous cytochrome c in mitochondria rich cells revealed by diaminobenzidine staining. *Folia Histochem Cytobiol*, 28, 219-223
- Maher, E.R.** and Eng, C. (2002): The pressure rises: update on the genetics of pheochromocytoma. *Hum Mol Genet*, 11, 2347-2354

- Maillard, L.C.** (1913): Action de la glycérine et des sucres sur les acides  $\alpha$ -aminés. *Genèse de matières protéique et des matières humique*, Masson et Cie Éditeurs, Libraires de l'Académie de Médecine, Paris
- Manczak, M.; Jung, Y.; Park, B.S.; Partovi, D. and Reddy, P.H.** (2005): Time-course of mitochondrial gene expressions in mice brains: implications for mitochondrial dysfunction, oxidative damage, and cytochrome c in aging. *J Neurochem*, 92, 494-504
- Mauritzson, N.; Johansson, B.; Rylander, L.; Albin, M.; Strömberg, U.; Billström, R.; Ahlgren, T.; Mikoczy, Z.; Mitelman, F.; Hagmar, L. and Nilsson, P.G.** (2001): The prognostic impact of karyotypic subgroups in myelodysplastic syndromes is strongly modified by sex. *Br J Haematol*, 113, 347-356
- McDonald, T.; Sheng, S.; Stanley, B.; Chen, D.; Ko, Y.; Cole, R.N.; Pedersen, P. and van Eyk, J.E.** (2006): Expanding the subproteome of the inner mitochondria using protein separation technologies. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 2392- 2411
- Melefors, O** (1996): Translational regulation *in vivo* of the *Drosophila melanogaster* mRNA encoding succinate dehydrogenase iron protein via iron responsive elements. *Biochem Biophys Res Commun*, 221, 437-441
- Mironova, R.; Niwa, T.; Handzhiyski, Y.; Sredovska, A. and Ivanov, I.** (2005): Evidence for non-enzymatic glycosylation of Escherichia coli chromosomal DNA. *Mol Microbiol*, 55, 1801-1811
- Mizoguchi, H.; Kubota, K.; Suda, T.; Takaku, F. and Miura, Y.** (1983): Erythroid and granulocyte/macrophage progenitor cells in primary acquired sideroblastic anemia. *Int J Cell Cloning*, 1, 15-23

- Moreno-Loshuertos, R.;** Acin-Perez, R.; Fernandez-Silva, P.; Movilla, N.; Perez-Martos, A.; de Cordoba, A.R.; Gallardo, M.E. and Enriquez, J.A. (2006): Differences in reactive oxygen species production explain the phenotypes associated with common mouse mitochondrial DNA variants. *Nature Genetics*, 38, 1261-1268
- Morison, I.M.;** Eccles, M.R. and Reeve, A.E. (2000): Imprinting of insulin-like growth factor 2 is modulated during hematopoiesis. *Blood*, 96, 3023-3028
- Müller, C.I.;** Ruter, B.; Koeffler, H.P. and Lubbert, M. (2006): DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol*, 7, 315-321
- Mufti, G.J. and Galton, D.A.** (1986): Myelodysplastic syndromes: natural history and features of prognostic importance. *Clin Haematol*, 15, 953-971
- Mufti, G.J.** (1992): Chromosomal deletions in the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*, 16, 35-41
- Neumann, H.P.;** Pawlu, C.; Peczkowska, M.; Bausch, B; McWhinney, S.R.; Muresan, M; Buchta, M; Franke, G.; Klisch, J.; Bley, T.A.; Hoegerle, S.; Boedecker, C.C.; Opocher, G.; Schipper, J.; Januszewicz, A.; Eng, C. (2004): Distinct clinical features of paraganglioma Syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *JAMA*, 292, 943-951
- Ohnishi, T.;** Ragan, C.I. and Hatefi, Y. (1985): EPR studies of iron-sulfur clusters in isolated subunits and subfractions of NADH-ubiquinone oxidoreductase. *J Biol Chem*, 260, 2782-2788
- Perotti, M.E.;** Anderson, W.A. and Swift, H. (1983): Quantitative cytochemistry of the diaminobenzidine cytochrome oxidase reaction product in mitochondria of cardiac muscle and pancreas. *J Histochem. Cytochem*, 31, 351-365

- Piccoli, C.;** Ria, R.; Scrima, R.; Cela, O.; D'Aprile, A.; Boffoli, D.; Falzetti, F.; Tabilio, A. and Capitanio, N. (2005): Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. *JBC*, 280, 26467-26476
- Pischetsrieder, M.;** Seidel, W.; Munch, G. and Schinzel, R. (1999): N<sup>2</sup>-(1-Carboxyethyl) deoxyguanosine, a nonenzymatic glycation adduct of DNA induces single-strand breaks and increases mutation frequencies. *Biochem Biophys Res Commun*, 264, 544-549
- Porra, R.J. & Jones, O.T.** (1963): Studies on ferrochelatase. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract. *Biochem J*, 87, 181-185
- Ragan, C.I.;** Galante, Y.M. and Hatefi, Y. (1982): Purification of three iron-sulfur proteins from the iron protein fragment of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Biochemistry*, 11, 2518-2524
- Rand, D.M.;** Haney, R.A. and Fry, A.J. (2004): Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation, *Trends in Ecology and Evolution*, 19, 645-653
- Ross, I.K.** (2004): Mitochondria, Sex, and Mortality. *Ann N Y Acad Sci*, 1019, 581-584
- Rossignol, S.** (2006): Silver-Russell syndrome and its genetic origins. *J Endocrinol Invest*, 29, 9-10
- Rottenberg, H.** (2006): Longevity and the evolution of the mitochondrial DNA-coded proteins in mammals. *Mech Ageing Dev*, 127, 748-760
- Sackton, T.B.;** Haney, R.A. and Rand, D.M. (2003): Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution Int J Org Evolution*, 57, 2315-2325

- Sambrook, J.;** Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (2001): Molecular Cloning: A laboratory Manual, 3<sup>rd</sup> Edition, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York
- Satoh, Y.;** Nakadate, H.; Nakagawachi, T.; Higashimoto, K.; Joh, K.; Masaki, Z.; Uozumi, J.; Kaneko, Y.; Mukai, T. and Soejima, H. (2006): Genetic and epigenetic alterations on the short arm of chromosome 11 are involved in a majority of sporadic Wilms' tumors. *Br J Cancer*, 95, 541-547
- Schmiedel, J.;** Jackson, S.; Schäfer, J. and Reichmann, H. (2003): Mitochondrial Cytopathies. *J Neurol*, 250, 267-277
- Selak, M.A.;** Armour, S.M.; MacKenzie, E.D.; Boulahbel, H.; Watson, D.G.; Mansfield, K.D.; Pan, Y.; Simon, M.C.; Thompson, C.B. and Gottlieb, E. (2005): Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF-alpha prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7, 77-85
- Shigenaga, M.K.;** Hagen T.M. and Ames, B.N. (1994): Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *PNAS*, 91, 10771-10778
- Shoffner, J.M. and Wallace, D.C. (1990):** Oxidative phosphorylation diseases: Disorders of two genomes. *Adv Hum Genet*, 19, 267-330
- Song, Y.;** Hao, Y.; Sun, A.; Li, W.; Guo, L.; Yan, Y.; Geng, C.; Chen, N.; Zhong, F.; Wei, H.; Jiang, Y. and He, F. (2006): Sample preparation project for the subcellular proteome of mouse liver. *Proteomics*, 6, 5269-5277
- Sun, F.;** Huo, X.; Zhai, Y.; Wang, A.; Xu, J.; Su, D.; Bartlam, M. and Rao, Z. (2005): Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell*, 121, 1043-1057
- Swain, J.L.;** Stewart, T.A. and Leder, P. (1987): Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell*, 50, 719-727

- Tanaka, M.;**Fuku, N.;Takeyasu, T.; Guo, L.-J.; Hirose, R.; Kurata, M.; Borgeld, H.-J.; Yamada, Y.; Maruyama, W.; Arai, Y.; Hirose, N.; Oshida, Y.; Sato, Y.; Hattori, N.; Mizuno, Y.; Iwata, S. and Yagi, K. (2002): Golden mean to longevity: Rareness of mitochondrial cytochrome b variants in centenarians but not in patients with parkinson's disease. *J Neurosci Res*, 70, 347-355
- Taylor, R.W.;** Barron, M.J.; Borthwick, G.M.; Gospel, A.; Chinnery, P.F.; Samuels, D.C.; Taylor, G.A.; M. Plusa, S.; Needham, S.J.; Greaves, L.C. and Kirkwood, T.B.L. and Turnbull, D.M. (2003): Mitochondrial DNA mutations in human colonic crypt stem cells. *J Clin Invest*, 112, 1351-1360
- Tanji, K.** and Bonilla, E. (2001): Optical imaging techniques (histochemical, immunohistochemical, and in situ hybridization staining methods) to visualize mitochondria. *Methods Cell Biol*, 65, 311-332
- Tefferi, A.;** Thibodeau, S.N and Solberg, L.A. (1990): Clonal studies in the myelodysplastic syndrome using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Blood*, 75, 1770-1773
- Tehranchi, R.;** Invernizzi, R.; Grandien, A.; Zhivotovsky, B.; Fadeel, B.; Forsblom, A.-M.; Travaglino, E.; Samuelsson, J.; Hast, R.; Nilsson, L.; Cazzola, M.; Wibom, R. and Hellström-Lindberg, E. (2005): Aberrant mitochondrial iron distribution and maturation arrest characterize early erythroid precursors in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, 106, 247-253
- Thompson, J.E.;** Conlon, J.P.; Yang, X.; Sanchez, P.V. and Carroll, M. (2007): Enhanced growth of myelodysplastic colonies in hypoxic conditions. *Exp Hematol*, 35, 21-31

- Trifunovic, A.;** Wredenberg, A.; Falkenberg, M.; Spelbrinck, J.N.; Rovlo, A.T.; Bruder, C.E.; Bohlooly-Y, M.; Gidlöf, S.; Oldfors, A.; Wibom, R.; Törnell, J.; Jacobs, H.T. and Larsson, N.-G. (2004): Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429, 417-423
- Tsukamoto, N.;** Morita, K.; Maehara, T.; Okamoto, K.; Karasawa, M.; Omine, M. and Naruse, T. (1993): Clonality in myelodysplastic syndromes: demonstration of pluripotent stem cell origin using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Br J Haematol*, 83, 589-594
- Tsukihara, T.;** Aoyama, H.; Yamashita, E.; Tomizaki, T.; Yamaguchi, H.; Shinzawaltho, K.; Nakashima, R.; Yaono, R. and Yoshikawa, S. (1996): The whole structure of the 13 subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science*, 272, 1136-1144
- Tzagoloff, A. and Myers, A.M.** (1986): Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu Rev Biochem*, 55, 249-285
- Ulrich, P. and Cerami, A.** (2001): Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent Prog Horm Res*, 56, 1-21
- Wallace, D.C.;** Ye, J.H.; Neckelmann, S.N.; Singh, G.; Webster, K.A. and Greenberg, B.D. (1987): Sequence analysis of cDNAs for the human and bovine ATP synthase  $\beta$  subunit: mitochondrial DNA genes sustain seventeen times more mutations. *Curr Genet*, 12, 81-90
- Wallace, D.C.** (1993): Mitochondrial diseases: genotype versus phenotype. *Trends Genet*, 9, 128-133

**Wallace, D.C.;** Lott, M.T.; Torroni, A.; Brown, M.D.and Shoffner, J.M. (1994):  
Report of the committee on human mitochondrial DNA. *Human Gene  
Mapping 1993*, Eds.: Cutichia, A.J. and Pearson, P.L., The John Hopkins  
University Press, 813

**Wallace, D.C.** (1999): Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283,  
1482-1488

### Liste der für den LightCycler verwendeten Patientenproben

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp        | Behandlung                        | LDH-Wert |
|-------|------------|-------|------------|-----------------|-----------------------------------|----------|
| 1     | m          | 57    | RSCMD      | del(11q)        | Thalidomid, Desferal              | LDH: 253 |
| 2     | w          | 48    | RCMD       | +1, Derivat 1,7 |                                   |          |
| 3     | w          | 75    | AML        |                 | Decitabin                         | LDH: 281 |
| 4     | m          | 71    | AML        | Trisomie 8      | Decitabin, ATRA,<br>Valproinsäure | LDH: 424 |
| 5     | w          | 70    | RSCMD      | del(20q)        | Epo                               | LDH: 180 |
| 6     | m          | 65    | RCMD       | normal          | unbehandelt                       | LDH: 197 |
| 7     | m          | 68    | RAEB I     |                 | unbehandelt                       | LDH: 397 |
| 8     | m          | 48    | RSCMD      | normal          | unbehandelt                       | LDH: 219 |
| 9     | m          | 63    | RCMD       | del(5q)         |                                   |          |
| 10    | w          | 58    | RSCMD      | Trisomie 8      | Desferal                          | LDH: 122 |

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp              | Behandlung                               | LDH-Wert |
|-------|------------|-------|------------|-----------------------|--|----------|
| 11    | w          | 66    | RSCMD      | del(5), Trisomie 8    | unbehandelt                              | LDH: 261 |
| 12    | m          | 71    | AML        | normal                | unbehandelt                              | LDH: 240 |
| 13    | w          | 75    | RCMD       | normal                | unbehandelt                              | LDH: 310 |
| 14    | w          | 80    | RAEB I     | Monosomie 7           | Thalidomid (2Jahre), dann<br>unbehandelt | LDH: 156 |
| 15    | w          | 83    | gesund     | /                     | /  | /        |
| 16    | m          | 78    | AML        |                       | unbehandelt                              | LDH: 309 |
| 17    | m          | 52    | AML        | Inv.3,<br>Monosomie 7 |  | LDH: 533 |
| 18    | w          | 61    | RAEB I     | komplex               | unbehandelt                              | LDH: 244 |
| 19    | m          | 71    | RSCMD      |                       |  |          |
| 20    | w          | 64    | RCMD       | /                     | /  | /        |
| 21    | w          | 28    | gesund     | /                     | /  | /        |

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp          | Behandlung  | LDH-Wert    |
|-------|------------|-------|------------|-------------------|-------------|-------------|
| 22    | w          | 66    | AML        | komplex           | unbehandelt | LDH: 249    |
| 23    | m          | 24    | gesund     | /                 | /           | /           |
| 24    | w          | 67    | RCMD       | normal            | unbehandelt | LDH: 226    |
| 25    | w          | 51    | RCMD       | normal            | unbehandelt | LDH: 118    |
| 26    | w          | 57    | RSCMD      | normal            | unbehandelt | LDH: 163    |
| 27    | w          | 67    | AML        | normal            | unbehandelt | LDH: 455    |
| 28    | w          | 62    | AML        |                   |             |             |
| 29    | m          | 64    | RAEB I     |                   | Thalidomid  |             |
| 30    | w          | 64    | AML        | del(5q), del(20q) | unbehandelt | LDH: 141    |
| 31    | m          | 72    | RSCMD      | 45,X0,del(11)     |             | LDH: 190    |
| 32    | w          | 32    | RSCMD      | normal            | Epo         | LDH: normal |

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp               | Behandlung  | LDH-Wert |
|-------|------------|-------|------------|------------------------|---|----------|
| 33    | m          | 79    | AML        |                        |   |          |
| 34    | m          | 67    | RAEB I     |                        |   |          |
| 35    | w          | 60    | RAEB I     | Monosomie 7            | 4x<br>Farnesyltransferaseinhibitor,<br>DD:AA CyclosporinA | LDH: 162 |
| 36    | m          | 49    | (kein MDS) | normal                 | unbehandelt   | LDH: 204 |
| 37    | m          | 35    | gesund     | /                      | /   | /        |
| 38    | w          | 77    | gesund     | /                      | /   | /        |
| 39    | m          | 65    | RAEB I     | komplex                | Thalidomid  | LDH: 169 |
| 40    | w          | 79    | RAEB I     | del(5q),<br>Trisomie 8 | Epo   | LDH:231  |
| 41    | m          | 70    | RAEB II    | normal                 | Thalidomid (2,5 Monate),<br>unbehandelt                   | LDH: 176 |
| 42    | w          | 77    | RAEB II    |                        | Decortin  | LDH: 216 |
| 43    | m          | 72    | RAEB II    | normal                 | Farnesyltransferaseinhibitor                              | LDH: 249 |

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp       | Behandlung  | LDH-Wert |
|-------|------------|-------|------------|----------------|-------------|----------|
| 44    | w          | 79    | RSCMD      | normal         | unbehandelt | LDH:239  |
| 45    | w          | 50    | RSCMD      | normal         | unbehandelt | LDH: 185 |
| 46    | w          | 68    | RSCMD      | del(5q),-7,-22 | unbehandelt | LDH: 215 |
| 47    | m          | 61    | RAEB II    | normal         | unbehandelt | LDH: 92  |
| 48    | m          | 66    | RCMD       | normal         | unbehandelt | LDH: 261 |
| 49    | w          | 78    | RAEB I     | del(12p)       | unbehandelt | LDH: 313 |
| 50    | m          | 75    | AML        | del(7)         | unbehandelt |          |
| 51    | m          | 51    | RCMD       |                |             |          |
| 52    | m          | 79    | RAEB II    | del(20)        | unbehandelt | LDH: 206 |
| 53    | m          | 69    | RAEB I     |                | unbehandelt | LDH: 491 |
| 54    | w          | 85    | gesund     | /              | /           | /        |

| Probe | Geschlecht | Alter | MDS-Gruppe | Karyotyp | Behandlung    | LDH-Wert   |
|-------|------------|-------|------------|----------|---------------|------------|
| 55    | m          | 65    | RCMD       |          | Valproinsäure | LDH:173    |
| 56    | w          | 85    | AML        |          | unbehandelt   | LDH: 248   |
| 57    | m          | 42    | gesund     | /        | /             | /          |
| 58    | w          | 66    | AML (M7)   | komplex  | unbehandelt   | LDH:normal |
| 59    | w          | 67    | AML        | komplex  | Thalidomid    | LDH: 399   |
| 60    | w          | 84    | gesund     | /        | /             | /          |

---

## Inserts der Standardplasmide

### **Standardplasmid ND3 (300 bp):**

5'-atcaacaccctcctagccttactactaataattattacattttgactaccacaactcaacggctacatagaaaaatccacc  
cttacgagtgccggttcgaccccatatccccgccgcgtccctttccataaaattcttctagtagctattaccttctattattg  
atctagaaattgccctcctttaccctaccatgagccctacaacaactaacctgccactaatagttatgtcatccctcttattaat  
catcatcctagccctaagtctggcctatgagtgactacaa-3'

### **Standardplasmid COXI (267 bp):**

5'-atgttcgccgaccggtgactattctctacaaaccacaaagacattggaacactatacctatttcggcgcatgagctggag  
tcctaggcacagctctaagcctccttattcgagccgagctgggcccagccaggcaaccttctaggtaacgaccacatctacaa  
cgttatcgtcacagcccatgcaattgtaataatcttctcatagtaatacccatcataatcggaggctttggcaactgactagttccc  
ctaataatcgggtcc-3'

### **Standardplasmid CytB (225 bp):**

5'-gaaggctgttgctatagttgcaagcaggaggataatgccgatgttcaggttctgagtagagaaatgatccgtaatatagg  
cctcgcccgatgtgtaggaagaggcagataaagaatattgaggcgccattggcgtgaaggtagcgtgattcagccataatt  
tacgtctcgagtgatgtggcgattgatgaaaaggcggttgaggcgtctggtgagtagtg-3'

### **Standardplasmid SDHB (216 bp):**

5'-gaccttaataaatgtggcccatggtattggatgcttaatacaagattaagaatgaagttgactctactttgaccttccaaga  
tcatgcagagaaggcatctgtggctctgtgcaatgaacatcaatggaggcaacactctagctgcacccgaaggattgaca  
ccaacctcaataaggtctcaaaaatctaccctctccacacatgtatgtg-3'

### **Standardplasmid 18sRNA (431 bp):**

5'-aggactcttcgaggccctgtaattggaatgagtcactttaaactccttaacgaggatccattggagggcaagtctggtgc  
cagcagccgcggttaattccagctccaatagcgtatattaaagttgctgcagftaaaaagctcgtagttggatcttgggagcggg  
cgggcggtccgcccgcgaggcgcagccaccgcccgtccccgccctctcggcgccccctcgatgctcttagctgagtg  
cccgcggggcccgaagcgtttactttgaaaaaattagagtggtcaaagcaggcccgcgagccgctggataccgcagctagga  
ataatggaataggaccggttctatcttgggtttcggaaactgaggccatgattaagaggggacggccgggggacattcgtatt  
gcgcccctagaggtgaa-3'

601 650  
[a] AAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAAACAA  
[b] AAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAAACAA  
[c] AAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAAACAA  
[d] AAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAAACAA  
[e] AAGCAATACACTGAAAATGTTTAGACGGGCTCACATCACCCATAAAACAA

651 700  
[a] ATAGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGC  
[b] ATAGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGC  
[c] ATAGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGC  
[d] ATAGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGC  
[e] ATAGGTTTGGTCCTAGCCTTTCTATTAGCTCTTAGTAAGATTACACATGC

701 750  
[a] AAGCATCCCCGTTCCAGTGAGTTCACCTCTAAATCACCACGATCAAAAAG  
[b] AAGCATCCCCATTCCAGTGAGTTCACCTCTAAATCACCACGATCAAAAAG  
[c] AAGCATCCCCGTTCCAGTGAGTTCACCTCTAAATCACCACGATCAAAAAG  
[d] AAGCATCCCCATTCCAGTGAGTTCACCTCTAAATCACCACGATCAAAAAG  
[e] AAGCATCCCCGTTCCAGTGAGTTCACCTCTAAATCACCACGATCAAAAAG

751 800  
[a] GAACAAGCATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCC  
[b] GGACAAGCATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCC  
[c] GGACAAGCATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCC  
[d] GGACAAGCATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCC  
[e] GGACAAGCATCAAGCACGCAGCAATGCAGCTCAAAAACGCTTAGCCTAGCC

801 850  
[a] ACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGT  
[b] ACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGT  
[c] ACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGT  
[d] ACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGT  
[e] ACACCCCCACGGGAAACAGCAGTGATTAACCTTTAGCAATAAACGAAAAGT

851 900  
[a] TTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACC  
[b] TTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACC  
[c] TTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACC  
[d] TTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACC  
[e] TTAACTAAGCTATACTAACCCAGGGTTGGTCAATTTTCGTGCCAGCCACC

901 950  
[a] GCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGT  
[b] GCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGT  
[c] GCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGT  
[d] GCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGT  
[e] GCGGTCACACGATTAACCCAAGTCAATAGAAAGCCGGCGTAAAGAGTGT

951 1000  
[a] TAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACCTCACCTGAGTTGTAAAAA  
[b] TAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACCTCACCTGAGTTGTAAAAA  
[c] TAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACCTCACCTGAGTTGTAAAAA  
[d] TAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACCTCACCTGAGTTGTAAAAA  
[e] TAGATCACCCCTCCCCAATAAAGCTAAAACCTCACCTGAGTTGTAAAAA

1001 1050  
[a] CTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAAGTGGCTTTAACATATCTGAAC  
[b] CTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAAGTGGCTTTAACATATCTGAAC  
[c] CTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAAGTGGCTTTAACATATCTGAAC  
[d] CTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAAGTGGCTTTAACATATCTGAAC  
[e] CTCCAGTTGACACAAAATAGACTACGAAAAGTGGCTTTAACATATCTGAAC

1051 1100  
[a] ACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGC  
[b] ACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGC  
[c] ACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGC  
[d] ACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGC  
[e] ACACAATAGCTAAGACCCAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGC

1101 1150  
[a] CCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGA  
[b] CCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGA  
[c] CCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGA  
[d] CCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGA  
[e] CCTAAACCTCAACAGTTAAATCAACAAAACCTGCTCGCCAGAACACTACGA

1151 1200  
[a] GCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGA  
[b] GCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGA  
[c] GCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGA  
[d] GCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGA  
[e] GCCACAGCTTAAAACCTCAAAGGACCTGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGA

1201 1250  
[a] GGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCCGATCAACCTCACCACCTCTTGC  
[b] GGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCCGATCAACCTCACCACCTCTTGC  
[c] GGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCCGATCAACCTCACCACCTCTTGC  
[d] GGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCCGATCAACCTCACCACCTCTTGC  
[e] GGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAAACCCCGATCAACCTCACCACCTCTTGC

1251 1300  
[a] TCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGT  
[b] TCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGT  
[c] TCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGT  
[d] TCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGT  
[e] TCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTGATGAAGGCTACAAAGT

1301 1350  
[a] AAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG  
[b] AAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG  
[c] AAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG  
[d] AAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG  
[e] AAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGG

1351 1400  
[a] TGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTT  
[b] TGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTT  
[c] TGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTT  
[d] TGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTT  
[e] TGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACGATAGCCCTT

1401 1450  
[a] ATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTAAGAGTAGAGT  
[b] ATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTGAGAGTAGAGT  
[c] ATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTGAGAGTAGAGT  
[d] ATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTGAGAGTAGAGT  
[e] ATGAAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTGAGAGTAGAGT

1451 1500  
[a] GCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCC  
[b] GCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCC  
[c] GCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCC  
[d] GCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCC  
[e] GCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGCGTACACACCGCCCGTCACCCTCC

1501 1550  
[a] TCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATA  
[b] TCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATA  
[c] TCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATA  
[d] TCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATA  
[e] TCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATA

1551 1600  
[a] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACCTTGGACG  
[b] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACCTTGGACG  
[c] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACCTTGGACG  
[d] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACCTTGGACG  
[e] GAGGAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACCTTGGACG

1601 1650  
[a] AACCAGAGTGTAGCTTAAACACAAAGCACCCAACTTACACTTAGGAGATTT  
[b] AACCAGAGTGTAGCTTAAACACAAAGCACCCAACTTACACTTAGGAGATTT  
[c] AACCAGAGTGTAGCTTAAACACAAAGCACCCAACTTACACTTAGGAGATTT  
[d] AACCAGAGTGTAGCTTAAACACAAAGCACCCAACTTACACTTAGGAGATTT  
[e] AACCAGAGTGTAGCTTAAACACAAAGCACCCAACTTACACTTAGGAGATTT

1651 1700  
[a] CAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC  
[b] CAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC  
[c] CAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC  
[d] CAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC  
[e] CAACTTAACTTGACCGCTCTGAGCTAAACCTAGCCCCAAACCCACTCCAC

1701 1750  
[a] CTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATAAAGTATAGG  
[b] CTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATAAAGTATAGG  
[c] CTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATAAAGTATAGG  
[d] CTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATAAAGTATAGG  
[e] CTTACTACCAGACAACCTTAGCCAAACCATTTACCCAAATAAAGTATAGG

1751 1800  
[a] CGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACC GCAAGGGAAAGA  
[b] CGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACC GCAAGGGAAAGA  
[c] CGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACC GCAAGGGAAAGA  
[d] CGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACC GCAAGGGAAAGA  
[e] CGATAGAAATTGAAACCTGGCGCAATAGATATAGTACC GCAAGGGAAAGA

1801 1850  
[a] TGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTT  
[b] TGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTT  
[c] TGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTT  
[d] TGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTT  
[e] TGAAAAATTATAACCAAGCATAATATAGCAAGGACTAACCCCTATACCTT

1851 1900  
[a] CTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAA  
[b] CTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAA  
[c] CTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAA  
[d] CTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAA  
[e] CTGCATAATGAATTAAGTAACTAGAAATAACTTTGCAAGGAGAGCCAAAGCTAA

1901 1950  
[a] GACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCC  
[b] GACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCC  
[c] GACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCC  
[d] GACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCC  
[e] GACCCCGAAACCAGACGAGCTACCTAAGAACAGCTAAAAGAGCACACCC

1951 2000  
[a] GTCTATGTAGCAAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCT  
[b] GTCTATGTAGCAAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCT  
[c] GTCTATGTAGCAAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCT  
[d] GTCTATGTAGCAAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCT  
[e] GTCTATGTAGCAAAAATAGTGGGAAGATTTATAGGTAGAGGCGACAAACCT

2001 2050  
[a] ACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTT  
[b] ACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTT  
[c] ACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTT  
[d] ACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTT  
[e] ACCGAGCCTGGTGATAGCTGGTTGTCCAAGATAGAATCTTAGTTCAACTT

2051 2100  
[a] TAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAG  
[b] TAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAG  
[c] TAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAG  
[d] TAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAG  
[e] TAAATTTGCCACAGAACCCCTCTAAATCCCCTTGTAATTTAACTGTTAG

2101 2150  
[a] TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGA  
[b] TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGA  
[c] TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGA  
[d] TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGA  
[e] TCCAAAGAGGAACAGCTCTTTGGACACTAGGAAAAACCTTGTAGAGAGA

2151 2200  
[a] GTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA  
[b] GTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA  
[c] GTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA  
[d] GTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA  
[e] GTAAAAAATTTAACACCCATAGTAGGCCTAAAAGCAGCCACCAATTAAGA

2201 2250  
[a] AAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAACT  
[b] AAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAACT  
[c] AAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAACT  
[d] AAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAACT  
[e] AAGCGTTCAAGCTCAACACCCACTACCTAAAAATCCCAAACATATAACT

2251 2300  
[a] GAACTCCTCACACCCAATTGGACCAATCTATCACCTATAGAAGAACTAA  
[b] GAACTCCTCACACCCAATTGGACCAATCTATCACCTATAGAAGAACTAA  
[c] GAACTCCTCACACCCAATTGGACCAATCTATCACCTATAGAAGAACTAA  
[d] GAACTCCTCACACCCAATTGGACCAATCTATCACCTATAGAAGAACTAA  
[e] GAACTCCTCACACCCAATTGGACCAATCTATCACCTATAGAAGAACTAA

2301 2350  
[a] TGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTCTCCTCCGCATAAGCCTGCGTCA  
[b] TGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTCTCCTCCGCATAAGCCTGCGTCA  
[c] TGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTCTCCTCCGCATAAGCCTGCGTCA  
[d] TGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTCTCCTCCGCATAAGCCTGCGTCA  
[e] TGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTCTCCTCCGCATAAGCCTGCGTCA

2351 2400  
[a] GATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCA  
[b] GATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCA  
[c] GATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCA  
[d] GATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCA  
[e] GATTAAAACACTGAACTGACAATTAACAGCCCAATATCTACAATCAACCA

2401 2450  
[a] ACAAGTCATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAG  
[b] ACAAGTCATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAG  
[c] ACAAGTCATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAG  
[d] ACAAGTCATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAG  
[e] ACAAGTCATTATTACCCTCACTGTCAACCCAACACAGGCATGCTCATAAG

2451 2500  
[a] GAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAACTTTACCCCGCCTGTT  
[b] GAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAACTTTACCCCGCCTGTT  
[c] GAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAACTTTACCCCGCCTGTT  
[d] GAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAACTTTACCCCGCCTGTT  
[e] GAAAGGTTAAAAAAGTAAAAGGAACTCGGCAAACTTTACCCCGCCTGTT

2501 2550  
[a] TACCAAAAACATCACCTCTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCCGCTGCC  
[b] TACCAAAAACATCACCTCTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCCGCTGCC  
[c] TACCAAAAACATCACCTCTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCCGCTGCC  
[d] TACCAAAAACATCACCTCTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCCGCTGCC  
[e] TACCAAAAACATCACCTCTAGCATCACCCAGTATTAGAGGCACCCGCTGCC

2551 2600  
[a] CAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA  
[b] CAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA  
[c] CAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA  
[d] CAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA  
[e] CAGTGACACATGTTTAAACGGCCGCGGTACCCTAACCGTGCAAAGGTAGCA

2601 2650  
[a] TAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGT  
[b] TAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGT  
[c] TAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGT  
[d] TAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGT  
[e] TAATCACTTGTTCCCTTAAATAGGGACCTGTATGAATGGCTCCACGAGGGT

2651 2700  
[a] TCAGTGTCTCTTACTTTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG  
[b] TCAGTGTCTCTTACTTTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG  
[c] TCAGTGTCTCTTACTTTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG  
[d] TCAGTGTCTCTTACTTTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG  
[e] TCAGTGTCTCTTACTTTTTAACAGTGAAATTGACCTGCCCGTGAAGAGG

2701 2750  
[a] CGGGCATACACAGCAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAATTTATTA  
[b] CGGGCATGACACAGCAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAATTTATTA  
[c] CGGGCATGACACAGCAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAATTTATTA  
[d] CGGGCATGACACAGCAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAATTTATTA  
[e] CGGGCATGACACAGCAAGACGAGAAGACCCCTATGGAGCTTTAATTTATTA

2751 2800  
[a] ATGCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCA  
[b] ATGCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCA  
[c] ATGCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCA  
[d] ATGCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCA  
[e] ATGCAAACAGTACCTAACAAACCCACAGGTCCTAAACTACCAAACCTGCA

2801 2850  
[a] TTAAAAATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCA  
[b] TTAAAAATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCA  
[c] TTAAAAATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCA  
[d] TTAAAAATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCA  
[e] TTAAAAATTTTCGGTTGGGGCGACCTCGGAGCAGAACCCAACCTCCGAGCA

2851 2900  
[a] GTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGAT  
[b] GTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGAT  
[c] GTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGAT  
[d] GTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGAT  
[e] GTACATGCTAAGACTTCACCAGTCAAAGCGAACTACTATACTCAATTGAT

2901 2950  
[a] CCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC  
[b] CCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC  
[c] CCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC  
[d] CCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC  
[e] CCAATAACTTGACCAACGGAACAAGTTACCCTAGGGATAACAGCGCAATC

2951 3000  
[a] CTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT  
[b] CTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT  
[c] CTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT  
[d] CTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT  
[e] CTATTCTAGAGTCCATATCAACAATAGGGTTTACGACCTCGATGTTGGAT

3001 3050  
[a] CAGGACATCCCAGTGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTCTGTTTGTTC AACGA  
[b] CAGGACATCCCAGTGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTCTGTTTGTTC AACGA  
[c] CAGGACATCCCAGTGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTCTGTTTGTTC AACGA  
[d] CAGGACATCCCAGTGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTCTGTTTGTTC AACGA  
[e] CAGGACATCCCAGTGGTGCAGCCGCTATTAAAGGTTCTGTTTGTTC AACGA

3051 3100  
[a] TTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGTTT  
[b] TTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGTTT  
[c] TTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGTTT  
[d] TTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGTTT  
[e] TTAAAGTCTTACGTGATCTGAGTTCAGACCGGAGTAATCCAGGTCGGTTT

3101 3150  
[a] CTATCTACNTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC  
[b] CTATCTACTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC  
[c] CTATCTACTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC  
[d] CTATCTACTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC  
[e] CTATCTACTTCAAATTCCTCCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAAGGC

3151 3200  
[a] CTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTA  
[b] CTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTA  
[c] CTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTA  
[d] CTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGCA  
[e] CTACTTCACAAAGCGCCTTCCCCGTAATGATATCATCTCAACTTAGTA

3201 3250  
[a] TTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCG  
[b] TTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCG  
[c] TTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCG  
[d] TTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCG  
[e] TTATACCCACACCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGAGCCCG

3251 3300  
[a] GTAATCGCATAAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTC  
[b] GTAATCGCATAAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTC  
[c] GTAATCGCATAAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTC  
[d] GTAATCGCATAAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTC  
[e] GTAATCGCATAAAACTTAAAACCTTACAGTCAGAGGTTCAATTCCTCTTC

3301 3350  
[a] TTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTA  
[b] TTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTA  
[c] TTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTA  
[d] TTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTA  
[e] TTAACAACATACCCATGGCCAACCTCCTACTCCTCATTGTACCCATTCTA

3351 3400  
[a] ATCGCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATAT  
[b] ATCGCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATAT  
[c] ATCGCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATAT  
[d] ATCGCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATAT  
[e] ATCGCAATGGCATTCCCTAATGCTTACCGAACGAAAAATTCTAGGCTATAT

3401 3450  
[a] ACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAAC  
[b] ACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAAC  
[c] ACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAAC  
[d] ACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAAC  
[e] ACAACTACGCAAAGGCCCAACGTTGTAGGCCCTACGGGCTACTACAAC

3451 3500  
[a] CCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCC  
[b] CCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCC  
[c] CCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCC  
[d] CCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCC  
[e] CCTTCGCTGACGCCATAAACTCTTCACCAAAGAGCCCTAAAACCCGCC

3501 3550  
[a] ACATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCAT  
[b] ACATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCAT  
[c] ACATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCAT  
[d] ACATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCAT  
[e] ACATCTACCATCACCTCTACATCACCGCCCCGACCTTAGCTCTCACCAT

3551 3600  
[a] CGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCCCATAACCAACCCCTGGTCAACC  
[b] CGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCCCATAACCAACCCCTGGTCAACC  
[c] CGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCCCATAACCAACCCCTGGTCAACC  
[d] CGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCCCATAACCAACCCCTGGTCAACC  
[e] CGCTCTTCTACTATGAACCCCCCTCCCATAACCAACCCCTGGTCAACC

**3601** **3650**  
[a] TCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC  
[b] TCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC  
[c] TCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC  
[d] TCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC  
[e] TCAACCTAGGCCTCCTATTTATTCTAGCCACCTCTAGCCTAGCCGTTTAC

**3651** **3700**  
[a] TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGG  
[b] TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGG  
[c] TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGG  
[d] TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGG  
[e] TCAATCCTCTGATCAGGGTGAGCATCAAACCTCAAACCTACGCCCTGATCGG

**3701** **3750**  
[a] CGCACTGCGAGCAGTAGGCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCCTAGCCA  
[b] CGCACTGCGAGCAGTAGGCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCCTAGCCA  
[c] CGCACTGCGAGCAGTAGGCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCCTAGCCA  
[d] CGCACTGCGAGCAGTAGGCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCCTAGCCA  
[e] CGCACTGCGAGCAGTAGGCCAAAACAATCTCATATGAAGTCACCCCTAGCCA

**3751** **3800**  
[a] TCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTAACCTCTCCACC  
[b] TCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTAACCTCTCCACC  
[c] TCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTAACCTCTCCACC  
[d] TCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTAACCTCTCCACC  
[e] TCATTCTACTATCAACATTACTAATAAGTGGCTCCTTTAACCTCTCCACC

**3801** **3850**  
[a] CTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTT  
[b] CTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTT  
[c] CTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTT  
[d] CTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTT  
[e] CTTATCACAACACAAGAACACCTCTGATTACTCCTGCCATCATGACCCTT

**3851** **3900**  
[a] GGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTT  
[b] GGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTT  
[c] GGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTT  
[d] GGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTT  
[e] GGCCATAATATGATTTATCTCCACACTAGCAGAGACCAACCGAACCCCTT

**3901** **3950**  
[a] TCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAACCTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAA  
[b] TCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAACCTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAA  
[c] TCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAACCTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAA  
[d] TCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAACCTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAA  
[e] TCGACCTTGCCGAAGGGGAGTCCGAACCTAGTCTCAGGCTTCAACATCGAA

**3951** **4000**  
[a] TACGCCGCAGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAACAT  
[b] TACGCCGCAGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAACAT  
[c] TACGCCGCAGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAACAT  
[d] TACGCCGCAGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAACAT  
[e] TACGCCGCAGGCCCTTCGCCCTATTCTTCATAGCCGAATACACAAACAT

**4001** **4050**  
[a] TATTATAATAAACACCCTCACCCTACAATCTTCCTAGGAACAACATATG  
[b] TATTATAATAAACACCCTCACCCTACAATCTTCCTAGGAACAACATATG  
[c] TATTATAATAAACACCCTCACCCTACAATCTTCCTAGGAACAACATATG  
[d] TATTATAATAAACACCCTCACCCTACAATCTTCCTAGGAACAACATATG  
[e] TATTATAATAAACACCCTCACCCTACAATCTTCCTAGGAACAACATATG

**4051** **4100**  
[a] ACGCACTCTCCCTGAACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTA  
[b] ACGCACTCTCCCTGAACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTA  
[c] ACGCACTCTCCCTGAACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTA  
[d] ACGCACTCTCCCTGAACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTA  
[e] ACGCACTCTCCCTGAACTCTACACAACATATTTTGTACCAAGACCCTA

**4101** **4150**  
[a] CTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCATACCCCCGATTCCG  
[b] CTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCATACCCCCGATTCCG  
[c] CTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCATACCCCCGATTCCG  
[d] CTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCATACCCCCGATTCCG  
[e] CTTCTAACCTCCCTGTTCTTATGAATTGGAACAGCATACCCCCGATTCCG

**4151** **4200**  
[a] CTACGACCAACTCATAACCTCCTATGAAAAAATTCCTACCCTCACC  
[b] CTACGACCAACTCATAACCTCCTATGAAAAAATTCCTACCCTCACC  
[c] CTACGACCAACTCATAACCTCCTATGAAAAAATTCCTACCCTCACC  
[d] CTACGACCAACTCATAACCTCCTATGAAAAAATTCCTACCCTCACC  
[e] CTACGACCAACTCATAACCTCCTATGAAAAAATTCCTACCCTCACC

4201 4250  
[a] TAGCATTACTTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATT  
[b] TAGCATTACTTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATT  
[c] TAGCATTACTTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATT  
[d] TAGCATTACTTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATT  
[e] TAGCATTACTTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACAATCTCCAGCATT

4251 4300  
[a] CCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTCTGATAAAAAGAGTTACTTTTGATAGAG  
[b] CCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTCTGATAAAAAGAGTTACTTTTGATAGAG  
[c] CCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTCTGATAAAAAGAGTTACTTTTGATAGAG  
[d] CCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTCTGATAAAAAGAGTTACTTTTGATAGAG  
[e] CCCCCTCAAACCTAAGAAATATGTCTGATAAAAAGAGTTACTTTTGATAGAG

4301 4350  
[a] TAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGAATCGAA  
[b] TAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGAATCGAA  
[c] TAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGAATCGAA  
[d] TAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGAATCGAA  
[e] TAAATAATAGGAGCTTAAACCCCTTATTTCTAGGACTATGAGAATCGAA

4351 4400  
[a] CCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCC  
[b] CCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCC  
[c] CCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCC  
[d] CCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCC  
[e] CCCATCCCTGAGAATCCAAAATTCTCCGTGCCACCTATCACACCCCATCC

4401 4450  
[a] TAAAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTT  
[b] TAAAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTT  
[c] TAAAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTT  
[d] TAAAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTT  
[e] TAAAGTAAGGTCAGCTAAATAAGCTATCGGGCCCATACCCCGAAAATGTT

4451 4500  
[a] GGTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA  
[b] GGTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA  
[c] GGTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA  
[d] GGTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA  
[e] GGTATACCCCTTCCCGTACTAATTAATCCCCTGGCCCAACCCGTCATCTA

4501 4550  
[a] CTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT  
[b] CTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT  
[c] CTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT  
[d] CTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT  
[e] CTCTACCATCTTTGCAGGCACACTCATCACAGCGCTAAGCTCGCACTGAT

4551 4600  
[a] TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT  
[b] TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT  
[c] TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT  
[d] TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT  
[e] TTTTACCTGAGTAGGCCTAGAAATAAACATGCTAGCTTTTATTCCAGTT

4601 4650  
[a] CTAACCAAAAAAAAAATAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT  
[b] CTAACCAAAAAAAAAATAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT  
[c] CTAACCAAAAAAAAAATAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT  
[d] CTAACCAAAAAAAAAATAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT  
[e] CTAACCAAAAAAAAAATAACCCCTCGTTCCACAGAAGCTGCCATCAAGTATTT

4651 4700  
[a] CCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA  
[b] CCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA  
[c] CCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA  
[d] CCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA  
[e] CCTCACGCAAGCAACCGCATCCATAATCCTTCTAATAGCTATCCTCTTCA

4701 4750  
[a] ACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC  
[b] ACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC  
[c] ACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC  
[d] ACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC  
[e] ACAATATACTCTCCGGACAATGAACCATAACCAATACTACCAATCAATAC

4751 4800  
[a] TCATCATTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAAAAGTAGGAATAGCCCC  
[b] TCATCATTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAAAAGTAGGAATAGCCCC  
[c] TCATCATTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAAAAGTAGGAATAGCCCC  
[d] TCATCATTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAAAAGTAGGAATAGCCCC  
[e] TCATCATTAATAATCATAATAGCTATAGCAATAAAAAGTAGGAATAGCCCC

4801 4850  
[a] CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCG  
[b] CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCG  
[c] CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCG  
[d] CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCG  
[e] CTTTCACTTCTGAGTCCCAGAGGTTACCCAAGGCACCCCTCTGACATCCG

4851 4900  
[a] GCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATAC  
[b] GCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATAC  
[c] GCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATAC  
[d] GCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATAC  
[e] GCCTGCTTCTTCTCACATGACAAAACTAGCCCCATCTCAATCATATAC

4901 4950  
[a] CAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTT  
[b] CAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTT  
[c] CAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTT  
[d] CAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTT  
[e] CAAATCTCTCCCTCACTAAACGTAAGCCTTCTCCTCACTCTCTCAATCTT

4951 5000  
[a] ATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAACCCAGCTACGCA  
[b] ATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAACCCAGCTACGCA  
[c] ATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAACCCAGCTACGCA  
[d] ATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAACCCAGCTACGCA  
[e] ATCCATCATAGCAGGCAGTTGAGGTGGATTAAACCAAACCCAGCTACGCA

5001 5050  
[a] AAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCAGTT  
[b] AAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCAGTT  
[c] AAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCAGTT  
[d] AAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCAGTT  
[e] AAATCTTAGCATACTCCTCAATTACCCACATAGGATGAATAATAGCAGTT

5051 5100  
[a] CTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTAT  
[b] CTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTAT  
[c] CTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTAT  
[d] CTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTAT  
[e] CTACCGTACAACCCTAACATAACCATTCTTAATTTAACTATTTATATTAT

5101 5150  
[a] CCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGA  
[b] CCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGA  
[c] CCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGA  
[d] CCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGA  
[e] CCTAACTACTACCGCATTCTACTACTCAACTTAACTCCAGCACCACGA

5151 5200  
[a] CCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCTTA  
[b] CCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCTTA  
[c] CCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCTTA  
[d] CCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCTTA  
[e] CCCTACTACTATCTCGCACCTGAAACAAGCTAACATGACTAACACCCTTA

5201 5250  
[a] ATTCCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCCGGCTT  
[b] ATTCCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCCGGCTT  
[c] ATTCCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCCGGCTT  
[d] ATTCCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCCGGCTT  
[e] ATTCCATCCACCCTCCTCTCCCTAGGAGGCCTGCCCCGCTAACCCGGCTT

5251 5300  
[a] TTTGCCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCA  
[b] TTTGCCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCA  
[c] TTTGCCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCA  
[d] TTTGCCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCA  
[e] TTTGCCCAAATGGGCCATTATCGAAGAATTCACAAAAACAATAGCCTCA

5301 5350  
[a] TCATCCCCACCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTAC  
[b] TCATCCCCACCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTAC  
[c] TCATCCCCACCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTAC  
[d] TCATCCCCACCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTAC  
[e] TCATCCCCACCATCATAGCCACCATCACCTCCTTAACCTCTACTTCTAC

5351 5400  
[a] CTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAA  
[b] CTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAA  
[c] CTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAA  
[d] CTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAA  
[e] CTACGCCTAATCTACTCCACCTCAATCACACTACTCCCCATATCTAACAA

5401 5450  
[a] CGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCAATTCCTCC  
[b] CGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCAATTCCTCC  
[c] CGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCAATTCCTCC  
[d] CGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCAATTCCTCC  
[e] CGTAAAAATAAAATGACAGTTTGAACATACAAAACCCACCCCAATTCCTCC

5451 5500  
[a] CCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATA  
[b] CCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATA  
[c] CCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATA  
[d] CCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATA  
[e] CCACACTCATCGCCCTTACCACGCTACTCCTACCTATCTCCCTTTTATA

5501 5550  
[a] CTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAA  
[b] CTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAA  
[c] CTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAA  
[d] CTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAA  
[e] CTAATAATCTTATAGAAATTTAGGTTAAATACAGACCAAGAGCCTTCAAAA

5551 5600  
[a] GCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAA  
[b] GCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAA  
[c] GCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAA  
[d] GCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAA  
[e] GCCCTCAGTAAGTTGCAATACTTAATTTCTGTAACAGCTAAGGACTGCAA

5601 5650  
[a] AACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTA  
[b] AACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTA  
[c] AACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTA  
[d] AACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTA  
[e] AACCCCACTCTGCATCAACTGAACGCAAATCAGCCACTTTAATTAAGCTA

5651 5700  
[a] AGCCCTTACTAGACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAG  
[b] AGCCCTTACTAGACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAG  
[c] AGCCCTTACTAGACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAG  
[d] AGCCCTTACTAGACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAG  
[e] AGCCCTTACTAGACCAATGGGACTTAAACCCACAAACACTTAGTTAACAG

5701 5750  
[a] CTAAGCACCCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCCGCCGGGAA  
[b] CTAAGCACCCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCCGCCGGGAA  
[c] CTAAGCACCCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCCGCCGGGAA  
[d] CTAAGCACCCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCCGCCGGGAA  
[e] CTAAGCACCCCTAATCAACTGGCTTCAATCTACTTCTCCCGCCGCCGGGAA

5751 5800  
[a] AAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGC  
[b] AAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGC  
[c] AAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGC  
[d] AAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGC  
[e] AAAAGGCGGGAGAAGCCCCGGCAGGTTTGAAGCTGCTTCTTCGAATTTGC

5801 5850  
[a] AATTCAATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCT  
[b] AATTCAATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCT  
[c] AATTCAATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCT  
[d] AATTCAATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCT  
[e] AATTCAATATGAAAATCACCTCGGAGCTGGTAAAAAGAGGCCTAACCCCT

5851 5900  
[a] GTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTCACCCC  
[b] GTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTCACCCC  
[c] GTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTCACCCC  
[d] GTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTCACCCC  
[e] GTCTTTAGATTTACAGTCCAATGCTTCACTCAGCCATTTTACCTCACCCC

5901 5950  
[a] CACTGATGTTTCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATT  
[b] CACTGATGTTTCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATT  
[c] CACTGATGTTTCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATT  
[d] CACTGATGTTTCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATT  
[e] CACTGATGTTTCGCCGACCGTTGACTATTCTCTACAAACCACAAAGACATT

5951 6000  
[a] GGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCCCTAGGCACAGC  
[b] GGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCCCTAGGCACAGC  
[c] GGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCCCTAGGCACAGC  
[d] GGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCCCTAGGCACAGC  
[e] GGAACACTATACCTATTATTCGGCGCATGAGCTGGAGTCCCTAGGCACAGC

6001 6050  
[a] TCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAG  
[b] TCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAG  
[c] TCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAG  
[d] TCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAG  
[e] TCTAAGCCTCCTTATTTCGAGCCGAGCTGGGCCAGCCAGGCAACCTTCTAG

6051 6100  
[a] GTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTCACAGCCCATGCAATTTGTAATA  
[b] GTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTCACAGCCCATGCAATTTGTAATA  
[c] GTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTCACAGCCCATGCAATTTGTAATA  
[d] GTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTCACAGCCCATGCAATTTGTAATA  
[e] GTAACGACCACATCTACAACGTTATCGTCACAGCCCATGCAATTTGTAATA

6101 6150  
[a] ATCTTCTTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACT  
[b] ATCTTCTTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACT  
[c] ATCTTCTTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACT  
[d] ATCTTCTTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACT  
[e] ATCTTCTTCATAGTAATACCCATCATAATCGGAGGCTTTGGCAACTGACT

6151 6200  
[a] AGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACA  
[b] AGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACA  
[c] AGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACA  
[d] AGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACA  
[e] AGTTCCCCTAATAATCGGTGCCCGGATATGGCGTTTCCCCGCATAAACA

6201 6250  
[a] ACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCATCT  
[b] ACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCATCT  
[c] ACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCATCT  
[d] ACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCATCT  
[e] ACATAAGCTTCTGACTCTTACCTCCCTCTCTCCTACTCCTGCTCGCATCT

6251 6300  
[a] GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCTCCCTT  
[b] GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCTCCCTT  
[c] GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCTCCCTT  
[d] GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCTCCCTT  
[e] GCTATAGTGGAGGCCGGAGCAGGAACAGGTTGAACAGTCTACCTCCCTT

6301 6350  
[a] AGCAGGGAACACTACTCCCACCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCT  
[b] AGCAGGGAACACTACTCCCACCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCT  
[c] AGCAGGGAACACTACTCCCACCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCT  
[d] AGCAGGGAACACTACTCCCACCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCT  
[e] AGCAGGGAACACTACTCCCACCCTGGAGCCTCCGTAGACCTAACCATCTTCT

6351 6400  
[a] CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTTCATC  
[b] CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTTCATC  
[c] CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTTCATC  
[d] CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTTCATC  
[e] CCTTACACCTAGCAGGTGTCTCCTCTATCTTAGGGGCCATCAATTTTCATC

6401 6450  
[a] ACAACAATTATCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCAATACCAAACGCC  
[b] ACAACAATTATCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCAATACCAAACGCC  
[c] ACAACAATTATCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCAATACCAAACGCC  
[d] ACAACAATTATCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCAATACCAAACGCC  
[e] ACAACAATTATCAATATAAAAACCCCTGCCATAACCCAATACCAAACGCC

6451 6500  
[a] CCTCTTCGTCTGATCCGTCCCTAATCACAGCAGTCCTACTTCTCCTATCTC  
[b] CCTCTTCGTCTGATCCGTCCCTAATCACAGCAGTCCTACTTCTCCTATCTC  
[c] CCTCTTCGTCTGATCCGTCCCTAATCACAGCAGTCCTACTTCTCCTATCTC  
[d] CCTCTTCGTCTGATCCGTCCCTAATCACAGCAGTCCTACTTCTCCTATCTC  
[e] CCTCTTCGTCTGATCCGTCCCTAATCACAGCAGTCCTACTTCTCCTATCTC

6501 6550  
[a] TCCCAGTCCCTAGCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTC  
[b] TCCCAGTCCCTAGCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTC  
[c] TCCCAGTCCCTAGCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTC  
[d] TCCCAGTCCCTAGCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTC  
[e] TCCCAGTCCCTAGCTGCTGGCATCACTATACTACTAACAGACCGCAACCTC

6551 6600  
[a] AACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCATTCTATACCA  
[b] AACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCATTCTATACCA  
[c] AACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCATTCTATACCA  
[d] AACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCATTCTATACCA  
[e] AACACCACCTTCTTCGACCCCGCCGGAGGAGGAGACCCATTCTATACCA

6601 6650  
[a] ACACCTATTCTGATTTTTTCGGTCCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC  
[b] ACACCTATTCTGATTTTTTCGGTCCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC  
[c] ACACCTATTCTGATTTTTTCGGTCCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC  
[d] ACACCTATTCTGATTTTTTCGGTCCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC  
[e] ACACCTATTCTGATTTTTTCGGTCCACCCTGAAGTTTATATTCTTATCCTAC

6651 6700  
[a] CAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAAAAAA  
[b] CAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAAAAAA  
[c] CAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAAAAAA  
[d] CAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAAAAAA  
[e] CAGGCTTCGGAATAATCTCCCATATTGTAACCTACTACTCCGGAAAAAAA

6701 6750  
[a] GAACCATTTGGATACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTT  
[b] GAACCATTTGGATACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTT  
[c] GAACCATTTGGATACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTT  
[d] GAACCATTTGGATACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTT  
[e] GAACCATTTGGATACATAGGTATGGTCTGAGCTATGATATCAATTGGCTT

6751 6800  
[a] CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACG  
[b] CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACG  
[c] CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACG  
[d] CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACG  
[e] CCTAGGGTTTATCGTGTGAGCACACCATATATTTACAGTAGGAATAGACG

6801 6850  
[a] TAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCC  
[b] TAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCC  
[c] TAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCC  
[d] TAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCC  
[e] TAGACACACGAGCATATTTACCTCCGCTACCATAATCATCGCTATCCCC

6851 6900  
[a] ACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATAT  
[b] ACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATAT  
[c] ACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATAT  
[d] ACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATAT  
[e] ACCGGCGTCAAAGTATTTAGCTGACTCGCCACACTCCACGGAAGCAATAT

6901 6950  
[a] GAAATGATCTGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA  
[b] GAAATGATCTGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA  
[c] GAAATGATCTGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA  
[d] GAAATGATCTGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA  
[e] GAAATGATCTGCTGCAGTGCTCTGAGCCCTAGGATTCATCTTTCTTTTCA

6951 7000  
[a] CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGACATC  
[b] CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGACATC  
[c] CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGACATC  
[d] CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGACATC  
[e] CCGTAGGTGGCCTGACTGGCATTGTATTAGCAAACCTCATCACTAGACATC

7001 7050  
[a] GTACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTCCTATC  
[b] GTACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTCCTATC  
[c] GTACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTCCTATC  
[d] GTACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTCCTATC  
[e] GTACTACACGACACGTACTACGTTGTAGCTCACTTCCACTATGTCCTATC

7051 7100  
[a] AATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCCC  
[b] AATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCCC  
[c] AATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCCC  
[d] AATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCCC  
[e] AATAGGAGCTGTATTTGCCATCATAGGAGGCTTCATTCACTGATTTCCCC

7101 7150  
[a] TATTCTCAGGCTACACCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACT  
[b] TATTCTCAGGCTACACCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACT  
[c] TATTCTCAGGCTACACCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACT  
[d] TATTCTCAGGCTACACCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACT  
[e] TATTCTCAGGCTACACCCTAGACCAAACCTACGCCAAAATCCATTTCACT

7151 7200  
[a] ATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGG  
[b] ATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGG  
[c] ATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGG  
[d] ATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGG  
[e] ATCATATTCATCGGCGTAAATCTAACTTTCTTCCACAACACTTTCTCGG

7201 7250  
[a] CCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCA  
[b] CCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCA  
[c] CCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCA  
[d] CCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCA  
[e] CCTATCCGGAATGCCCCGACGTTACTCGGACTACCCCGATGCATACACCA

7251 7300  
[a] CATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCTCTAACAGCAGTA  
[b] CATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCTCTAACAGCAGTA  
[c] CATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCTCTAACAGCAGTA  
[d] CATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCTCTAACAGCAGTA  
[e] CATGAAACATCCTATCATCTGTAGGCTCATTCTCTAACAGCAGTA

7301 7350  
[a] ATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGT  
[b] ATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGT  
[c] ATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGT  
[d] ATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGT  
[e] ATATTAATAATTTTCATGATTTGAGAAGCCTTCGCTTCGAAGCGAAAAGT

7351 7400  
[a] CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCC  
[b] CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCC  
[c] CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCC  
[d] CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCC  
[e] CCTAATAGTAGAAGAACCCTCCATAAACCTGGAGTGACTATATGGATGCC

7401 7450  
[a] CCCCACCCTACCACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAA  
[b] CCCCACCCTACCACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAA  
[c] CCCCACCCTACCACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAA  
[d] CCCCACCCTACCACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAA  
[e] CCCCACCCTACCACACATTCGAAGAACCCTGATACATAAAATCTAGACAA

7451 7500  
[a] AAAAGGAAGGAATCGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG  
[b] AAAAGGAAGGAATCGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG  
[c] AAAAGGAAGGAATCGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG  
[d] AAAAGGAAGGAATCGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG  
[e] AAAAGGAAGGAATCGAACCCCAAGCTGGTTTCAAGCCAACCCCATGG

7501 7550  
[a] CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTG  
[b] CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTG  
[c] CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTG  
[d] CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTG  
[e] CCTCCATGACTTTTTCAAAAAGTATTAGAAAAACCATTTTCATAACTTTG

7551 7600  
[a] TCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAG  
[b] TCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAG  
[c] TCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAG  
[d] TCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAG  
[e] TCAAAGTTAAATTATAGGCTAAATCCTATATATCTTAATGGCACATGCAG

7601 7650  
[a] CGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATC  
[b] CGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATC  
[c] CGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATC  
[d] CGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATC  
[e] CGCAAGTAGGTCTACAAGACGCTACTTCCCCTATCATAGAAGAGCTTATC

7651 7700  
[a] ACCTTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTTCTTATCTGCTTCCTAGT  
[b] ACCTTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTTCTTATCTGCTTCCTAGT  
[c] ACCTTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTTCTTATCTGCTTCCTAGT  
[d] ACCTTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTTCTTATCTGCTTCCTAGT  
[e] ACCTTTTCATGATCAGCCCTCATAATCATTTTCTTATCTGCTTCCTAGT

7701 7750  
[a] CCTGTATGCCCTTTTCTTAACTCACAACAAAATAACTAATACTAACA  
[b] CCTGTATGCCCTTTTCTTAACTCACAACAAAATAACTAATACTAACA  
[c] CCTGTATGCCCTTTTCTTAACTCACAACAAAATAACTAATACTAACA  
[d] CCTGTATGCCCTTTTCTTAACTCACAACAAAATAACTAATACTAACA  
[e] CCTGTATGCCCTTTTCTTAACTCACAACAAAATAACTAATACTAACA

7751 7800  
[a] TCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATC  
[b] TCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATC  
[c] TCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATC  
[d] TCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATC  
[e] TCTCAGACGCTCAGGAAATAGAAACCGTCTGAACTATCCTGCCGCCATC

**7801** **7850**  
[a] ATCCTAGTCCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGA  
[b] ATCCTAGTCCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGA  
[c] ATCCTAGTCCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGA  
[d] ATCCTAGTCCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGA  
[e] ATCCTAGTCCTCATCGCCCTCCCATCCCTACGCATCCTTTACATAACAGA

**7851** **7900**  
[a] CGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGT  
[b] CGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGT  
[c] CGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGT  
[d] CGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGT  
[e] CGAGGTCAACGATCCCTCCCTTACCATCAAATCAATTGGCCACCAATGGT

**7901** **7950**  
[a] ACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTAC  
[b] ACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTAC  
[c] ACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTAC  
[d] ACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTAC  
[e] ACTGAACCTACGAGTACACCGACTACGGCGGACTAATCTTCAACTCCTAC

**7951** **8000**  
[a] ATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGT  
[b] ATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGT  
[c] ATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGT  
[d] ATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGT  
[e] ATACTTCCCCCATTATTCCCTAGAACCCAGGCGACCTGCGACTCCTTGACGT

**8001** **8050**  
[a] TGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAATAATTA  
[b] TGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAATAATTA  
[c] TGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAATAATTA  
[d] TGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAATAATTA  
[e] TGACAATCGAGTAGTACTCCCGATTGAAGCCCCCATTTCGTATAATAATTA

**8051** **8100**  
[a] CATCAACAAGACGCTTTGCACTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAA  
[b] CATCAACAAGACGCTTTGCACTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAA  
[c] CATCAACAAGACGCTTTGCACTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAA  
[d] CATCAACAAGACGCTTTGCACTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAA  
[e] CATCAACAAGACGCTTTGCACTCATGAGCTGTCCCCACATTAGGCTTAAAA

**8101** **8150**  
[a] ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCCTTTACCGCTACACG  
[b] ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCCTTTACCGCTACACG  
[c] ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCCTTTACCGCTACACG  
[d] ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCCTTTACCGCTACACG  
[e] ACAGATGCAATTCCCGGACGTCTAAACCAAACCCTTTACCGCTACACG

**8151** **8200**  
[a] ACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACA  
[b] ACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACA  
[c] ACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACA  
[d] ACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACA  
[e] ACCGGGGGTATACTACGGTCAATGCTCTGAAATCTGTGGAGCAAACCACA

**8201** **8250**  
[a] GTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATA  
[b] GTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATA  
[c] GTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATA  
[d] GTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATA  
[e] GTTTCATGCCCATCGTCCTAGAATTAATTCCCCTAAAAATCTTTGAAATA

**8251** **8300**  
[a] GGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACT  
[b] GGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCCCTCTA-----GAGCCCACT  
[c] GGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACT  
[d] GGGCCCGTATTTACCCTATAGCACCCCTCTACCCCTCTAGAGCCCACT  
[e] GGA-----GAGCCCACT

**8301** **8350**  
[a] GTAAAGCTAECTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAGAGAACC  
[b] GTAAAGCTAECTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAGAGAACC  
[c] GTAAAGCTAECTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAGAGAACC  
[d] GTAAAGCTAECTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAGAGAACC  
[e] GTAAAGCTAECTTAGCATTAACTTTTAAAGTTAAAGATTAAGAGAACC

**8351** **8400**  
[a] CACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACC  
[b] CACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACC  
[c] CACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACC  
[d] CACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACC  
[e] CACCTCTTTACAGTGAAATGCCCAACTAAATACTACCGTATGGCCACC

8401 8450  
[a] ATAATTACCCCCATACTCCTTACACTATTCTCATCACCCAACCTAAAAAT  
[b] ATAATTACCCCCATACTCCTTACACTATTCTCATCACCCAACCTAAAAAT  
[c] ATAATTACCCCCATACTCCTTACACTATTCTCATCACCCAACCTAAAAAT  
[d] ATAATTACCCCCATACTCCTTACACTATTCTCATCACCCAACCTAAAAAT  
[e] ATAATTACCCCCATACTCCTTACACTATTCTCATCACCCAACCTAAAAAT

8451 8500  
[a] ATTAAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAGCCCATAAAAATAA  
[b] ATTAAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAGCCCATAAAAATAA  
[c] ATTAAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAGCCCATAAAAATAA  
[d] ATTAAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAGCCCATAAAAATAA  
[e] ATTAAACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCAAAGCCCATAAAAATAA

8501 8550  
[a] AAAATTATAACAAACCCTGAGAACCAAAATGAACGAAAATCTGTTCGCTT  
[b] AAAATTATAACAAACCCTGAGAACCAAAATGAACGAAAATCTGTTCGCTT  
[c] AAAATTATAACAAACCCTGAGAACCAAAATGAACGAAAATCTGTTCGCTT  
[d] AAAATTATAACAAACCCTGAGAACCAAAATGAACGAAAATCTGTTCGCTT  
[e] AAAATTATAACAAACCCTGAGAACCAAAATGAACGAAAATCTGTTCGCTT

8551 8600  
[a] CATTCATTGCCCCACAAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATT  
[b] CATTCATTGCCCCACAAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATT  
[c] CATTCATTGCCCCACAAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATT  
[d] CATTCATTGCCCCACAAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATT  
[e] CATTCATTGCCCCACAAATCCTAGGCCCTACCCGCCGAGTACTGATCATT

8601 8650  
[a] CTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCG  
[b] CTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCG  
[c] CTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCG  
[d] CTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCG  
[e] CTATTTCCCCCTCTATTGATCCCCACCTCCAAATATCTCATCAACAACCG

8651 8700  
[a] ACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACCAAATGA  
[b] ACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACCAAATGA  
[c] ACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACCAAATGA  
[d] ACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACCAAATGA  
[e] ACTAATCACCACCCAACAATGACTAATCAAACCTCAAACCAAATGA

8701 8750  
[a] TAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCC  
[b] TAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCC  
[c] TAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCC  
[d] TAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCC  
[e] TAACCATACACAACACTAAAGGACGAACCTGATCTCTTATACTAGTATCC

8751 8800  
[a] TTAATCATTTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTC  
[b] TTAATCATTTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTC  
[c] TTAATCATTTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTC  
[d] TTAATCATTTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTC  
[e] TTAATCATTTTTTATTGCCACAACCTAACCTCCTCGGACTCCTGCCTCACTC

8801 8850  
[a] ATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCT  
[b] ATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCT  
[c] ATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCT  
[d] ATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCT  
[e] ATTTACACCAACCACCCAACCTATCTATAAACCTAGCCATGGCCATCCCCT

8851 8900  
[a] TAGGAGCGGGCCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCC  
[b] TAGGAGCGGGCCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCC  
[c] TAGGAGCGGGCCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCC  
[d] TAGGAGCGGGCCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCC  
[e] TAGGAGCGGGCCAGTGATTATAGGCTTTCGCTCTAAGATTAAAAATGCC

8901 8950  
[a] CTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT  
[b] CTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT  
[c] CTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT  
[d] CTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT  
[e] CTAGCCCACTTCTTACCACAAGGCACACCTACACCCCTTATCCCATACT

8951 9000  
[a] AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCG  
[b] AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCG  
[c] AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCG  
[d] AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCG  
[e] AGTTATTATCGAAACCATCAGCCTACTCATTCAACCAATAGCCCTGGCCG

9001 9050  
[a] TACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATT  
[b] TACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATT  
[c] TACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATT  
[d] TACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATT  
[e] TACGCCTAACCGCTAACATTACTGCAGGCCACCTACTCATGCACCTAATT

9051 9100  
[a] GGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTAT  
[b] GGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTAT  
[c] GGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTAT  
[d] GGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTAT  
[e] GGAAGCGCCACCCTAGCAATATCAACCATTAACCTTCCCTCTACACTTAT

9101 9150  
[a] CATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTCGCCT  
[b] CATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTCGCCT  
[c] CATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTCGCCT  
[d] CATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTCGCCT  
[e] CATCTTCACAATTCTAATTCTACTGACTATCCTAGAAATCGCTGTCGCCT

9151 9200  
[a] TAATCCAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGAC  
[b] TAATCCAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGAC  
[c] TAATCCAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGAC  
[d] TAATCCAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGAC  
[e] TAATCCAAGCCTACGTTTTTACACTTCTAGTAAGCCTCTACCTGCACGAC

9201 9250  
[a] AACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGC  
[b] AACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGC  
[c] AACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGC  
[d] AACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGC  
[e] AACACATAATGACCCACCAATCACATGCCTATCATATAGTAAAACCCAGC

9251 9300  
[a] CCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCT  
[b] CCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCT  
[c] CCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCT  
[d] CCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCT  
[e] CCATGACCCCTAACAGGGGCCCTCTCAGCCCTCCTAATGACCTCCGGCCT

9301 9350  
[a] AGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCCTAC  
[b] AGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCCTAC  
[c] AGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCCTAC  
[d] AGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCCTAC  
[e] AGCCATGTGATTTCACTTCCACTCCATAACGCTCCTCATACTAGGCCTAC

9351 9400  
[a] TAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAA  
[b] TAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAA  
[c] TAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAA  
[d] TAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAA  
[e] TAACCAACACACTAACCATATACCAATGATGGCGCGATGTAACACGAGAA

9401 9450  
[a] AGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATA  
[b] AGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATA  
[c] AGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATA  
[d] AGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATA  
[e] AGCACATACCAAGGCCACCACACACCACCTGTCCAAAAGGCCTTCGATA

9451 9500  
[a] CGGGATAATCCTATTTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTTCTTCGCAGGATTTT  
[b] CGGGATAATCCTATTTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTTCTTCGCAGGATTTT  
[c] CGGGATAATCCTATTTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTTCTTCGCAGGATTTT  
[d] CGGGATAATCCTATTTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTTCTTCGCAGGATTTT  
[e] CGGGATAATCCTATTTTATTACCTCAGAAGTTTTTTTTCTTCGCAGGATTTT

9501 9550  
[a] TCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAACTAGGAGGG  
[b] TCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAACTAGGAGGG  
[c] TCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAACTAGGAGGG  
[d] TCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAACTAGGAGGG  
[e] TCTGAGCCTTTTACCCTCCAGCCTAGCCCCTACCCCCCAACTAGGAGGG

9551 9600  
[a] CACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAAAGTCCCCT  
[b] CACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAAAGTCCCCT  
[c] CACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAAAGTCCCCT  
[d] CACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAAAGTCCCCT  
[e] CACTGGCCCCAACAGGCATCACCCCGCTAAATCCCCTAGAAAGTCCCCT

**9601** **9650**  
[a] CCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTC  
[b] CCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTC  
[c] CCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTC  
[d] CCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTC  
[e] CCTAAACACATCCGTATTACTCGCATCAGGAGTATCAATCACCTGAGCTC

**9651** **9700**  
[a] ACCATAGTCTAATAGAAAACAACCGAAACCAAATAATTCAAGCACTGCTT  
[b] ACCATAGTCTAATAGAAAACAACCGAAACCAAATAATTCAAGCACTGCTT  
[c] ACCATAGTCTAATAGAAAACAACCGAAACCAAATAATTCAAGCACTGCTT  
[d] ACCATAGTCTAATAGAAAACAACCGAAACCAAATAATTCAAGCACTGCTT  
[e] ACCATAGTCTAATAGAAAACAACCGAAACCAAATAATTCAAGCACTGCTT

**9701** **9750**  
[a] ATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA  
[b] ATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA  
[c] ATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA  
[d] ATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA  
[e] ATTACAATTTTACTGGGTCTCTATTTTACCCTCCTACAAGCCTCAGAGTA

**9751** **9800**  
[a] CTTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTT  
[b] CTTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTT  
[c] CTTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTT  
[d] CTTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTT  
[e] CTTTCGAGTCTCCCTTACCATTTCGACGGCATCTACGGCTCAACATTTT

**9801** **9850**  
[a] TTGTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCAATTATTGGCTCAACTTTC  
[b] TTGTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCAATTATTGGCTCAACTTTC  
[c] TTGTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCAATTATTGGCTCAACTTTC  
[d] TTGTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCAATTATTGGCTCAACTTTC  
[e] TTGTAGCCACAGGCTTCCACGGACTTCACGTCAATTATTGGCTCAACTTTC

**9851** **9900**  
[a] CTCACATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTACATCCAACA  
[b] CTCACATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTACATCCAACA  
[c] CTCACATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTACATCCAACA  
[d] CTCACATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTACATCCAACA  
[e] CTCACATCTGCTTCATCCGCCAACTAATATTTCACTTTACATCCAACA

**9901** **9950**  
[a] TCACTTTGGCTTCGAAGCCGCCCTGATACTGGCATTMTTGTAGATGTGG  
[b] TCACTTTGGCTTCGAAGCCGCCCTGATACTGGCATTMTTGTAGATGTGG  
[c] TCACTTTGGCTTCGAAGCCGCCCTGATACTGGCATTMTTGTAGATGTGG  
[d] TCACTTTGGCTTCGAAGCCGCCCTGATACTGGCATTMTTGTAGATGTGG  
[e] TCACTTTGGCTTCGAAGCCGCCCTGATACTGGCATTMTTGTAGATGTGG

**9951** **10000**  
[a] TTTTGACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTT  
[b] TTTTGACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTT  
[c] TTTTGACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTT  
[d] TTTTGACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTT  
[e] TTTTGACTATTTCTGTATGTCTCCATCTATTGATGAGGGTCTTACTCTTTT

**10001** **10050**  
[a] AGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAC TAGTTTTGACAACATTCA  
[b] AGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAC TAGTTTTGACAACATTCA  
[c] AGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAC TAGTTTTGACAACATTCA  
[d] AGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAC TAGTTTTGACAACATTCA  
[e] AGTATAAATAGTACCGTTAACTTCCAATTAAC TAGTTTTGACAACATTCA

**10051** **10100**  
[a] AAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCTCCTAG  
[b] AAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCTCCTAG  
[c] AAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCTCCTAG  
[d] AAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCTCCTAG  
[e] AAAAAGAGTAATAAACTTCGCCTTAATTTTAATAATCAACACCCTCCTAG

**10101** **10150**  
[a] CCTTACTACTAATAATTATTACATTTTGGACTACCACAACCTCAACGGCTAC  
[b] CCTTACTACTAATAATTATTACATTTTGGACTACCACAACCTCAACGGCTAC  
[c] CCTTACTACTAATAATTATTACATTTTGGACTACCACAACCTCAACGGCTAC  
[d] CCTTACTACTAATAATTATTACATTTTGGACTACCACAACCTCAACGGCTAC  
[e] CCTTACTACTAATAATTATTACATTTTGGACTACCACAACCTCAACGGCTAC

**10151** **10200**  
[a] ATAGAAAAATCCACCCTTACGAGTGC GGCTTCGACCCTATATCCCCCGC  
[b] ATAGAAAAATCCACCCTTACGAGTGC GGCTTCGACCCTATATCCCCCGC  
[c] ATAGAAAAATCCACCCTTACGAGTGC GGCTTCGACCCTATATCCCCCGC  
[d] ATAGAAAAATCCACCCTTACGAGTGC GGCTTCGACCCTATATCCCCCGC  
[e] ATAGAAAAATCCACCCTTACGAGTGC GGCTTCGACCCTATATCCCCCGC

10201 10250  
[a] CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTAT  
[b] CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTAT  
[c] CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTAT  
[d] CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTAT  
[e] CCGCGTCCCTTTCTCCATAAAATTCTTCTTAGTAGCTATTACCTTCTTAT

10251 10300  
[a] TATTTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCCTACAA  
[b] TATTTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCCTACAA  
[c] TATTTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCCTACAA  
[d] TATTTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCCTACAA  
[e] TATTTGATCTAGAAATTGCCCTCCTTTTACCCCTACCATGAGCCCTACAA

10301 10350  
[a] ACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCAT  
[b] ACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCAT  
[c] ACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCAT  
[d] ACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCAT  
[e] ACAACTAACCTGCCACTAATAGTTATGTCATCCCTCTTATTAATCATCAT

10351 10400  
[a] CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAA  
[b] CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAG  
[c] CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAG  
[d] CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAA  
[e] CCTAGCCCTAAGTCTGGCCTATGAGTGACTACAAAAAGGATTAGACTGAG

10401 10450  
[a] CCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAAT  
[b] CCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAAT  
[c] CCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAAT  
[d] CCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAAT  
[e] CCGAATTGGTATATAGTTTAAACAAAACGAATGATTTGACTCATTAAT

10451 10500  
[a] TATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATACT  
[b] TATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATACT  
[c] TATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATACT  
[d] TATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATACT  
[e] TATGATAATCATATTTACCAAATGCCCTCATTACATAAATATTATACT

10501 10550  
[a] AGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCA  
[b] AGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCA  
[c] AGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCA  
[d] AGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCA  
[e] AGCATTTACCATCTCACTTCTAGGAATACTAGTATATCGCTCACACCTCA

10551 10600  
[a] TATCCTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTCATTATA  
[b] TATCCTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTCATTATA  
[c] TATCCTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTCATTATA  
[d] TATCCTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTCATTATA  
[e] TATCCTCCCTACTATGCCTAGAAGGAATAATACTATCGCTGTTTCATTATA

10601 10650  
[a] GCTACTCTCATAACCCTCAACACCCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCC  
[b] GCTACTCTCATAACCCTCAACACCCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCC  
[c] GCTACTCTCATAACCCTCAACACCCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCC  
[d] GCTACTCTCATAACCCTCAACACCCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCC  
[e] GCTACTCTCATAACCCTCAACACCCACTCCCTCTTAGCCAATATTGTGCC

10651 10700  
[a] TATTGCCATACTAGTCTTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCC  
[b] TATTGCCATACTAGTCTTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCC  
[c] TATTGCCATACTAGTCTTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCC  
[d] TATTGCCATACTAGTCTTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCC  
[e] TATTGCCATACTAGTCTTTTGCCGCCTGCGAAGCAGCGGTGGGCCTAGCCC

10701 10750  
[a] TACTAGTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTA  
[b] TACTAGTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTA  
[c] TACTAGTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTA  
[d] TACTAGTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTA  
[e] TACTAGTCTCAATCTCCAACACATATGGCCTAGACTACGTACATAACCTA

10751 10800  
[a] AACCTACTCCAATGCTAAAACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCA  
[b] AACCTACTCCAATGCTAAAACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCA  
[c] AACCTACTCCAATGCTAAAACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCA  
[d] AACCTACTCCAATGCTAAAACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCA  
[e] AACCTACTCCAATGCTAAAACTAATCGTCCCAACAATTATATTACTACCA

10801 10850  
[a] CTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCACCCA  
[b] CTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCACCCA  
[c] CTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCACCCA  
[d] CTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCACCCA  
[e] CTGACATGACTTTCCAAAAACACATAATTTGAATCAACACAACCACCCA

10851 10900  
[a] CAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA  
[b] CAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA  
[c] CAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA  
[d] CAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA  
[e] CAGCCTAATTATTAGCATCATCCCTCTACTATTTTTTAACCAAATCAACA

10901 10950  
[a] ACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTCTCCGACCCCTAACAACC  
[b] ACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTCTCCGACCCCTAACAACC  
[c] ACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTCTCCGACCCCTAACAACC  
[d] ACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTCTCCGACCCCTAACAACC  
[e] ACAACCTATTTAGCTGTTCCCAACCTTTTCTCCGACCCCTAACAACC

10951 11000  
[a] CCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTACAATCATGGCAAG  
[b] CCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTACAATCATGGCAAG  
[c] CCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTACAATCATGGCAAG  
[d] CCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTACAATCATGGCAAG  
[e] CCCCTCCTAATACTAACTACCTGACTCCTACCCCTACAATCATGGCAAG

11001 11050  
[a] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACATACAGAAAAAACTCTACCTCT  
[b] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACATACAGAAAAAACTCTACCTCT  
[c] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACATACAGAAAAAACTCTACCTCT  
[d] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACATACAGAAAAAACTCTACCTCT  
[e] CCAACGCCACTTATCCAGTGAACCACATACAGAAAAAACTCTACCTCT

11051 11100  
[a] CTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTACAGCCACA  
[b] CTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTACAGCCACA  
[c] CTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTACAGCCACA  
[d] CTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTACAGCCACA  
[e] CTATACTAATCTCCCTACAAATCTCCTTAATTATAACATTACAGCCACA

11101 11150  
[a] GAACTAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAACCACACTTATCCCCACCTT  
[b] GAACTAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAACCACACTTATCCCCACCTT  
[c] GAACTAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAACCACACTTATCCCCACCTT  
[d] GAACTAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAACCACACTTATCCCCACCTT  
[e] GAACTAATCATATTTTATATCTTCTTCGAAACCACACTTATCCCCACCTT

11151 11200  
[a] GGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCA  
[b] GGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCA  
[c] GGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCA  
[d] GGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCA  
[e] GGCTATCATCACCCGATGAGGCAACCAGCCAGAACGCCTGAACGCAGGCA

11201 11250  
[a] CATACTTCCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCA  
[b] CATACTTCCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCA  
[c] CATACTTCCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCA  
[d] CATACTTCCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCA  
[e] CATACTTCCTATTCTACACCCTAGTAGGCTCCCTTCCCCTACTCATCGCA

11251 11300  
[a] CTAATTTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCAC  
[b] CTAATTTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCAC  
[c] CTAATTTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCAC  
[d] CTAATTTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCAC  
[e] CTAATTTTACACTCACAACACCCTAGGCTCACTAAACATTCTACTACTCAC

11301 11350  
[a] TCTCACTGCCCAAGAACTATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTTAATATGAC  
[b] TCTCACTGCCCAAGAACTATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTTAATATGAC  
[c] TCTCACTGCCCAAGAACTATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTTAATATGAC  
[d] TCTCACTGCCCAAGAACTATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTTAATATGAC  
[e] TCTCACTGCCCAAGAACTATCAAACCTCTGAGCCAACAACCTTAATATGAC

11351 11400  
[a] TAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCAC  
[b] TAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCAC  
[c] TAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCAC  
[d] TAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCAC  
[e] TAGCTTACACAATAGCTTTTATAGTAAAGATACCTCTTTACGGACTCCAC

11401 11450  
[a] TTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCTGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGT  
[b] TTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCTGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGT  
[c] TTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCTGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGT  
[d] TTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCTGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGT  
[e] TTATGACTCCCTAAAGCCCATGTCTGAAGCCCCCATCGCTGGGTCAATAGT

11451 11500  
[a] ACTTGCCGCAGTACTCTTTAAACTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCTCA  
[b] ACTTGCCGCAGTACTCTTTAAACTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCTCA  
[c] ACTTGCCGCAGTACTCTTTAAACTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCTCA  
[d] ACTTGCCGCAGTACTCTTTAAACTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCTCA  
[e] ACTTGCCGCAGTACTCTTTAAACTAGGCGGCTATGGTATAATACGCCTCA

11501 11550  
[a] CACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCCTTCCTTGTA  
[b] CACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCCTTCCTTGTA  
[c] CACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCCTTCCTTGTA  
[d] CACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCCTTCCTTGTA  
[e] CACTCATTCTCAACCCCTGACAAAACACATAGCCTACCCCTTCCTTGTA

11551 11600  
[a] CTATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAAC  
[b] CTATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAAC  
[c] CTATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAAC  
[d] CTATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAAC  
[e] CTATCCCTATGAGGCATAATTATAACAAGCTCCATCTGCCTACGACAAAC

11601 11650  
[a] AGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCG  
[b] AGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCG  
[c] AGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCG  
[d] AGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCG  
[e] AGACCTAAAATCGCTCATTGCATACTCTTCAATCAGCCACATAGCCCTCG

11651 11700  
[a] TAGTAACAGCCATTCTCATCAAACCCCTGAAGCTTACCCGGCGCAGTC  
[b] TAGTAACAGCCATTCTCATCAAACCCCTGAAGCTTACCCGGCGCAGTC  
[c] TAGTAACAGCCATTCTCATCAAACCCCTGAAGCTTACCCGGCGCAGTC  
[d] TAGTAACAGCCATTCTCATCAAACCCCTGAAGCTTACCCGGCGCAGTC  
[e] TAGTAACAGCCATTCTCATCAAACCCCTGAAGCTTACCCGGCGCAGTC

11701 11750  
[a] ATTCTCATAATCGCCACGGGCTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGC  
[b] ATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGC  
[c] ATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGC  
[d] ATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGC  
[e] ATTCTCATAATCGCCACGGACTTACATCCTCATTACTATTCTGCCTAGC

11751 11800  
[a] AAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAG  
[b] AAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAG  
[c] AAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAG  
[d] AAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAG  
[e] AAACCTCAAACCTACGAACGCACTCACAGTCGCATCATAATCCTCTCTCAAG

11801 11850  
[a] GACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTTGATGACTTCTAGCAAGC  
[b] GACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTTGATGACTTCTAGCAAGC  
[c] GACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTTGATGACTTCTAGCAAGC  
[d] GACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTTGATGACTTCTAGCAAGC  
[e] GACTTCAAACCTACTCCCACTAATAGCTTTTTGATGACTTCTAGCAAGC

11851 11900  
[a] CTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTC  
[b] CTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTC  
[c] CTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTC  
[d] CTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTC  
[e] CTCGCTAACCTCGCCTTACCCCCACTATTAACCTACTGGGAGAACTCTC

11901 11950  
[a] TGTGCTAGTAACCACGTTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAG  
[b] TGTGCTAGTAACCACATTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAG  
[c] TGTGCTAGTAACCACGTTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAG  
[d] TGTGCTAGTAACCACGTTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAG  
[e] TGTGCTAGTAACCACATTCTCCTGATCAAATATCACTCTCCTACTTACAG

11951 12000  
[a] GACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTTACATATTTACCACA  
[b] GACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTTACATATTTACCACA  
[c] GACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTTACATATTTACCACA  
[d] GACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTTACATATTTACCACA  
[e] GACTCAACATACTAGTCACAGCCCTATACTCCCTTACATATTTACCACA

12001 12050  
[a] ACACAATGGGGCTCACTCACCACCACATTAACAACATAAAAACCTCATT  
[b] ACACAATGGGGCTCACTCACCACCACATTAACAACATAAAAACCTCATT  
[c] ACACAATGGGGCTCACTCACCACCACATTAACAACATAAAAACCTCATT  
[d] ACACAATGGGGCTCACTCACCACCACATTAACAACATAAAAACCTCATT  
[e] ACACAATGAGGGCTCACTCACCACCACATTAACAACATAAAAACCTCATT

12051 12100  
[a] CACACGAGAAAACACCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCC  
[b] CACACGAGAAAACACCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCC  
[c] CACACGAGAAAACACCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCC  
[d] CACACGAGAAAACACCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCC  
[e] CACACGAGAAAACACCCTCATGTTTCATACACCTATCCCCATTCTCCTCC

12101 12150  
[a] TATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCCCTCTTGTAATATAGT  
[b] TATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCCCTCTTGTAATATAGT  
[c] TATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCCCTCTTGTAATATAGT  
[d] TATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCCCTCTTGTAATATAGT  
[e] TATCCCTCAACCCCGACATCATTACCGGGTTTTCCCTCTTGTAATATAGT

12151 12200  
[a] TTAACCAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAGGCTTACGACCCCT  
[b] TTAACCAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAGGCTTACGACCCCT  
[c] TTAACCAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAGGCTTACGACCCCT  
[d] TTAACCAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAGGCTTACGACCCCT  
[e] TTAACCAAAACATCAGATTGTGAATCTGACAACAGAGGCTTACGACCCCT

12201 12250  
[a] TATTTACCGAGAAAGCTCACAAAGAACTGCTAACTCATGCCCCATGTCTA  
[b] TATTTACCGAGAAAGCTCACAAAGAACTGCTAACTCATGCCCCATGTCTA  
[c] TATTTACCGAGAAAGCTCACAAAGAACTGCTAACTCATGCCCCATGTCTA  
[d] TATTTACCGAGAAAGCTCACAAAGAACTGCTAACTCATGCCCCATGTCTA  
[e] TATTTACCGAGAAAGCTCACAAAGAACTGCTAACTCATGCCCCATGTCTA

12251 12300  
[a] ACAACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTT  
[b] ACAACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTT  
[c] ACAACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTT  
[d] ACAACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTT  
[e] ACAACATGGCTTTCTCAACTTTTAAAGGATAACAGCTATCCATTGGTCTT

12301 12350  
[a] AGGCCCCAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCAC  
[b] AGGCCCCAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCAC  
[c] AGGCCCCAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCAC  
[d] AGGCCCCAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCAC  
[e] AGGCCCCAAAATTTTGGTGCAACTCCAAATAAAAGTAATAACCATGCAC

12351 12400  
[a] ACTACTATAACCAACCTAACCTGACTTCCCTAATFCCCCCATCCTTAC  
[b] ACTACTATAACCAACCTAACCTGACTTCCCTAATFCCCCCATCCTTAC  
[c] ACTACTATAACCAACCTAACCTGACTTCCCTAATFCCCCCATCCTTAC  
[d] ACTACTATAACCAACCTAACCTGACTTCCCTAATFCCCCCATCCTTAC  
[e] ACTACTATAACCAACCTAACCTGACTTCCCTAATFCCCCCATCCTTAC

12401 12450  
[a] CACCCTCGTTAACCTAACAAAAAAACTCATACCCCCATTATGTAAAAT  
[b] CACCCTCGTTAACCTAACAAAAAAACTCATACCCCCATTATGTAAAAT  
[c] CACCCTCGTTAACCTAACAAAAAAACTCATACCCCCATTATGTAAAAT  
[d] CACCCTCGTTAACCTAACAAAAAAACTCATACCCCCATTATGTAAAAT  
[e] CACCCTCGTTAACCTAACAAAAAAACTCATACCCCCATTATGTAAAAT

12451 12500  
[a] CCATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTC  
[b] CCATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTC  
[c] CCATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTC  
[d] CCATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTC  
[e] CCATTGTCGCATCCACCTTTATTATCAGTCTCTTCCCCACAACAATATTC

12501 12550  
[a] ATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAAC  
[b] ATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAAC  
[c] ATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAAC  
[d] ATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAAC  
[e] ATGTGCCTAGACCAAGAAGTTATTATCTCGAACTGACACTGAGCCACAAC

12551 12600  
[a] CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC TAGACTACTTCTCCATAA  
[b] CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC TAGACTACTTCTCCATAA  
[c] CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC TAGACTACTTCTCCATAA  
[d] CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC TAGACTACTTCTCCATAA  
[e] CCAAACAACCCAGCTCTCCCTAAGCTTCAAAC TAGACTACTTCTCCATAA

12601 12650  
[a] TATTCATCCCTGTAGCATTGTTTCGTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCA  
[b] TATTCATCCCTGTAGCATTGTTTCGTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCA  
[c] TATTCATCCCTGTAGCATTGTTTCGTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCA  
[d] TATTCATCCCTGTAGCATTGTTTCGTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCA  
[e] TATTCATCCCTGTAGCATTGTTTCGTTACATGGTCCATCATAGAATTCTCA

12651 12700  
[a] CTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTAATCAGTTCTTCAAATATCT  
[b] CTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTAATCAGTTCTTCAAATATCT  
[c] CTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTAATCAGTTCTTCAAATATCT  
[d] CTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTAATCAGTTCTTCAAATATCT  
[e] CTGTGATATATAAACTCAGACCCAAACATTAATCAGTTCTTCAAATATCT

12701 12750  
[a] ACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCCTAACAACCTAT  
[b] ACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCCTAACAACCTAT  
[c] ACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCCTAACAACCTAT  
[d] ACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCCTAACAACCTAT  
[e] ACTCATCTTCCCTAATTACCATACTAATCTTAGTTACCCTAACAACCTAT

12751 12800  
[a] TCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGCTC  
[b] TCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGCTC  
[c] TCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGCTC  
[d] TCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGCTC  
[e] TCCAACCTGTTTCATCGGCTGAGAGGGCGTAGGAATTATATCCTTCTTGCTC

12801 12850  
[a] ATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGC  
[b] ATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGC  
[c] ATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGC  
[d] ATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGC  
[e] ATCAGTTGATGATACGCCCCGAGCAGATGCCAACACAGCAGCCATTCAAGC

12851 12900  
[a] AATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCAT  
[b] AATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCAT  
[c] AATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCAT  
[d] AATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCAT  
[e] AATCCTATACAACCGTATCGGCGATATCGGTTTCATCCTCGCCTTAGCAT

12901 12950  
[a] GATTTATCCTTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTA  
[b] GATTTATCCTTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTA  
[c] GATTTATCCTTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTA  
[d] GATTTATCCTTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTA  
[e] GATTTATCCTTACACTCCAACCTCATGAGACCCACAACAAATAGCCCTTCTA

12951 13000  
[a] AACGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGC  
[b] AACGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGC  
[c] AACGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGC  
[d] AACGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGC  
[e] AACGCTAATCCAAGCCTCACCCCACTACTAGGCCTCCTCCTAGCAGCAGC

13001 13050  
[a] AGGCAAATCAGCCCAATTAGGTCTCCACCCCTGACTCCCCCTCAGCCATAG  
[b] AGGCAAATCAGCCCAATTAGGTCTCCACCCCTGACTCCCCCTCAGCCATAG  
[c] AGGCAAATCAGCCCAATTAGGTCTCCACCCCTGACTCCCCCTCAGCCATAG  
[d] AGGCAAATCAGCCCAATTAGGTCTCCACCCCTGACTCCCCCTCAGCCATAG  
[e] AGGCAAATCAGCCCAATTAGGTCTCCACCCCTGACTCCCCCTCAGCCATAG

13051 13100  
[a] AAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTA  
[b] AAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTA  
[c] AAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTA  
[d] AAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTA  
[e] AAGGCCCCACCCAGTCTCAGCCCTACTCCACTCAAGCACTATAGTTGTA

13101 13150  
[a] GCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCC  
[b] GCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCC  
[c] GCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCC  
[d] GCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCC  
[e] GCAGGAATCTTCTTACTCATCCGCTTCCACCCCTAGCAGAAAATAGCCC

13151 13200  
[a] ACTAATCCAACTCTAACAATATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCG  
[b] ACTAATCCAACTCTAACAATATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCG  
[c] ACTAATCCAACTCTAACAATATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCG  
[d] ACTAATCCAACTCTAACAATATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCG  
[e] ACTAATCCAACTCTAACAATATGCTTAGGCGCTATCACCCTCTGTTTCG

13201 13250  
[a] CAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTC  
[b] CAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTC  
[c] CAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTC  
[d] CAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTC  
[e] CAGCAGTCTGCGCCCTTACACAAAATGACATCAAAAAAATCGTAGCCTTC

13251 13300  
[a] TCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAA TAGTTACAATCGGCATCAACCA  
[b] TCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAA TAGTTACAATCGGCATCAACCA  
[c] TCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAA TAGTTACAATCGGCATCAACCA  
[d] TCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAA TAGTTACAATCGGCATCAACCA  
[e] TCCACTTCAAGTCAACTAGGACTCATAA TAGTTACAATCGGCATCAACCA

13301 13350  
[a] ACCACACCTAGCATTCTGTCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCA  
[b] ACCACACCTAGCATTCTGTCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCA  
[c] ACCACACCTAGCATTCTGTCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCA  
[d] ACCACACCTAGCATTCTGTCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCA  
[e] ACCACACCTAGCATTCTGTCACATCTGTACCCACGCCTTCTTCAAAGCCA

13351 13400  
[a] TACTATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAA  
[b] TACTATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAA  
[c] TACTATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAA  
[d] TACTATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAA  
[e] TACTATTTATGTGCTCCGGGTCCATCATCCACAACCTTAACAATGAACAA

13401 13450  
[a] GATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCATACCTCTCACTTCAAC  
[b] GATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCATACCTCTCACTTCAAC  
[c] GATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCATACCTCTCACTTCAAC  
[d] GATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCATACCTCTCACTTCAAC  
[e] GATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACCATACCTCTCACTTCAAC

13451 13500  
[a] CTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCACAG  
[b] CTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCACAG  
[c] CTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCACAG  
[d] CTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCACAG  
[e] CTCCCTCACCATTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTTCTCACAG

13501 13550  
[a] GTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATAACACA  
[b] GTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATAACACA  
[c] GTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATAACACA  
[d] GTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATAACACA  
[e] GTTTCTACTCCAAAGACCACATCATCGAAACCGCAAACATATCATAACACA

13551 13600  
[a] AACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGC  
[b] AACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGC  
[c] AACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGC  
[d] AACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGC  
[e] AACGCCTGAGCCCTATCTATTACTCTCATCGCTACCTCCCTGACAAGCGC

13601 13650  
[a] CTATAGCACTCGAATAATCTTCTCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC  
[b] CTATAGCACTCGAATAATCTTCTCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC  
[c] CTATAGCACTCGAATAATCTTCTCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC  
[d] CTATAGCACTCGAATAATCTTCTCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC  
[e] CTATAGCACTCGAATAATCTTCTCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTTCC

13651 13700  
[a] CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCAT  
[b] CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCAT  
[c] CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCAT  
[d] CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCAT  
[e] CCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCACCCCTACTAAACCCCAT

13701 13750  
[a] AAACGCCTGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGAGGATTTCTCATTACTAACA  
[b] AAACGCCTGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGAGGATTTCTCATTACTAACA  
[c] AAACGCCTGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGAGGATTTCTCATTACTAACA  
[d] AAACGCCTGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGAGGATTTCTCATTACTAACA  
[e] AAACGCCTGGCAGCCGGAAGCCTATTTCGAGGATTTCTCATTACTAACA

13751 13800  
[a] CATTTCCCCCGCATCCCCCTTCCAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAAC  
[b] CATTTCCCCCGCATCCCCCTTCCAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAAC  
[c] CATTTCCCCCGCATCCCCCTTCCAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAAC  
[d] CATTTCCCCCGCATCCCCCTTCCAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAAC  
[e] CATTTCCCCCGCATCCCCCTTCCAACAACAATCCCCCTCTACCTAAAAC

13801 13850  
[a] TCACAGCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTC  
[b] TCACAGCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTC  
[c] TCACAGCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTC  
[d] TCACAGCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTC  
[e] TCACAGCCCTCGCTGTCACTTTCCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTC

13851 13900  
[a] AACTACCTAACCAACAAACTTAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTA  
[b] AACTACCTAACCAACAAACTTAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTA  
[c] AACTACCTAACCAACAAACTTAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTA  
[d] AACTACCTAACCAACAAACTTAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTA  
[e] AACTACCTAACCAACAAACTTAAAATAAAATCCCCACTATGCACATTTTA

13901 13950  
[a] TTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCACACACCGCACAAATCC  
[b] TTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCACACACCGCACAAATCC  
[c] TTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCACACACCGCACAAATCC  
[d] TTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCACACACCGCACAAATCC  
[e] TTTCTCCAACATACTCGGATTCTACCCTAGCATCACACACCGCACAAATCC

13951 14000  
[a] CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCCTACTCCTCCTAGAC  
[b] CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCCTACTCCTCCTAGAC  
[c] CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCCTACTCCTCCTAGAC  
[d] CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCCTACTCCTCCTAGAC  
[e] CCTATCTAGGCCTTCTTACGAGCCAAAACCTGCCCCCTACTCCTCCTAGAC

14001 14050  
[a] CTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAT  
[b] CTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAT  
[c] CTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAT  
[d] CTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAT  
[e] CTAACCTGACTAGAAAAGCTATTACCTAAAACAATTTACAGCACCAAAT

14051 14100  
[a] CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACT  
[b] CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACT  
[c] CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACT  
[d] CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACT  
[e] CTCCACCTCCATCATCACCTCAACCCAAAAAGGCATAATTAACCTTTACT

14101 14150  
[a] TCCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA  
[b] TCCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA  
[c] TCCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA  
[d] TCCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA  
[e] TCCTCTCTTTCTTCTTCCCACTCATCCTAACCCCTACTCCTAATCACATAA

14151 14200  
[a] CCTATTTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATG  
[b] CCTATTTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATG  
[c] CCTATTTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATG  
[d] CCTATTTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATG  
[e] CCTATTTCCCCGAGCAATCTCAATTACAATATATACACCAACAAACAATG

14201 14250  
[a] TTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCC  
[b] TTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCC  
[c] TTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCC  
[d] TTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCC  
[e] TTCAACCAGTAACTACTACTAATCAACGCCATAATCATACAAAGCCCCC

14251 14300  
[a] GCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT  
[b] GCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT  
[c] GCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT  
[d] GCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT  
[e] GCACCAATAGGATCCTCCCGAATCAACCCTGACCCCTCTCCTTCATAAAT

14301 14350  
[a] TATTCAGCTTCTTACACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCAT  
[b] TATTCAGCTTCTTACACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCAT  
[c] TATTCAGCTTCTTACACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCAT  
[d] TATTCAGCTTCTTACACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCAT  
[e] TATTCAGCTTCTTACACTATTTAAAGTTTACCACAACCACCACCCCATCAT

14351 14400  
[a] ACTCTTTACCCACAGCACCATAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAA  
[b] ACTCTTTACCCACAGCACCATAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAA  
[c] ACTCTTTACCCACAGCACCATAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAA  
[d] ACTCTTTACCCACAGCACCATAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAA  
[e] ACTCTTTACCCACAGCACCATAATCCTACCTCCATCGCTAACCCCACTAAA



15001 15050  
[a] AATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCCTACACATCGGGCGAGG  
[b] AATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCCTACACATCGGGCGAGG  
[c] AATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCCTACACATCGGGCGAGG  
[d] AATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCCTACACATCGGGCGAGG  
[e] AATGGCGCCTCAATATTCTTTATCTGCCTCTTCCCTACACATCGGGCGAGG

15051 15100  
[a] CCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTA  
[b] CCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTA  
[c] CCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTA  
[d] CCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTA  
[e] CCTATATTACGGATCATTCTCTACTCAGAAACCTGAAACATCGGCATTA

15101 15150  
[a] TCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCTCCG  
[b] TCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCTCCG  
[c] TCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCTCCG  
[d] TCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCTCCG  
[e] TCCTCCTGCTTGCAACTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTATGTCTCTCCG

15151 15200  
[a] TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTTACTATC  
[b] TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTTACTATC  
[c] TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTTACTATC  
[d] TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTTACTATC  
[e] TGAGGCCAAATATCATTCTGAGGGGCCACAGTAATTACAAACTTACTATC

15201 15250  
[a] CGCCATCCCATAACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT  
[b] CGCCATCCCATAACATTGGGACAGACTCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT  
[c] CGCCATCCCATAACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT  
[d] CGCCATCCCATAACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT  
[e] CGCCATCCCATAACATTGGGACAGACCTAGTTCAATGAATCTGAGGAGGCT

15251 15300  
[a] ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC  
[b] ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC  
[c] ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC  
[d] ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC  
[e] ACTCAGTAGACAGTCCCACCCTCACACGATTCTTTACCTTTCACTTCATC

15301 15350  
[a] TTGCCCTTCATTATTGCAAGCCCTAGCAACTCCACCTCCTATTCTTGCA  
[b] TTGCCCTTCATTATTGCAAGCCCTAGCAGCACTCCACCTCCTATTCTTGCA  
[c] TTGCCCTTCATTATTGCAAGCCCTAGCAGCACTCCACCTCCTATTCTTGCA  
[d] TTGCCCTTCATTATTGCAAGCCCTAGCAGCACTCCACCTCCTATTCTTGCA  
[e] TTGCCCTTCATTATTGCAAGCCCTAGCAGCACTCCACCTCCTATTCTTGCA

15351 15400  
[a] CGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAA  
[b] CGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAA  
[c] CGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAA  
[d] CGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAA  
[e] CGAAACGGGATCAAACAACCCCTAGGAATCACCTCCCATTCCGATAAAA

15401 15450  
[a] TCACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTC  
[b] TCACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTC  
[c] TCACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTC  
[d] TCACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTC  
[e] TCACCTTCCACCCTTACTACACAATCAAAGACGCCCTCGGCTTACTTCTC

15451 15500  
[a] TTCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGG  
[b] TTCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGG  
[c] TTCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGG  
[d] TTCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGG  
[e] TTCCTTCTCTCCTTAATGACATTAACACTATTCTCACCAGACCTCCTAGG

15501 15550  
[a] CGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCACA  
[b] CGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCACA  
[c] CGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCACA  
[d] CGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCACA  
[e] CGACCCAGACAATTATACCCTAGCCAACCCCTTAAACACCCCTCCCACA

15551 15600  
[a] TCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTTCGCTACACAATTCTCCGATCCGTC  
[b] TCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTTCGCTACACAATTCTCCGATCCGTC  
[c] TCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTTCGCTACACAATTCTCCGATCCGTC  
[d] TCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTTCGCTACACAATTCTCCGATCCGTC  
[e] TCAAGCCCGAATGATATTTCCCTATTTCGCTACACAATTCTCCGATCCGTC

15601 15650  
[a] CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCT  
[b] CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCT  
[c] CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCT  
[d] CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCT  
[e] CCTAACAAACTAGGAGGCGTCCTTGCCCTATTACTATCCATCCTCATCCT

15651 15700  
[a] AGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTT  
[b] AGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTT  
[c] AGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTT  
[d] AGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTT  
[e] AGCAATAATCCCCATCCTCCATATATCCAAACAACAAAGCATAATATTTT

15701 15750  
[a] GCCCACTAAGCCAAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGAGACCTCCTCATT  
[b] GCCCACTAAGCCAAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGAGACCTCCTCATT  
[c] GCCCACTAAGCCAAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGAGACCTCCTCATT  
[d] GCCCACTAAGCCAAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGAGACCTCCTCATT  
[e] GCCCACTAAGCCAAATCACTTTATTGACTCCTAGCCGAGACCTCCTCATT

15751 15800  
[a] CTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGG  
[b] CTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGG  
[c] CTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGG  
[d] CTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGG  
[e] CTAACCTGAATCGGAGGACAACCAGTAAGCTACCCTTTTACCATCATTGG

15801 15850  
[a] ACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAA  
[b] ACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAA  
[c] ACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAA  
[d] ACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAA  
[e] ACAAGTAGCATCCGTACTATACTTCACAACAATCCTAATCCTAATACCAA

15851 15900  
[a] CTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTCTTTGTAGT  
[b] CTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTCTTTGTAGT  
[c] CTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTCTTTGTAGT  
[d] CTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTCTTTGTAGT  
[e] CTATCTCCCTAATTGAAAACAAAATACTCAAATGGGCCTGTCTTTGTAGT

15901 15950  
[a] ATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAA  
[b] ATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAA  
[c] ATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAA  
[d] ATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAA  
[e] ATAAACTAATACACCAGTCTTGTAACCCGGAGATGAAAACCTTTTTCCAA

15951 16000  
[a] GGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTA  
[b] GGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTA  
[c] GGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTA  
[d] GGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTA  
[e] GGACAAATCAGAGAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTA

16001 16050  
[a] AGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG  
[b] AGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG  
[c] AGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG  
[d] AGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG  
[e] AGATTCTAATTTAAACTATTCTCTGTCTTTTCATGGGGAAGCAGATTTGG

16051 16100  
[a] GTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTA  
[b] GTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTA  
[c] GTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTA  
[d] GTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTA  
[e] GTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACAACCGCTATGTATTTTCGTA

16101 16150  
[a] CATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTTGACC  
[b] CATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTTGACC  
[c] CATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTTGACC  
[d] CATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTTGACC  
[e] CATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAACTTTGACT

16151 16200  
[a] ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAA-AACCCCTCCCCATGC  
[b] ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAA-CCCCCCCCCCATGC  
[c] ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAA-ACC CCCCCCCCCATGC  
[d] ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAA-AACCCCTCCCCATGC  
[e] ACCTGTAGTACATAAAAACCCAATCCACATCAA-AATCC TACC CCCCCATGC

16201 16250  
 [a] TTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAA  
 [b] TTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACGGCAA  
 [c] TTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTATCACACATCAACTGCAA  
 [d] TTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCCTCAACTATCACACATCAACTGCAA  
 [e] TTACAAGCAAGTACAGCAATCAACCTTCAACTGTCACACATCAACTGCAA

16251 16300  
 [a] CTCCAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCT  
 [b] CTCCAAGCCACCCCTCCGCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCT  
 [c] CTCCAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCT  
 [d] CTCCAAGCTCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCT  
 [e] CTCCAAGCCACCCCTCACCCACTAGGATACCAACAAACCTACCCACCCCT

16301 16350  
 [a] TAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGT  
 [b] TAACAGTACATAGTACATAAATACCATTTACCGTACATAGCACATTACAGT  
 [c] TAACAGTACATAGTACATAAAGTCATTTACCGTACATAGCACATTACAGT  
 [d] TAACAGTACATAGTACATAAAGCCATTTACCGTACATAGCACATTACAGT  
 [e] TAACAGTACATAGTACATAAAGTCATTTACCGTACATAGCACATTACAGT

16351 16400  
 [a] CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT  
 [b] CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT  
 [c] CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT  
 [d] CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT  
 [e] CAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTCAGATAGGGGTCCCTT

16401 16450  
 [a] GACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCC  
 [b] GACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCC  
 [c] GACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCC  
 [d] GGACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCC  
 [e] GACCACCATCCTCCGTGAAATCAATATCCCGCACAAAGAGTGCTACTCTCC

16451 16500  
 [a] TCGCTCCGGGCCATAAACAACCTTGGGGGTAGCTAAAGTGAACGTGATCCGA  
 [b] TCGCTCCGGGCCATAAACAACCTTGGGGGTAGCTAAAGTGAACGTGATCCGA  
 [c] TCGCTCCGGGCCATAAACAACCTTGGGGGTAGCTAAAGTGAACGTGATCCGA  
 [d] TCGCTCCGGGCCATAAACAACCTTGGGGGTAGCTAAAGTGAACGTGATCCGA  
 [e] TCGCTCCGGGCCATAAACAACCTTGGGGGTAGCTAAAGTGAACGTGATCCGA

16501 16550  
 [a] CATCTGGTTCCTACTTCAGGGTCATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCC  
 [b] CATCTGGTTCCTACTTCAGGGCCATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCC  
 [c] CATCTGGTTCCTACTTCAGGGCCATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCC  
 [d] CATCTGGTTCCTACTTCAGGGTCATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCC  
 [e] CATCTGGTTCCTACTTCAGGGCCATAAAGCCTAAATAGCCACACGTTCC

Alignment derjenigen Sequenzen, die der real time RT-PCR zugrunde liegen. Die Nummerierung basiert auf der Sequenz [a]. Farblich hervorgehoben sind die in der real time PCR amplifizierten Zielsequenzen ND3, CytB und COXI

- [a] AB055387
- [b] X93334
- [c] D38112
- [d] Cambridge Reference Sequence
- [e] NC\_001807

## Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Gattermann, herzlich dafür danken, dass ich in seiner Arbeitsgruppe im Rahmen des DFG-geförderten Graduiertenkollegs 1033 („Molekulare Ziele von Alterungsprozessen und Ansatzpunkte der Alterungsprävention“) das Projekt zur mitochondrialen Alterung im hämatopoietischen System bearbeiten durfte.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Martin für seine Bereitschaft meine Arbeit zu betreuen.

An dieser Stelle bedanke ich mich auch ganz herzlich bei Frau Monika Pooten, Frau Bärbel Junge und Herrn Dr. Michael Wulfert, sowie allen Kolleginnen und Kollegen für das nette Arbeitsklima.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Boege und seiner Arbeitsgruppe - insbesondere Dr. Morten O. Christensen und Ilaria Dalla Rosa - bedanken, in dessen Labor ich die Zellkulturexperimente, sowie die Fluoreszenzmikroskopie durchführen durfte.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Warskulat und Herrn Dr. Schröder danke ich für: ihre Anregungen, Tipps, und alles was half.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Jessi und Tanja für die netten Praktika, Pausen, Abende, Partys usw. bedanken. Danke ihr zwei!

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meiner Familie. Meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich immer unterstützt und (manchmal: re) motiviert haben und dem unerschütterlichsten Optimisten ALLER Zeiten: meinem Mann Oliver.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 09.03.2007

Verena Schildgen