

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Januar 2003 (03.01.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/000717 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/00**

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/06964

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juni 2002 (24.06.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 30 247.9 22. Juni 2001 (22.06.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ELEGENE AG** [DE/DE]; Am Klopferspitz 19, 82152 Martinsried (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BAUMEISTER, Ralf** [DE/DE]; Freilandstrasse 44a, 82194 Gröbenzell (DE). **LAKOWSKI, Bernard** [DE/DE]; Kornweger Strasse 60, 81375 München (DE). **EIMER, Stefan** [DE/DE]; Stahleckplatz 1a, 81375 München (DE).

(74) Anwalt: **WIBBELMANN, Jobst**; Wuesthoff & Wuesthoff, Schweigerstrasse 2, 81541 München (DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: IDENTIFICATION OF SES-3 AND THE USES OF THE SAME

(54) Bezeichnung: IDENTIFIZIERUNG VON SES-3 SOWIE DESSEN VERWENDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to isolated nucleic acid molecules coding for SES-3 proteins or muted SES-3 proteins, and vectors and transgenic organisms containing such nucleic acid molecules. The invention also relates to uses of such nucleic acid molecules or others which are functionally similar, for producing pharmaceuticals and for producing model organisms. The invention further relates to the corresponding SES-3 proteins and muted SES-3 proteins, and the antibodies induced thereby. Finally, the invention relates to the use of substances which increase the expression of human presenilin, for the treatment of Alzheimer's disease, in addition to said substances themselves and pharmaceutical compositions containing the same.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die für SES-3 Proteine bzw. mutierte SES-3 Proteine codieren, Vektoren und transgene Organismen, welche solche Nukleinsäuremoleküle enthalten, Verwendungen solcher Nukleinsäuremoleküle oder funktional ähnlicher zur Herstellung von Arzneimitteln sowie zur Erzeugung von Modellorganismen und die entsprechenden SES-3 Proteine und mutierte SES-3 Proteine sowie damit hervorgerufene Antikörper. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die Expression von humanen Presenilin steigern, zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, sowie diese Substanzen selbst und pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Substanzen enthalten.



WO 03/000717 A2

Identifizierung von *ses-3* sowie dessen Verwendungen

5 Die vorliegende Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die für *ses-3* bzw. mutierte *ses-3* codieren, Vektoren und transgene Organismen, welche solche Nukleinsäuremoleküle enthalten, Verwendungen solcher Nukleinsäuremoleküle oder funktional ähnlicher zur Herstellung von Arzneimitteln sowie
10 zur Erzeugung von Modellorganismen, die Verwendung von transgenen Organismen in Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, welche die *ses-3* Aktivität verändern resp. die Presenilin Aktivität (z.B. die von *sel-12* oder *hop-1*) steigern, und die entsprechenden SES-3 Proteine und mutierte SES-3 Proteine sowie
15 damit hervorgerufene Antikörper. Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die Expression eines humanen Presenilin steigern, zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, sowie diese Substanzen selbst und pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Substanzen enthalten.

Hintergrund der Erfindung

Die Alzheimer'sche Krankheit ist neben der Parkinsonschen Krankheit die bekannteste neurodegenerative Erkrankung. Das
25 charakteristische Merkmal der Alzheimer'schen Erkrankung ist die Entwicklung neuronaler Proteinaggregationen, sogenannter Plaques, die im wesentlichen aus einem unlöslichen, 4 kDa großen Peptid namens Amyloid Beta-Peptide (A β 4) bestehen. Untersuchungen der letzten Jahre deuten darauf hin, dass die
30 Bildung von A β 4 ursächlich an der Entstehung der Krankheit beteiligt ist. Dominante Mutationen in drei Genen verursachen familiäre Formen der Erkrankung (FAD Familial Alzheimer's Disease). Es wurde gefunden, dass eines der betroffenen Gene für das Amyloid Precursor Protein (APP) kodiert, das durch drei
35 Proteasen prozessiert werden kann, wobei unter anderem A β 4 entsteht. FAD Mutationen in APP erhöhen die Produktionsmenge von A β 42, einer 42 Aminosäure langen Variante von A β 4.

- 2 -

Molekulargenetische Untersuchungen von Familien, in denen die Alzheimer'sche Krankheit auftrat, haben zu der Identifizierung der humanen Gene Presenilin 1 und Presenilin 2 geführt (Rogaev
5 et al. 1995, Nature 376, 775-778; Levy-Lahad, E. et al. 1995, Science 269: 973-977), die, durch bestimmte Mutationen verändert, ursächlich am Ausbruch der Alzheimer'schen Krankheit beteiligt sind und welche außerdem während der Entwicklung eine Schlüsselrolle in dem Notch-Signaltransduktionsweg spielen.

10 Presenilinproteine sind ER-Golgi lokalisiert und besitzen mindestens 6 Transmembrandomänen. Es wurde gefunden, dass Mutationen in PS1 und PS2 die Bildung von A β 4 beeinflussen und an der Verursachung der Alzheimer'schen Erkrankung beteiligt sind, vermutlich über die Entstehung von Amyloidablagerungen.

15 Mitglieder der Presenilinfamilie wurden unter anderem in Maus, *Drosophila melanogaster*, *Xenopus laevis* und im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* identifiziert. Obwohl mutierte Preseniline die Prozessierung von APP im Menschen beeinflussen, ist ihre natürliche Funktion dort nicht detailliert bekannt; eine Funktion als APP-Protease (gamma-Sekretase) wurde postuliert. Aus
20 weiteren Untersuchungen mit menschlichen Zellkulturen ergaben sich Hinweise darauf, dass Preseniline bei der intrazellulären Proteolyse von Notch-ähnlichen Rezeptoren nach deren Aktivierung durch Ligandenbindung eine Rolle spielen. Daher wird
25 angenommen, dass die Preseniline bei der Prozessierung von mindestens zwei unterschiedlichen Membranproteinen (APP und Notch) beteiligt sind. Es wird gegenwärtig kontrovers diskutiert, ob die Preseniline selbst die Proteasen in dieser Prozessierung sind, oder ob sie Kofaktoren dieser Reaktionen sind
30 oder die Proteolyse indirekt beeinflussen (Haass, C. et al. 1999, Science 286 (5441): 916-919).

Ausgehend von den erwähnten Presenilin-Genen wird intensiv geforscht, um die molekularen Erkrankungsprozesse aufzuklären
35 und um Arzneimittel für die Behandlung und Prävention der Alzheimer'schen Krankheit zu entwickeln. Insbesondere wird dabei nach Faktoren gesucht, die die Aktivität der Presenilin-Gene

- 3 -

beeinflussen. Dabei kommt der Suche nach Suppressoren des Presenilin-Mutanten Phänotyps eine besondere Bedeutung zu. Suppressoren können Mutationen in anderen Genen sein, die die Notwendigkeit der Presenilinfunktion eliminieren, oder es können Substanzen sein, die die Aktivität anderer Gene oder der Preseniline modulieren, so dass der Presenilin-Mutanten-Defekt keine phänotypischen Auswirkungen hat.

Als ein bevorzugter Modellorganismus wurde bei solchen Untersuchungen vielfach ein Nematode, insbesondere *Caenorhabditis elegans* eingesetzt. Der Vorteil eines Nematodenmodells, insbesondere des *C. elegans*-Modells, besteht vor allem in der Eignung für ein Hochdurchsatzverfahren (HTS; High-Throughput-Screening), der Möglichkeit einer schnelleren genetischen Analyse durch geringere Generationszeit (2-3 Tage) und einem detaillierterem Wissen über molekulare und funktionelle Eigenschaften des Nervensystems in *C. elegans*.

Da *C. elegans* in Mikrotiterplatten gehalten werden kann, können mit diesem Testsystem 10.000 und mehr Substanzen in kurzer Zeit per HTS am lebenden Wurm ausgetestet werden.

Im Fadenwurm *C. elegans* wurden bisher drei Presenilingene namens *sel-12*, *hop-1* und *spe-4* identifiziert. *Spe-4* ist das divergenteste Mitglied der Familie. Mutationen in *spe-4* führen zu einem Defekt der cytoplasmatischen Partitionierung während der Spermatogenese (L'Hernault, S. W. et al. 1992, J Cell Biol 119: 55-68). Mutationen in *hop-1* haben keinen sichtbaren Phänotyp, führen aber in Kombination mit Mutationen in *sel-12* zu einem synthetisch letalen Phänotyp (Li, X. et al. 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94: 12204-12209). *Sel-12* ähnelt den menschlichen PS1 und PS2 am stärksten und ist auch das am besten studierte Presenilingen in *C. elegans*. Es wurde gefunden, daß bestimmte *sel-12* Mutanten einen Eiablagedefekt aufweisen und morphologische Veränderungen der Vulva-Entwicklung zeigen (Levitan, D. et al. 1995, Nature 377: 351-4). *Sel-12* ist 50 % identisch zu humanen Presenilinen und der Eiablagedefekt von *sel-12* Mutanten lässt sich durch transgene Expression von PS1

- 4 -

oder PS2 vom *sel-12* Promoter aus kompensieren (Baumeister et al., 1997, Genes and Function 1: 149-159). Dies zeigt, dass PS1 und PS2 funktionelle Homologie zu *sel-12* aufweisen. *Sel-12* Mutationen wurden zuerst als Suppressoren des Multivulva Phänotyps einer Funktionsgewinnmutante (gain-of-function) im *lin-12* und *glp-1* Notch Rezeptor-Gen identifiziert. Notch Rezeptoren kontrollieren die Determinierung von Zellschicksalen in vielen mehrzelligen Organismen. Außerdem wurde gezeigt, dass der Phänotyp von *sel-12* Mutanten dem von schwachen Funktionsverlust-Mutanten von *lin-12* ähnelt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Preseniline bei der Notch Signaltransduktion in zahlreichen Organismen, einschließlich den Säugern, eine wichtige Rolle spielen.

Zusammenfassung der Erfindung

Die gegenwärtigen Erfinder haben nun überraschend festgestellt, dass bestimmte Mutationen in einem weiteren Gen, dem von den Erfindern erstmals identifizierten *ses-3*-Gen von *C. elegans*, einen Defekt, insbesondere den Eiablagedefekt einer *sel-12*-Mutante unterdrücken können. Diese Mutationen zeichnen sich dadurch aus, dass sie die Expression oder Aktivität von *ses-3* verändern, insbesondere vermindern. Das heißt, bestimmte Mutationen in dem *ses-3*-Gen führen dazu, dass z.B. der Eiablagedefekt, der durch bestimmte *sel-12*-Mutationen verursacht wird, behoben wird und die Doppelmutanten (*sel-12⁻; ses-3⁻*) wieder einen normalen Wildtyp-Phänotyp zeigen. Genauere Untersuchungen ergaben, daß diese Mutationen in dem *ses-3*-Gen bei den *sel-12*-Mutanten zu einer Aktivierung von *hop-1* führen, d.h. das *hop-1* Presenilin-Protein übernimmt die Funktion des defekten *sel-12* Presenilin-Proteins (Figur 1).

Die gegenwärtigen Erfinder haben das neue *ses-3*-Gen auf dem Genom von *C. elegans* lokalisiert und sequenziert.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung zunächst ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für SES-3 Protein codiert, sowie

- 5 -

weitere Nukleinsäuremoleküle, die für mutierte SES-3 Proteine codieren.

5 Darüber hinaus betrifft die Erfindung einen Vektor, der solche isolierten Nukleinsäuremoleküle oder Fragmente davon umfasst.

Weiterhin betrifft die Erfindung die von den Nukleinsäuremolekülen codierten SES-3 Proteine und mutierte SES-3-Proteine oder Fragmente davon sowie Antikörper, die mit Hilfe dieser Proteine
10 erzeugt wurden.

Außerdem betrifft die Erfindung einen transgenen nichtmenschlichen Organismus, welcher ein isoliertes, für SES-3-Protein- oder mutierte SES-3 Protein codierendes Nukleinsäuremolekül
15 umfasst. Insbesondere betrifft die Erfindung transgene *C. elegans*, die ein *ses-3* Allel aufweisen, das die Aktivität von *ses-3* vermindert resp. die Aktivität von *sel-12* oder *hop-1* steigert. In diesem Zusammenhang werden unter transgenen Organismen auch solche Organismen verstanden, bei denen das Genom
20 durch Mutation verändert wurde, und die dadurch ein mutiertes *ses-3* Gen aufweisen, oder denen das *ses-3* Gen entfernt worden ist.

Schließlich betrifft die Erfindung Verwendungen solcher Nukleinsäuremoleküle zur Herstellung eines Arzneimittels gegen die
25 Alzheimer'sche Krankheit sowie zur Erzeugung von Modellsystemen zur weiteren Erforschung dieser Erkrankung.

Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von transgenen *C. elegans* in einem Verfahren zur Identifizierung und/oder
30 Charakterisierung von Substanzen, die die Aktivität von *ses-3* vermindern resp. die Aktivität von *sel-12* oder *hop-1* steigern.

Zudem betrifft die Erfindung auch die Verwendung von homologen humanen Genen, homologen *Drosophila melanogaster* Genen oder
35 Genen, die eine funktionale Ähnlichkeit zu *ses-3* aufweisen, zur Herstellung eines Arzneimittels gegen die Alzheimer'sche Krank-

- 6 -

heit sowie zur Erzeugung von Modellsystemen zur weiteren Erforschung dieser Erkrankung.

Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Substanzen, die die Expression des humanen Presenilin 1 oder 2 steigern, zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, sowie diese Substanzen selbst und pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Substanzen enthalten.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die vorliegende Erfindung basiert darauf, dass ein neues Gen, *ses-3*, in *C. elegans* identifiziert werden konnte, welches mit den *C. elegans*-Presenilin-Genen *sel-12* und *hop-1* wechselwirkt und damit eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Alzheimer'schen Krankheit spielt.

So führten verschiedene Mutationen in dem *ses-3*-Gen, darunter auch die vollständige Deletion des *ses-3*-Gens, dazu, dass bestimmte von *sel-12*-Mutationen hervorgerufene veränderte Phänotypen supprimiert bzw. unterdrückt wurden. Die Suppression solcher *sel-12*-Defekte in *ses-3*-Mutanten wird dadurch erreicht, dass sie die Expression von *hop-1* deutlich dereprimieren und das HOP-1 Protein vermutlich die Funktion des defekten *sel-12*-Proteins übernehmen kann.

Das identifizierte *ses-3*-Gen codiert für ein Protein, das eine FAD Bindestelle zwischen Aminosäure 137 und Aminosäure 264 enthält sowie ein Amino-Oxidase-Motiv zwischen Aminosäure 264 und Aminosäure 677 (Figur 2). Das SES-3 Protein zeigt phylogenetische Verwandtschaft zu dem humanen Protein KIAA0601 und zu dem *Drosophila melanogaster* Protein ALT1, außerdem wurde durch Computerrecherche (BLAST Suchprogramm) ein Gen für ein weiteres, ähnliches *C. elegans* Protein T08D10.2 identifiziert. Der Grad der Homologie ist in den Figuren 3 und 4 beschrieben.

Somit stellt die vorliegende Erfindung ein isoliertes Nukleinsäuremolekül zur Verfügung, das für SES-3-Protein codiert.

- 7 -

Weiterhin umfasst die Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die für mutierte SES-3 Proteine codieren. Insbesondere werden isolierte Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung gestellt, die für mutierte SES-3 Proteine codieren.

Darüber hinaus betreffen weitere Aspekte der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, insbesondere DNA-, wie cDNA- oder genomische DNA-Moleküle, aber auch z.B. RNA-Moleküle, die ein SES-3 Protein aus *C. elegans* mit der in SEQ ID NR:1 angegebenen Aminosäuresequenz codieren, insbesondere jene, die eine in SEQ ID NR:2 angegebene Nukleinsäuresequenz aufweisen.

Von der Erfindung ebenfalls umfasst werden auch isolierte Nukleinsäuremoleküle, deren Nukleotidsequenz mindestens 75%, insbesondere mindestens 80%, speziell mindestens 85%, bevorzugt mindestens 90%, besonders bevorzugt mindestens 95% und am meisten bevorzugt mindestens 98% Sequenzähnlichkeit zu den erwähnten Nukleinsäuremolekülen aufweisen, insbesondere solche, die unter stringenten Bedingungen mit den erwähnten Nukleinsäuremolekülen hybridisieren. Vorzugsweise erfolgt eine solche Hybridisierung unter niedrig stringenten Bedingungen, in einer weiteren Ausführungsform auch bei hochstringenten Bedingungen. Im Rahmen dieser Beschreibung wird unter niedrig stringenten Bedingungen eine Hybridisierung in 3 x SSC bei Raumtemperatur bis 65°C und unter hochstringenten Bedingungen eine Hybridisierung in 0,1 x SSC bei 68°C verstanden. SSC steht als Abkürzung für einen 0,15 M Natriumchlorid, 0,015 M Tris-natriumcitrat-Puffer.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit Nukleinsäuresequenzähnlichkeit zu der in SEQ ID NR:2 angegebenen Nukleinsäuresequenz umfassen insbesondere auch allelische Varianten der angegebenen Nukleinsäuresequenz, die insbesondere die oben erwähnten Mutationen einschließen.

- 8 -

Die Erfindung erstreckt sich auch auf die Nukleinsäuremoleküle mit jeweils zu den oben erläuterten Nukleinsäuresequenzen komplementärer Nukleinsäuresequenz.

5 Der Begriff "isoliertes Nukleinsäuremolekül" bezieht sich im vorliegenden Zusammenhang auf Nukleinsäuremoleküle, die im wesentlichen gereinigt von der Hauptmenge der andersartigen Nukleinsäuremoleküle aus den Ausgangs- bzw. Produzentenzellen vorliegen. Präparationen von erfindungsgemäßen isolierten Nukleinsäuremolekülen können jedoch ohne weiteres weitere Bestand-
10 teile, wie Salze, Substanzen aus dem Medium oder auch restliche Bestandteile der Produzentenzellen, wie z.B. diverse Proteine, enthalten.

15 Die Erfindung umfasst ebenso Vektoren, welche ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, das für SES-3 Protein oder mutierte SES-3 Proteine codiert, enthalten. Teil der Erfindung sind auch Vektoren, die ein Fragment eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls aufweisen. Das Nukleinsäuremolekül ist dabei
20 mit einem Promoter verknüpft, der für eine Expression des Nukleinsäuremoleküls in dem zur Expression verwendeten Organismus sorgt. Für eine Expression in *C. elegans* wird dabei insbesondere einer der bekannten *C. elegans*-Promotoren (<http://chinook.uoregon.edu/promoters.html>) verwendet.

25 Der Vektor kann beispielsweise ein Plasmid, ein Cosmid, ein Bacmid, ein Virus oder ein Bakteriophage sein.

Ein weiterer Aspekt betrifft die Polypeptide oder Proteine, die
30 von den erläuterten Nukleinsäuremolekülen codiert werden, insbesondere SES-3 Protein aus *C. elegans* mit der in SEQ ID NR:1 angegebenen Aminosäuresequenz und die oben erwähnten mutierten SES-3 Proteine sowie davon durch Substitution, Modifizierung, Deletion, Insertion oder Hinzufügung von Aminosäuren
35 abgeleitete Polypeptide oder Proteine, die mindestens 75%, insbesondere mindestens 80%, speziell mindestens 85%, bevorzugt mindestens 90%, besonders bevorzugt mindestens 95% und am

- 9 -

meisten bevorzugt mindestens 98% Sequenzähnlichkeit zu den erwähnten Aminosäuresequenzen aufweisen. Gleichfalls umfasst sind Fusionsproteine, die erfindungsgemäße Polypeptide, Proteine oder Proteinfragmente fusioniert an ein andersartiges Protein oder einen andersartigen Proteinabschnitt, z.B. ein Marker- oder Indikatorprotein, enthalten. Teil der Erfindung sind auch Fragmente der oben erwähnten Proteine oder Polypeptide.

Die mit Hilfe solcher Proteine erhältlichen Antikörper, welche monoklonal oder polyklonal sein können, sind von der Erfindung ebenfalls umfasst.

Die Erfindung erstreckt sich auch auf transgene Organismen, insbesondere Mikroorganismen, z.B. Bakterien, Viren, Protozoen, Pilze und Hefen, Algen, Pflanzen oder Tiere, wie auch Teile, z.B. Zellen, und Vermehrungsmaterial, z.B. Samen, von solchen transgenen Organismen, die eine rekombinante Nukleinsäuresequenz - ggf. in ein Chromosom integriert oder auch extrachromosomal - umfassen, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, das für SES-3 Protein, mutiertes SES-3 Protein oder Fragmente davon codiert, als Transgen enthält. Unter einem bevorzugten Aspekt werden die transgenen Organismen das von dem erwähnten Transgen codierte Polypeptid oder Protein, d.h. SES-3 Protein aus *C. elegans* oder ein davon abgeleitetes Polypeptid oder Protein, auch exprimieren.

Gemäß einem Aspekt der Erfindung weisen transgene *C. elegans* ein *ses-3* Allel auf, das die Aktivität von *ses-3* vermindert, verstärkt oder ausschaltet. Teil der Erfindung sind auch solche transgenen *C. elegans*, denen das *ses-3*-Gen vollständig entfernt worden ist. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung transgene *C. elegans*, die ein *ses-3* Allel aufweisen, das den Eiablagedefekt Phänotyp (Egl) in *sel-12*-Mutanten kompensiert. Zudem betrifft die vorliegende Erfindung transgene *C. elegans*, die ein *ses-3* Allel aufweisen, das die Aktivität von *hop-1* oder *sel-12* steigert.

- 10 -

Die Erfindung erfasst auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen, besonders bevorzugt der Alzheimer'schen Krankheit bzw. zur Erzeugung eines Modellorganismus zur weiteren Untersuchung und Erforschung neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen.

Die oben erwähnten Arzneimittel sind beispielsweise dadurch erhältlich, dass ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül selbst als Gentherapeutikum eingesetzt wird oder indem mit Hilfe eines solchen Nukleinsäuremoleküls ein Modellorganismus aufgebaut wird und die mit Hilfe dieses Modellorganismus aufgefundenen Substanzen zu einem Arzneimittel formuliert werden. Für nähere Einzelheiten hierzu wird z.B. auf die internationale Anmeldung PCT/EP01/03214 desselben Anmelders verwiesen.

Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von transgenen *C. elegans*, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül aufweisen, in einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *ses-3* Aktivität verändern, insbesondere vermindern oder eliminieren. Des Weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von transgenen *C. elegans*, die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül aufweisen, in einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *hop-1* oder *sel-12* Aktivität steigern.

Zudem betrifft die Erfindung die Verwendung ebensolcher transgener *C. elegans* in einem in einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Substanzen, die als Wirkstoffe zur Behandlung und/oder Prävention der Alzheimer'schen Krankheit verwendet werden können. Im Hinblick auf die Analogie zu humanen Zellen und im Hintergrund zur gezeigten funktionalen Ähnlichkeit des Notch Signalwegs und der Presenilinfunktion in *C. elegans* und Mensch wird davon ausgegangen, dass die Fehlfunktion der FAD Presenilinmutanten äquivalent

durch Mutation eines homologen oder funktional äquivalenten Gens zu *ses-3* im Mensch kompensiert werden kann. Ein solches homologes Gen ist insbesondere das Gen KIAA0601. Im Rahmen der Erfindung wird daher erwartet, dass ein Defekt in einem humanen *ses-3* Homologen oder funktional äquivalenten Gen zu einer Steigerung der Expression des nicht von der FAD Mutation betroffenen Presenilin-Gens führt.

Die Erfindung betrifft daher auch die Verwendung von Substanzen, die die Expression eines humanen Presenilin steigern, zur Behandlung der Alzheimer'schen Krankheit, sowie diese Substanzen selbst. Insbesondere fallen unter die erfindungsgemäßen Substanzen solche, die das humane Presenilinen 1 oder 2 aktivieren und die Expression des humanen Presenilinproteins 1 oder 2 steigern. Zu den erfindungsgemäßen Substanzen gehören auch jene, die in *C. elegans* zu einer Veränderung der *ses-3* Aktivität führen, und/oder die *sel-12* oder *hop-1* Presenilin Aktivität steigern. Von der Erfindung umfasst sind auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Substanzen enthalten.

Analog kann diese Erfindung auch bei der Behandlung der sporadischen, altersabhängigen und nicht an Mutationen gekoppelten Fälle der Alzheimer'schen Erkrankung von Nutzen sein. Dabei wird erwartet, dass die Minderung der Expression durch eine Steigerung der Presenilinaktivität die Bildung von A β 4, insbesondere von A β 42, vermindert und dadurch der Ausbruch der Erkrankung zeitlich verzögert wird.

Außerdem betrifft die Erfindung auch die Verwendung des humanen homologen Gens (KIAA0601) sowie die Verwendung des homologen *Drosophila melanogaster* Gens aus Figur 4 (ALT1) sowie funktional ähnlicher Gene, insbesondere aus *C. elegans*, zur Auffindung von Substanzen, die als Wirkstoffe zur Behandlung und/oder Prävention der Alzheimer'schen Krankheit verwendet werden können. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung solcher Gene zur Auffindung von Substanzen, die die Aktivität von humanen Presenilinen steigern können. Die Erfindung be-

trifft auch transgene Organismen, die diese homologen oder funktional ähnlichen Gene enthalten und die Verwendung solcher Organismen, insbesondere *C. elegans* Organismen, in einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *hop-1* oder *sel-12* Aktivität steigern oder die *ses-3* Aktivität vermindern.

Kurze Beschreibung der Figuren und des Sequenzprotokolls

Fig. 1: Konzentration von *hop-1* in *ses-3* Allelen. Northern Blot, hybridisiert mit einer *hop-1* spezifischen Probe.

Fig. 2: Domänenstruktur von SES-3 Protein.

Fig. 3: Aminosäurevergleich von SES-3 mit homologen Proteinen.

Fig. 4: Phylogenetische Verwandtschaft von SES-3 sowie Homologie.

Fig. 5: Nachweis der *ses-3* mRNA in Abhängigkeit der verschiedenen Mutationen. Northern Blot.

Fig. 6: Genomische Struktur der *ses-3* Region und Darstellung der Transgene mit genomischer DNA, die *ses-3* Mutanten komplementieren.

SEQ ID NR:1: SES-3 Aminosäuresequenz

SEQ ID NR:2: *ses-3* cDNA Sequenz

SEQ ID NR:3: Genomische Sequenz eines Subfragments von Y40B1B.6, das *ses-3* Mutanten komplementieren kann. Dieses Fragment enthält folglich alle für die Expression von *ses-3* notwendigen Sequenzen und Promotorabschnitte.

Die Erfindung wird im folgenden anhand von Beispielen näher erläutert.

Experimenteller Teil

- 13 -

Isolierung der ses-3 Mutanten

Zur Isolierung von Suppressoren des Eiablagedefektes von sel-12 Mutanten Tieren in *C. elegans* wurde die sel-12(ar171) Mutation in einen Mutatorstamm mut-7(pk704) eingekreuzt. Der so erzeugte Stamm zeigt eine temperaturabhängig Aktivierung aller Transposons von *C. elegans* bei 20°C. Zur Mutagenese wurden sel-12(ar171) unc-1(e538); mut-7(pk704) Tiere bei 20°C auf 3,5 cm NGM Agar Platten mit OP50 kultiviert. Nach jeder Generation wurde nach dem Auftreten von Tieren gesucht, die in der Lage waren, Eier zu legen. Aus der Analyse von etwa 30'000 haploiden Genomen wurden zwei unabhängige Mutanten-Tiere isoliert, die in der Lage waren, reproduzierbar Eier zu legen. Das Eiablageverhalten dieser Tiere war mit dem von Wildtyptieren vergleichbar. Eine dieser Mutationen wurde ses-3(by101) genannt.

Der sel-12; ses-3 Phänotyp

Mutationen in ses-3 supprimieren den Eiablagedefekt von sel-12 Mutanten nahezu vollständig. 95% der sel-12(ar171); ses-3(by101) Doppelmутanten Tiere zeigten ein wildtypähnliches Eiablageverhalten, während 5% der Tiere Defekte in der Eiablage aufwiesen, die den Defekten der sel-12 Einzelmутante entsprechen. Mutationen in ses-3 sind in der Lage, alle bekannten sel-12 Mutationen zu supprimieren. Daraus kann gefolgert werden, dass ses-3 nicht allelspezifisch wirkt. Sel-12(ar171); ses-3(by101) Doppelmутanten Tiere legen zwischen 180 und 280 Eier, die zu Nachkommen führen; im Gegensatz zur sel-12(ar171) Einzelmутante, die im Durchschnitt 60 Nachkommen erzeugt. Die sel-12(ar171); ses-3(by101) Doppelmутanten Tiere beendenden ihre Eiablage nach etwa 2-3 Tagen und sterben nicht mit einem "bag of worms" Phänotyp, wie für die sel-12 Einzelmутations üblich. Sel-12(ar171); ses-3(by101) Doppelmутanten Tiere zeigen gegenüber Wildtyptieren ein um etwa einen Tag verlangsamtes Wachstumsverhalten pro Generation.

- 14 -

Klonierung des *ses-3* Genlocus

Mittels klassischer Genetik wurde *ses-3* als rezessive Mutation auf dem rechten Arm von Chromosom I lokalisiert. Da die *ses-3* Mutation mittels einer Transposonmutagenese erzeugt wurde, war es wahrscheinlich, dass die Mutation durch die Insertion eines Transposons in den kodierenden Bereich des *ses-3* Genes hervorgerufen wurde. Hierdurch ergibt sich ein s.g. Polymorphismus gegenüber dem *sel-12* Einzelmantanten Stamm. Dieser kann nach Entfernung der restlichen durch den *mut-7* Hintergrund erzeugten Polymorphismen mittels Auskreuzung mit dem Wildtyp *C. elegans* Stamm N2. Die Transposons in dem so ausgekreuzten *sel-12(ar171); ses-3(by101)* Stamm können mittels Transposondisplay sichtbar gemacht werden. Durch einen Vergleich mit dem Wildtyp *sel-12* Stamm können die Transposons identifiziert werden, die nur in den *sel-12(ar171); ses-3(by101)* Doppelmantanten Tieren vorhanden sind. Mittels dieses Verfahrens wurde ein Tc3 Insertion im 7 Exon des Gens Y40B1B.6 identifiziert, das durch weiteres Auskreuzen nicht von der *ses-3* Mutation getrennt werden konnte.

Transgene Rettung des *ses-3*

Zur Rettung des *ses-3* Phänotyps wurden die Fosmide H14o4, H37o19 und H18N7 isoliert, die die *ses-3* genomische Region beinhalten. Hierbei beinhalten die Fosmide H14o4 und H37o19 die vollständige genomische Sequenz von Y40B1B.6, während H18N7 nur einen Teil der Y40B1b.6 genomischen Sequenz beinhaltet, der die Exons 7 und 8 fehlen. Es wurden Transgene mit einzelnen dieser Fosmide in den Stamm *sel-12(ar171); ses-3(by101)* injiziert und die Antisuppressor -Aktivität der transgenen Tiere getestet. Alle Klone wurden bei einer Konzentration von 50ng/µl des jeweiligen Fosmids zusammen mit 100ng/µl des dominanten Transformationsmarkers pRF4 (Mello et al., 1991) injiziert. Die Suppression des Eiablagedefektes von *sel-12* mutanten Tieren durch *ses-3* wurde durch die Anwesenheit der Fosmide H14o4 und H37o19 nahezu vollständig kompensiert (gerettet), während das

Fosmid H18N7 nicht in der Lage war, die durch *ses-3* vermittelte Suppression von *sel-12* zu retten (siehe Figur 6).

5 Struktur von *ses-3*

ses-3 (Y40B1B.6) ist in 8 Exons organisiert und bildet ein Operon mit dem Gen Y40b1B.5 (siehe Figur 6). Die für Y40B1B.6 vorhergesagte cDNA stimmt mit der für *ses-3* bestimmten cDNA von 2313 Basenpaaren überein (SEQ ID NR:2). *Ses-3* kodiert für ein
10 Protein von 770 Aminosäuren (SEQ ID NR:1). Eine Motivsuche mit *Ses-3* ergab, dass *Ses-3* eine Amino-Oxidase Motiv über den Grossteil seiner Länge besitzt und am N-Terminus eine FAD Bindestelle (Figur 2). Sequenzvergleiche mit der Datenbank zeigten Homologien zu einem weiteren *C. elegans* Gen T08D10.2,
15 sowie zu einem humanen EST KIAA0601 und einem vorhergesagten *Drosophila* Gen *alt1* (Figur 3). Figur 4 zeigt die verwandtschaftliche Beziehung der Gene untereinander.

20 Expression von *ses-3*

Ein Stadien spezifischer Northern Blot zeigt, dass *ses-3* in allen Entwicklungsstadien exprimiert wird.

25 Mutationen in *ses-3*

by101:

ist eine Tc3 Insertion im 7 Exon von Y40B1B.6 an der Position 1817 der cDNA und beeinflusst die mRNA Expression (Figur 5).

30 by113:

wurde aus einer EMS Mutagenese isoliert und zeigt keinen Einfluss auf die mRNA Expression (Figur 5).

by119:

35 wurde aus einer EMS Mutagenese isoliert und zeigt eine Abschwächung der mRNA Expression (Figur 5).

- 16 -

by128:

wurde aus einer UV/TMP Mutagenese isoliert und zeigt eine abgeschwächte Expression der mRNA und ein Rearrangement der mRNA und des genomischen Bereichs (Figur 5).

by134:

wurde aus einer UV/TMP Mutagenese isoliert und zeigt eine abgeschwächte Expression der mRNA (Figur 5).

by139:

wurde aus einer UV/TMP Mutagenese isoliert und zeigt eine abgeschwächte Expression der mRNA eine verkleinerte Bande, das Auftreten einer zweiten grösseren Bande und eine Deletion in Exon8 von Position 2015 bis 2169 der cDNA (Figur 5).

Mechanismus der Suppression von *sel-12* durch *ses-3*

ses-3 Mutationen sind nicht in der Lage, die Sterilität einer *sel-12*; *hop-1* *ses-3* zu supprimieren. Dies demonstriert, dass *hop-1* notwendig ist für die Suppression von *sel-12*. Ein Northern Blot der *sel-12*; *ses-3* Doppelmutanten mit den *ses-3* Allelen by101, by119, by128 und by139 zeigt, dass *hop-1* Expression in dem L1 Stadium relativ zu *sel-12* und dem Wildtypstamm N2 hochreguliert wird. Da *hop-1* in der Lage ist, *sel-12* zu ersetzen, ersetzt somit *hop-1* *sel-12* in den frühen larvalen Stadien.

PATENTANSPRÜCHE

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für SES-3 codiert.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das für ein mutiertes SES-3 codiert.
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, wobei das mutierte SES-3 eine oder mehrere Veränderungen enthält.
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Nukleinsäuremolekül ein DNA-Molekül, insbesondere ein cDNA-Molekül oder ein genomisches DNA-Molekül, oder ein RNA-Molekül ist.
5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das SES-3 die identische oder im wesentlichen dieselbe Aminosäuresequenz wie die in SEQ ID NR:1 gezeigte Aminosäuresequenz aufweist.
6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das die in SEQ ID NR:2 angegebene Nukleotidsequenz oder eine dazu komplementäre Sequenz umfasst.
7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, dessen Nukleotidsequenz mindestens 75% Sequenzähnlichkeit zu dem isolierten Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6 aufweist oder unter stringenten Bedingungen mit dem isolierten Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 6 hybridisiert.
8. Vektor, welcher ein isoliertes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 umfasst.

- 18 -

9. Vektor, welcher ein Fragment eines isolierten Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7 umfasst.
10. Vektor nach einem der Ansprüche 8 oder 9, welcher einen
5 Promoter für die Expression in einer Zelle des Nematoden *C. elegans* umfasst.
11. Vektor nach einem der Ansprüche 8 bis 10, welcher ein
10 Plasmid, ein Cosmid, ein Bacmid, ein Virus oder ein Bakteriophage ist.
12. SES-3 Protein mit der in SEQ ID NR:1 gezeigten Aminosäuresequenz oder ein Fragment davon.
- 15 13. Mutiertes SES-3 Protein oder ein Fragment davon.
14. SES-3 nach Anspruch 12 oder 13, welchem eine oder mehrere Aminosäuren der in SEQ ID NR:1 gezeigten Aminosäuresequenz fehlen, oder bei welchem eine oder mehrere
20 Aminosäuren der in SEQ ID NR:1 gezeigten Aminosäuresequenz durch andere Aminosäuren ersetzt sind, oder bei welchem eine oder mehrere Aminosäuren an die in SEQ ID NR:1 gezeigte Aminosäuresequenz addiert sind.
- 25 15. Antikörper, der gegen SES-3 nach einem der Ansprüche 12 bis 14 hervorgerufen wurde.
16. Antikörper nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet,
30 dass der Antikörper ein monoklonaler oder ein polyklonaler Antikörper ist.
17. Transgener nichtmenschlicher Organismus, welcher ein Nukleinsäuremolekül nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7 umfasst.

- 19 -

18. Transgener nichtmenschlicher Organismus nach Anspruch 17, welcher ein Nematode, insbesondere *C. elegans* ist.

19. Transgener *C. elegans* nach Anspruch 18, der ein *SES-3* Allel aufweist, das die Aktivität von *SES-3* vermindert, verstärkt oder ausschaltet.

20. Transgener *C. elegans* nach Anspruch 19, der ein *SES-3* Allel aufweist, das den Eiablagedefekt-Phänotyp (*Egl*) in *sel-12 C. elegans* Mutanten kompensiert.

21. Transgener *C. elegans* nach Anspruch 19 oder 20, der ein *SES-3* Allel aufweist, das die Aktivität von *hop-1* oder *sel-12* steigert.

22. Transgener nichtmenschlicher Organismus, insbesondere *C. elegans*, welcher ein zu *ses-3* homologes humanes Gen (*KIAA0601*) oder ein homologes *Drosophila melanogaster* Gen (*ALT1*) oder ein funktional ähnliches Gen, insbesondere aus *C. elegans*, umfasst.

23. Verwendung eines isolierten Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines funktional ähnlichen Gens zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen.

24. Verwendung eines isolierten Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder eines funktional ähnlichen Gens zur Erzeugung eines Modellorganismus zur Untersuchung und Erforschung neurologischer, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen.

25. Verwendung von transgenen *C. elegans* nach einem der Ansprüche 17 bis 22 in einem Verfahren zur Identifizierung

- 20 -

und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *SES-3* Aktivität verändern.

26. Verwendung von transgenen *C. elegans* nach Anspruch 25 in
5 einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *SES-3* Aktivität vermindern oder eliminieren.

27. Verwendung von transgenen *C. elegans* nach einem der Ansprüche 17 bis 22 in einem Verfahren zur Identifizierung
10 und/oder Charakterisierung von Substanzen, die die *hop-1* oder *sel-12* Aktivität steigern.

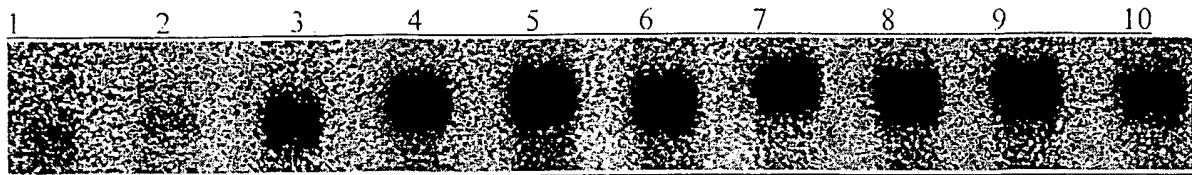
28. Verwendung von transgenen *C. elegans* nach einem der Ansprüche 17 bis 22 in einem Verfahren zur Identifizierung
15 und/oder Charakterisierung von Substanzen, die als Wirkstoffe zur Behandlung und/oder Prävention der Alzheimer'schen Krankheit verwendet werden können.

29. Verwendung von Substanzen, die die Expression von humanem Presenilin 1 oder 2 steigern, zur Herstellung eines
20 Medikaments zur Behandlung von der Alzheimer'schen Krankheit.

30. Eine Substanz, die die Expression von humanem Presenilin
25 1 oder 2 steigert.

31. Pharmazeutische Zusammensetzung, die eine Substanz nach
Anspruch 30 enthält.

1/7

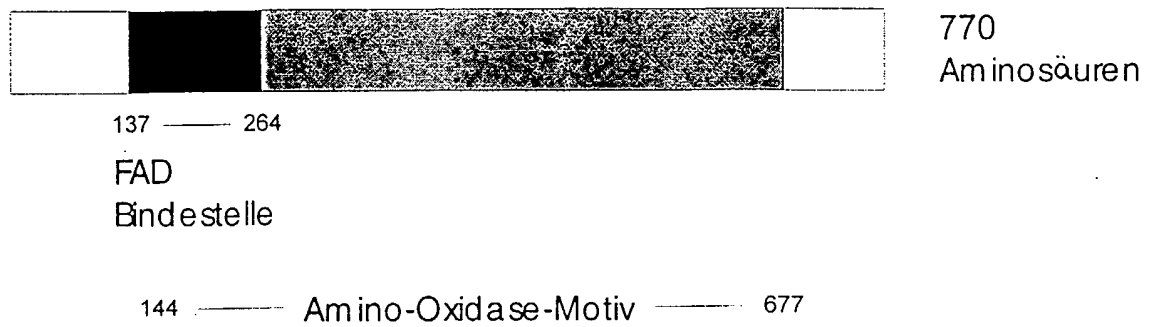
Figur 1: Konzentration von *hop-1* in *ses-3* Allelen

Northern Blot, hybridisiert mit einer *hop-1* spezifischen Probe. Gleiche Mengen an Gesamt-RNA wurden aufgetragen. Zu sehen ist eine fünf- bis 10-fache stärkere *hop-1* mRNA Konzentration als Konsequenz der *ses-3* Mutationen.

Spur 1:	Wildtyp
Spur 2:	<i>sel-12(ar171)</i>
Spur 3:	<i>sel-12(ar171) ses-3(by101)</i>
Spur 4:	<i>sel-12(ar171) ses-3(by119)</i>
Spur 5:	<i>sel-12(ar171) ses-3(by128)</i>
Spur 6:	<i>sel-12(ar171) ses-3(by139)</i>
Spur 7-10:	RNA einer anderen, im Text nicht erwähnten Mutante

Figur 2: Domänenstruktur von SES-3

SES-3 Struktur



Figur 3: Aminosäureähnlichkeit von SES-3 mit C.elegans T08D10.2, Drosophila alt1 und humanem KIA0601

SES-3	(1)	-----
T08D10.2	(1)	-----
Dm alt1	(1)	-----
KIA0601	(1)	RRAGSVKRGEARLFGPTERQSERPLRPSAARRPEMLSGKAAAAAAAAAATGTEAGPTAGGSENGSEVAAQAGLSPPAEVGPAGVGERTPRKKEPP
SES-3	(1)	-----
T08D10.2	(1)	-----
Dm alt1	(29)	MRITLRQIFLHVHACCSYRFLTRERERKRCSDRNHVRTPENFTFYNIANNINVSIMANNYLIMASGIRRKANDSQSSSEGSSSITTEQFIPQV
KIA0601	(101)	GEPTPKRNVNHPPSALSAPNPGQKQKHPDEDNDAPATSDERRTSRRNRPKVDYSNRPPSGGDTASNDKSGSASMGPNNOQAEERSQ--SOIRKSEANAT
SES-3	(1)	-----
T08D10.2	(1)	-----
Dm alt1	(101)	RASPPGGIAEPPGSAGPQAGPTVPGSATPMTGTABETPEGRRTSRKRKAKEVREMDSEMANISDEEYYSSEERNAKAEKEKLLPPPPPOAPEEENES
SES-3	(1)	-----
T08D10.2	(1)	-----
Dm alt1	(98)	PFENLGSINEEVDDSNGLTGIAVPKD-----
KIA0601	(127)	SSSVSGPSAGNSRPSQNGDSKORDAGTP-----
SES-3	(1)	-----
T08D10.2	(1)	-----
Dm alt1	(201)	EPPEPSQAGGLQDDSSGGYGQAGSEGGIRCLPLSSKSRQVGDACKCFWLWYPHFSQKRRRCRPMISSSLGVEGAAFOSRLPHDRMTSGEAVACFPDIIISG
SES-3	(57)	-KIAVEVPLLRNRTLQWLNPKIQLTTEATQQLAEAPNSDPTVLMHRVHSYLERHGHINEGTYKRIKPPPT-----
T08D10.2	(165)	-RSFSDVFLMIRNTILSMLASATTECTAEDVIKHLTEPYNTEHLMQNLVLELERFGMINICFFFPKLEAVN--NMEKKFVVMIGAGGACIATAAIIQLT
Dm alt1	(189)	GILGHRVFLNLRNSLLHMMWADNPKIQLSFEIALKNIPEPDSPEPSLMRRVHSFLERHGHINEGTYKRIKLEPA--KKLGKVIIVIGAGISGLAVAHQLQQ
KIA0601	(301)	PQOTQKVFELFRNRTLQWLNPKIQLTTEATQQLAEAPNSDPTVLMHRVHSYLERHGHINEGTYKRIKPPPT-----
SES-3	(156)	FGFDVLVLEARNCIGGRHSHFKSKSGEIMETGDDTRKIEDSPWATLHQVNFEHGVFDFISVAVE--GRPNEEKIHLFLDHYKSAHGALNQNQHCQH
T08D10.2	(262)	FGFDVAVVEASGLTGGRVRSLSISKHCELIETGCDSEIRNDESVLTTLHQVPLNENIMSENTIIVESK--GKYVEVARCHVINGLYANLKAGLAHASEHGEQ
Dm alt1	(286)	FGMDVLVLEARDRVGGRISTFR--KNSYIADVGAMVVTGVGNPWTILSKQIGMDLVPIQQTCTPLVGPDKKPVKEKDDVIEREFNRLLESAGVLSHRLDF
KIA0601	(398)	FGMDVTLVLEARDRVGGRVATFR--KGNVADLGMVVVTGIGGNPWAVVSKQNMELAKIKQKCPLYEANGQAVPKKEDEWVEQEEFNRLLEATSYLSHOLDL
SES-3	(255)	RDDQCSFISROQAMENILISMCEGTLIKVVNFCKSLTETVARAREHHEHNOVKQLRMITAMAEANQAKKMEEG-----
T08D10.2	(361)	RGENGLYISROQAMENYFNMIERSTLLSYANFAKEKNLNAERKHLYEVLLKNRLJALTAEQKIKNTTP-----
Dm alt1	(385)	NYAGDCPVSLGDALWILISMQEMQVMHRRGOEMQELIAQTKLIEQRRLKTRDITGKIKNEHLAMINQIKKGTGDGLKYCYQEEFNIRNTQIKMEEFM
KIA0601	(497)	NVLNNKPVSLGQALEVVTQLQEKHVKDEQIEHFWKIVKIQCEELKELLNKVVNKEKEIKETHQCYKEASESVKPP-----

700

SES-3
T08D10.2
Dm alt1
KIA0601

(346) EKFEVADAFETADNHWQRLNEHPEQAKQYMHGSGSEFATFNEMIGFEEEMLVCAOLEKVKQFSCDSMONKENGVAARITEGIAELLTQISEKRLDIRKLRV
(447) ROTBACERFEI CEERIAADLEKNRCKQSMHPN--DFTHYNHLLGCFEERLFCAOLEKVKQFSCNVNELKLSQVAVQOEGLAQVLINVANERKVKLHHNQRV
(485) STEHDIHAEKQMLAKLHELEQNRPSSDYLSSR--DRLLIDWHFANIEEFANATRLNNLSIKHWDQDDDFEETGHTTVNRNGYSCVPVALTENLDIRVNSAV
(590) KEYDELAETQCGKLEEKLOELEANPPSDYLSSR--DRLLIDWHFANIEEFANATPLSTLSIKHWDQDDDFEETGSHLTVRNGYSCVPVALAEGLDIKNTIAV

800

SES-3
T08D10.2
Dm alt1
KIA0601

(446) LDIDYSGFEHVLLKVO--RENGDIHEEMKAAAFVAVSTLPIGVLLKTLT-----ADERAPTFTPSLPDKKVEAHRNVCQGSANKCILLEFDRVFWTANGGRNQFVT
(546) IELDTGSSDAVILKLR--KPDGSGVGLLNADYVAVSTLPIGVLLKTLT-----GDERAPVVERPELPKSKFPAHRSQNGCLANKLVFVEETRFWPES--LNQFAI
(584) KEIKGKTKGVVWVAENLKTSNSQMTYKADLWVCTLTGLVKVAVAHKESQQSNTVKFDDPLPDMKQQAATKRIGFCHGNHKKVLCQFDRIFWDPN--ANLEGH
(689) ROVRITASGCEVIAVNTTRSTSQTFYKKDAMICTLPIGVLKQ-----QPPAVQFVPELPENKTSVJORNQEGGNHKKVLCQFDRIFWDPN--VANLESH

900

SES-3
T08D10.2
Dm alt1
KIA0601

(541) VSPNIKTRGSMNLWSVPGSKVLCTYIVGEEA--MLEPDDVALIQONAVINLQKAFENNCPRAPISAHITRMHDDDELAFGSCAFMSLRTETTSRDDVMEPL
(639) VPDKISERAAHFTWSSLPESRTLITHYVGENR--FHDTPVTELTIKAEMLKTVFKD--CP-SPIDAYVAVNTHHDELAFGTHFMSLRTPEQHEDALKEPL
(682) VGSTTASRGEMELFWSTSSPVLALVAGMAANLVESVTDDITIGRCNSVLKNIEGNTISVPQPKETNAVTRWRSDPWARGSYSVVSGSGSDYDLTAAPV
(779) VGSTTASRGELRLFWNLKYKAPILLALVAGEAACHIMENISDDVI VGRCLAILKGLFGSSAVPOPKETVVSRMADPWARGSYSVVAGSSGNDYDLMAQPH

1000

SES-3
T08D10.2
Dm alt1
KIA0601

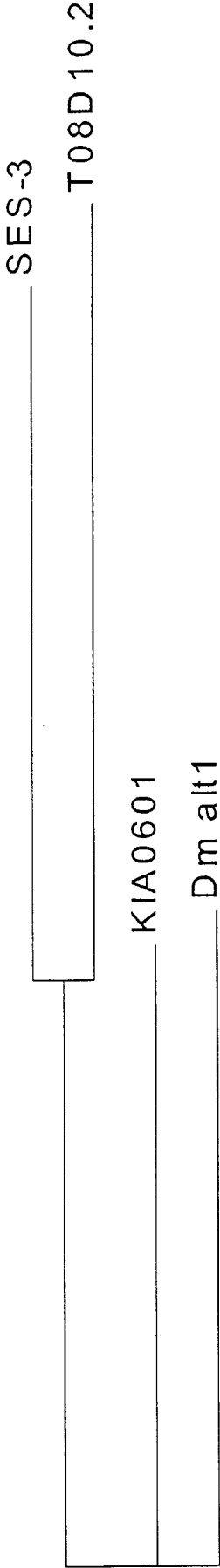
(639) KTSDGMS-----RVVFAGEHTCSSYTSTIQGAWMSGARAADISNDHIGTGEVDISGTRGQRGDEEEELLEVVDIDGKIPEKDENEAVADIENAPNAP
(735) KTRDGKP-----RVVFAGEHTISALEHGTLDGAFNSGIRAAADLANTCLETFFINRS-----RDLIFFPYPRAR
(782) IPPSSKDA--EGLEPRLEFAGEHTIRNYPATVHGAVTSGFREAGRIADYVLCYEGTEPDIGYSVVAEAAANLVSV-----GNVVKLRDLSPNLS
(879) TPGPSIFGAPQPTPRLEFAGEHTIRNYPATVHGALISGIFREAGRIADQFTGAMVTLER-----QA-TIPGVPE

1039

SES-3
T08D10.2
Dm alt1
KIA0601

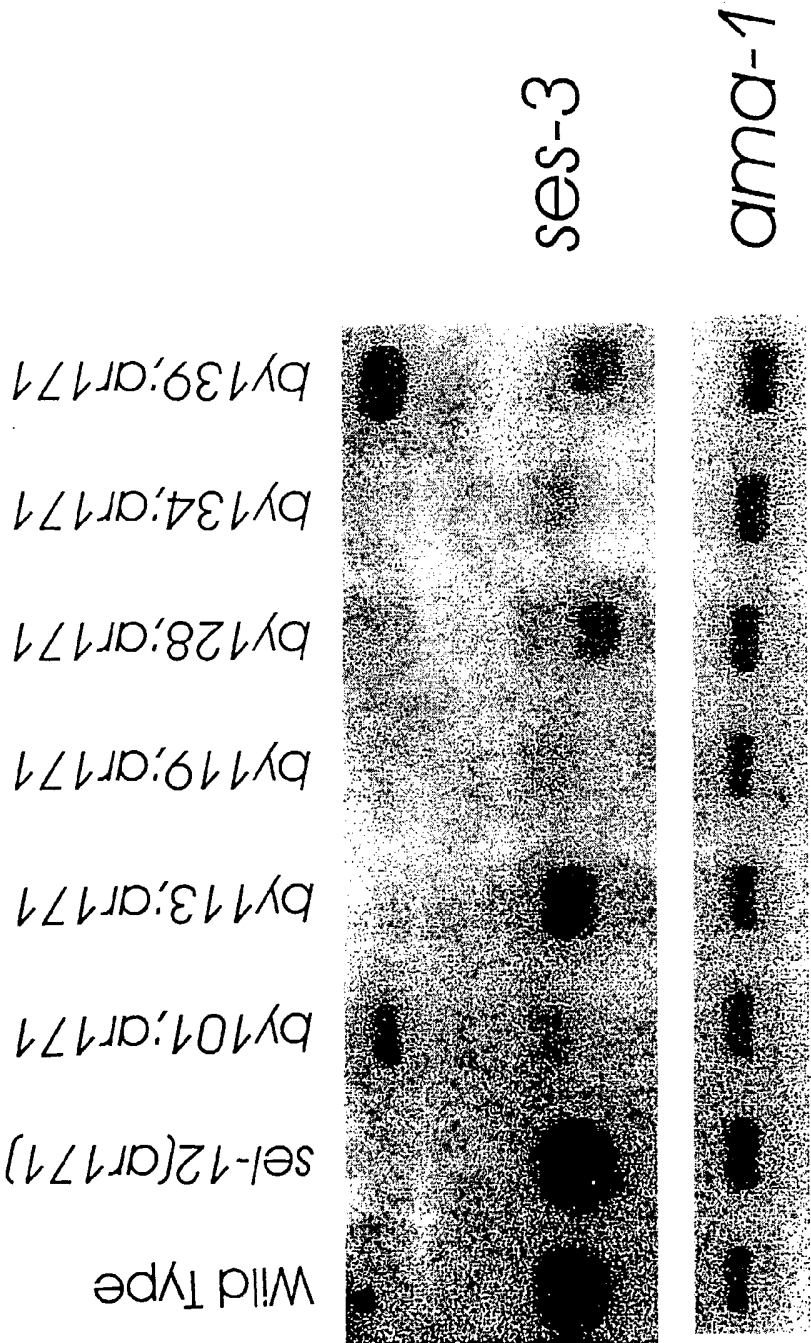
(732) NAQKPEEIPKIAEEIELVAEAEKAEVQLEPLVPTVE
(798) YSNEG-----
(867) DSSPSSKKSEENSNSTADSTELQ-----
(944) AQQSPSM-----

Figur 4: Phylogenetische Verwandtschaft von SES-3



	Identität	Ähnlichkeit
SES-3	-	-
<i>C. elegans</i> T08D10.2	44%	62%
humanes KIAA0601	27%	45%
<i>D. melanogaster</i> ALT1	28%	46%

Figur 5: Northern Blots von *ses-3* Allelen mit *ses-3*. Bei den meisten Allelen von *ses-3* Mutanten ist eine deutliche Reduktion der mRNA Konzentration festzustellen. Ebenso variiert die Größe der *ses-3* Transkripte je nach Mutation. *ama-1*: Kontrolle für die gleiche RNA Auftragung.



Figur 6 Fosmid 'rescue' von sel-12; ses-3

rescue

H14o4

+

H37o19

+

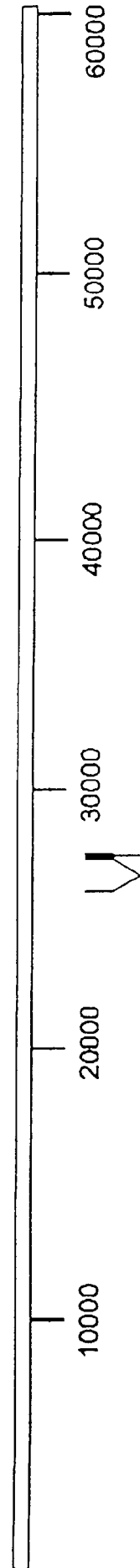
H18N7

-

W05H12.1

Y40B1B.8 Y40B1B.5

Y40B1B.6



Y40B1B.7

C01A2 W05H12

Y40B1B

Y48G10A

Sequenzprotokoll

<110> EleGene AG

<120> Identifizierung von *ses-3* sowie dessen Verwendungen

<130> 88 840

<160> 3

<210> 1

<211> 770

<212> PRT, Einbuchstabencode

<213> *Caenorhabditis elegans*

<223> SES-3 Aminosäuresequenz (Y40B1B.6)

<400> 1

MSSDTGSEYLDDEEIRGDELGPSIDDNALAAAASAARLPFDRPTDHELAFPPPELWEHKTAVEV
 FLLLRNSTLATWQYNPLKECTALDVRNNVFPFNSDLDIQNIVHYLSRHGLINFGRYVRST
 KISRFLVRDRRSVIVIGAGAAGISAATQLESFGFDVIVLEARNICGGRIHSFKSKSGEIMET
 GGDTLRKIEDSPMATLLHQVNFEHGVDFDTSVFVEGRPLNEEKIHLFLDHYKSAHGALNYQ
 AHQCEHRDDQGSFISRQQAYENLLSMCERGTLIKYYNFCKSLETVARAREHHFNQMKQLRMT
 ALMAENQLKKMEEEGNLEQDPVLRRLKRDIA TSLEKFEEVADAFETADNHWQRLNEHPQAK
 QYMHGPGSEFATFNFMLGFEEYLVGAQLEKVQFSCDSMQNKENGVAARLTEGIAELLTQLSEK
 RKLDIRLKHRLVDIDYSGFEHVLLKVQRENGDIEEMKAAFVSTLPIGVLLKTTI IADERAPT
 FTPSLPDKKVEAIRNIGCGSVNKCILEFDRVFWTANGGRNQFVTVSPNIKTRGSMNIWSSVP
 GSKVLCTYIVGEEAMLELPDDV I IQNAMINLQKAFGNNCPRAPISAHITRWHDDELAFGSGA
 FMSLRTETTTSFDDVMEPLKTS DGMSRVYFAGEHTCSSYTSTIQGAWMSGARAAADISNDHIG
 IGFVDISGTRGQRGDEEEELLIEVDIDGKIPEKDENEAVADIPNAPNAPNAQKPEEIPKIAE
 EIELVAEAEKA EKA EVQLEPLVPTVE

<210> 2

<211> 2313

<212> cDNA

<213> *Caenorhabditis elegans*<223> cDNA Sequenz von *ses-3* (Y40B1B.6)

<400> 2

atgtcgtctg acacgggttc cgagtatttg gacgaagaga tacgtggcga tgaattgggg ccgtctatag atgataatgc
 tctcgccgct gccgccagcg ccgccgtct tccattcgac cgcccgactg atcacgagtt ggcattcttc cccgagctct
 gggagcacia gacagccgtc gaggtgtcc tgctgctcag aaatcgacg ctgccacgt ggcaatacaa tccactgaaa
 gattgcacag cggttgatgt cagaaataac gttttccgc cggtcaactc agatttagac ttgattcaga acattgtgca
 ctatctatcc cgtcatggac taatcaattt cggtcggttac gtgagatcca ccaaaatcag tegtgttcta gtccgtgac
 ggcggtcagt gattgtaatt ggcgctggag cagctggaat ttacgcagcc acccaactgg aatcattcgg attcgatgta
 atcgttttgg aggcaaggaa ttgtattggt ggacgtatc acagttttaa atcgaaaagt ggagagatta tggagactgg
 aggtgatacg ctgcgaaaaa tcgaggattc accgatggcc acgtgtgtgc atcaggtaaa cttcgaagag cacggagtat

tcgatttcac ctcagtattc gtcgagggtc gtccattaaa cgaagaaaag attcatttat tcttagatca ctataaatc
 gctcacggag ccctaaacta tcaagcccat caatgtgagc atcgtgatga tcagggatca ttatttccc gacaacaagc
 ctatgagaat ctattaagta tgtgtgaacg tggaacactt atcaaatatt ataactttg taaatcactg gaaaccgtcg
 cccgagcccg tgagcatcat ttcaatcaaa tgaacagtt gagaatgaca gcattgatgg ctgaaaatca gctgaaaaa
 atggaagaag aaggaaattt ggagcaggat cgggtgctca gaagatcatt aaaacgggat attgcaacat cactcgagaa
 attgaagaa gtcgctgacg cttttgagac ggctgataat cattggcaac ggcttaatga gcacccacag gcgaacaat
 atatgcatcc gggatctgaa ttgcgactt ttaattttat gttgggattt gaggagtatt tggttggagc acaattggaa
 aaagtgaat tctcgtgtga ttcatgcaa aataaggaga atggagtggc ggcgagatta accgaaggaa ttgcgaact
 gtaacacaa ttatcgaaa aacgaaaatt ggatattcgt ctgaagcacc gtgttttga tattgattat agcggattt
 agcatgttt actgaaagt cagcgagaaa atggagatat tgaagaaatg aaagccgctt tttagtatc tacactcca
 attggtgtac taaaaaaac aattatgcc gacgagcgtg ctccgacgtt cactccctca ctaccgata aaaaagtga
 agcaattcga aatattggct gtggaagtgt gaataagtgt attctcgaat ttgatcgagt ttttggacg gcaaatggg
 gaagaaatca atttggacg gtttcaccga atataaaaac acgtggctcc atgaatatc ggcatcagt gcttggtca
 aaagtactgt gtacacatc ttagggcga gaggcaatgc tcgagctacc cgatgacgc ataattcaaa atcgcatgat
 aaattctca aaagcattt gaaataattg tccacgtgct ccaatcagt cacaattac acgttggcat gatgatgagt
 tggcatttgg atccggtgca ttatgagct taaggactga aactacaagc tttagatgac tcatggaacc cctcaaaac
 tccgatggaa tgtcacgggt ctatttctg ggagaacaca cgtgttccag ctatacatc acgattcaag gagcatggat
 gtcgtgggag agagccgccc ccgacatttc caacgatcat attggcatc gctttgtgga tataagtga acacgtggc
 aacgcggtga tgaagaaga gagcttctca ttgaagtga tattgatgga aaaattccgg agaaggatga aaatgaggc
 gtactgata ttccaatgc tccaatgct ccaaatgctc aaaaacccga agaaatcccg aaaatcgccg aagaaattga
 actcgtggct gaagctgaaa aggtgaaaa agctgaagtc cagctggagc cactagtgc aacagttgaa tag

<210> 3

<211> 11863

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<223> Genomische Sequenz von *ses-3* (Y40B1B.6)

<400> 3

atgtcgtctg acacgggttc cgagtattt gacgaagaga tacgtggcga tgaattgggg ccgtctatag atgataatgg
 tgaggaaatc ctggaaaaag tgcagaaaat tggataaaaa tggcggtggt agaggctcga gtgtagtgtg tagtgtgagc
 ctcaaccaag tttcagcga aaatcagca tttcagcag aaaaatcaca gtttgcgct ataataacac caaatataag
 aaaaaaccat tgagtttcc atattttct gtaaaaaag ctttaaaatt caacttcaa attggttgag gctagaaatg
 tttagatttg tagtgtgtga gcctcaacca gttttcacc cattttaag gcaaaaatag gcaattttac attaaaaatt
 cagcatttcc agtagaaaaa tcgcatcttt cgctattaat cgttaaaaac aaaaaaatt ttctaaagt ttgcacaga
 aacaccaaatt taaaatgaa aatcaatact tggttgagcg tagaaatgtt gtagtttga gtgtgtgagc ctcaaccaat
 aagttgtgag atttacattg agaaaatctg aaaagcacag tcaaaaatga gaatttttg tagaaaacag catttttcc
 atttaattc ggaaaaatct cgaaaatgac ctgggtgag gctgagagaa gtgtagtgtg tagtctctga gcctcaacca
 attttttt ttttcttg aatttaatat aattttccct gtaattttt aaattaaagt gtcaaaaatt ccaggaaaaa
 ggtgtagtgt gtagtctaat tccccattt tttttcagc tctgccgct gccgccagcg ccgccgctt tccattcgac
 cgcccgactg atcacgagt ggcatcttc ccgagctct gggagcaca gacagccgtc gaggtgttcc tgtgtctcag
 aaattcgacg ctgccacgt ggcaatacaa tccactgaaa gtagtcacag cgttgatgt cagaaataac gttttccg
 cgttcaact agatttagac ttgattcagg tgtggaaatt aggaataatc tcgatttgc acctaaaact taaaaaaat
 cgagaaaaa gatgaaaaac tgcagtttt tgcgaaaca tccgatttt gtctgggtg aggcacagc actacaact
 acaacattt tagcctcaac ctttggtga ggtgaaacg tttagattt ttagctgagc agcctcaacc aaagttgatt

gtctgatttt tcagatattt catggatttt tcccgaaaaa tacaatttt taagcaaaaa ttagaatgga aattcccaaa
aatcggttaa aaacgccaat attcatagag ttcagactac aaactacaaa acaattaaat tttattgaaa aatgaaaaat
ttaaatagaa atttcaaaat taaaaggcga aattatatca aaataaccaa aaacattttt gaattttcaa caaaaacctg
gttttttgaa gaatttcaat tttttcacc gaaaaatcta attaaaaact acaaaatgaa aaaaaatttg tttttttgt
tcgtgaaaaa ttatattcta taaattttaa aattataagt attaaaaaaa taacgttttt ccgccgttca actcggattt
ggacttgatt caggtgtgaa aattaggatt ttcactgatt ttgcacttaa aaatcatgaa aaactccaga aaatcgatta
aaaaaccgca gttttcagcg aaaaaatgggt gaaaaatccg atttttgtct tgggtgagcg tcagacacta caaactacaa
tttgcgctga gcctcaacca atcaattttt gcttttttt agaataaaaa ttggatttta tttttatta ttctgatttg
agatttaaaa ataaaaattt aagaattttg aattttttta aacagaaaaat cggaattaaa tgatcaaat ttttgaaatt
ttcggcgcaa aagtgttgga gtgcgtgaaa atagttaaac tttatcaaa ataactgaaa aatttgaatt ttaaatcatg
aaaatggcaa attcagggat ttgatgaaa ttttatcga aaaaatcgaa tttcacctg aaaatttatt gaaaaatgct
attttttgc gaattttgac aaaaaaaaac cgaaaaaaat tctttccga atatttttt acagaaaatc ggaatgaaat
tttcaaaatt ttgaaatttt cgggcgaaaa gtgattgagt gctggaaagt agttgaaat tatatttttt ggctatttt
atagaaattt aaaaaaaagg attattgaaa aaatcgaaat ttctctgaa aatttattga aaatgcttat tttttgcga
attttgacaa aaaaaaacg aaaaaaatc cttccgaat attttttac agaaaatcgg aatgaaagt tgagaaaatt
gcgaaataac taacaaaaaa aattgaattt tcaaaaaaaa actggttttt ttttttgaa gaatttcaaa tttttcact
gaaaaatcaa ataaaatgtt ttttgggaaa attgcaaaat ttcattttta aaaaatcgaa ttttcaactg aaagtattt
gaaaaatccta ttttttgca aaaaatgagg tttttcaag aatttttgat aaattactt ccaaatttg tagttgtag
ttcaatttt cagaacattg tgcactatct atcccgctcat ggactaatca atttcggctg ttacgtgaga tccacaaaa
tcagtcgttt tctagtccgt gatcgccgtt cagtgtattg aattggcgct ggagcagctg gaatttcagc agccaccaaa
ctggaatcat tcgattcga tgtaatcgtt ttggaggcaa ggaattgtat tgggtgacgt attcacagt ttaaatcgaa
aagtggagag attatggaga ctggagggtga tacgtgcga aaaatcgagg attcacgat ggccacgttg ttgcacagg
tttgtcggga aaatcggttg aaattgcgga aaagtgcagg aaaattgatt aaaaattgga gattttatca aaaatccgat
tttgtatca aaaactgtg aaaaacttat gaaaaactgc agatttcggc gaaaaatacc tgaaaaacgg caaatttgta
gtagaaatat cttttttgt taaaaaaat tgtgaacatc gatcaaaaac ggcataattc agcgaaaaat accggaaaaa
cgacggaatt taatcaattt cgttttttg ttgaggtcga cactacaaac tacaatcgtt cttagcctca agcattgtc
tgggtgagcg tgaaacgttc gtatgtatga gtctgggcct caaccaaagt ggattgacca attttcaga aatttcaata
aaaaggaaaa cattttccgt aatgtttatc gaattttatt gaaaaattg attaaaaaac tgcagatttt agcaaaaata
ctcgaaaaat gtattttcc aaaaactcta tgaaaaaatg caatttatta gcgaaaaaac tcgaaaaacg acaattttt
tggcaaaaaa tcaattttt ctgaaaaaaa ttgaaaaat tgattgaaaa actgcagatt tcaccgaaaa aatcccgaaa
aacgacgaaa ttaatacaaa atgacgattt tcgttttggt ggaggctcac actacaaact acaatcgttc tttagcctcaa
ccattgttct ggttgaggct gaagcgttg tagttgtag tctgagcctc aaccaaagt gatcaacgta tttccagaa
atttcatgga attttctga aaaagacaaa tttccgtaa ctttattgaa aaaatcgaaa aaaaaacgat tttgaacga
aaaatcatgt tttcaaaaaa aattgggtga ggctcaggct acaaaactaca cttttaate ctcaaccagt ataaaagtag
gttaaacatt gtatgttgta gtctgagtg gaaaattgc aaattttact caactctaaa aactacagta cctgtaactt
tgtagttgt agtcagaaat ttaccactcc gcgtgatata tctttcatta caaactacaa atctaaagta tttgtggtt
gtagtgtgag ctacactac aaactacaca aaacattcaa tttttgata tcgaaaacga aaaagtgaat catttttat
taaataagt taaatttga caaaattaat tttttttc cgacttttt ttggatttt tcaataaaaac aaaaatttca
ggtaaactc gaagagcacg gattattcga tttcacctca gtattcgtc agggtcgtcc attaaacgaa gaaaagattc
atttattcct agatcactat aaatctgctc acggagccct aaactacaa gccatcaat gtgagcatcg tgatgatcag
ggatcattta tttcccgaca acaagcctat gagaatctat taagtatgtg tgaacgtgga acattatca aatattataa
cttttgtaa tcaactgaaa ccgtcgcccg agcccgtag catcatttca atcaaatgaa acagttgaga atgacagcat
tgatggctga aaatcagctg aaaaaaatgg aagaagaagg aaatttgag caggatccgg tgctcagaag atcattaaaa
cgggatattg caacatcact cgagaaattt gaagaagtcg ctgacgctt tgagacggct gataatcatt ggcaacggct
taatgagcat ccacaggcga acaatatat gcacccggga tctgaattcg cgacttttaa ttttatgttg ggatttgagg
agtatttggt tggagcaca ttgaaaaag tgcaattctc gtgtgattcg atgcaaaaata aggagaatgg agtggcggcg
agatgttagt gatttgaaaa gagcaaaatt tgatggaaaa tttggaatt tttcgttgaa gaatttgaaa gtttaaggaa
aatgggaaaa tttaaattt ggacttttt ttgacaaaaa attggcaaaa ttttataaaa gtgcgaaaaa atcgaaaatt
ttcgatttt cgaaaaatcg aacgagaaga aaattcaatg gaaaacatt gaaatttcat gaagaaacct gaaaattgtg
acgaatttc gatttttagg caaaaaaaat gatttctat ttttttcac tttcgaaaaa aaaactgaaa ttttgcaaa
caaaactaat tcaattttt taaagaattt ttctgcaaaa aattggattc tctatttatt ttctgttaa cgcatttgaa

attcgagaaa aaattggaaa tttcaattt tggaattttt tggcgaaaaa aaattccgca aaaattgata aaattgcaga
 aaaaacggaa atttttagcg aaaaatagct tttctgaaa attgaaaaat tcacgtgtat ttttgattt ttgaatttt
 ttcttaata aagtcgtaaa aatctgtgaa aattcacgaa aatcttcaa attttcggat aattcagttc aaaacgctcg
 aaaatttgaa taataatcca aaatccacgt ggatttattg atttttgaa tgatttttg attttgata gaaaatgta
 aaaatcgta aaatactaac tagaacagtg ataattgaaa ttttagact atacaggctt aatccaatga aatataatca
 tcaataaaaat tacagtaacc gaaggaattg ccgaactgct aacacaatta tcggaaaaac gaaaattgga tttcgtctg
 aagcatcgtg ttttgatat tgattatagc ggatttgagc atgtttact gaaagttcag cgagaaaatg gagatattga
 agaaatgaaa gccgctttg tagtatctac acttccaatt ggtgtactta aaaagtacgt gccattttc gagaaaaaaa
 ttgattcgaa aaaaaaacga atttagcgta gtcgttttag aagcactgtt aaaaaaattg cagaaaaaaa ttgaaaaata
 accgaaaaatc gcgggggttt ttgccgaaaa cgctgaattt ttcaggaaaa aaacgaaatt taaaaaata agtttatgcc
 gaaaaatcag taaaaaattg aatttttaac taaattaac gccaaaaact aaaaaaaaaa ccacattttt ccaagaaaat
 tgcgaaattt tactgaaaa aactcaaaac tagaggaatt cattcaatta ggtgattaaa atagatattt gcctacaaca
 ttctgaaaat tcgaattttt atcgctgaaa aatggggaaa tgcggatttt tccaaaaaaa aacgaaattt tcagagtaaa
 aactagctat ttggctttta aatttgaaaa attgagtttt tgtttttt ccttcaaaaa attgagctga aatgaaaaa
 aacacatttt tcagaaaaa agtagcaaaa tttcattga aaaaactcaa aaactagaga aattctgtac attttcaga
 taaaatcga tatttgcta caaaattcta aaaaaaaaat tgaattttta tcacaaaaag tacaggaaaa tgtttaaaac
 taagagaact tgaattttat tgtttttt atcttttaa tcaataaaa gcaagttctc ttaagttta tacattttcg
 tgtattttt gtgataaaaa ttaattttt ttttttagaa tttgtagcc aaatatcgat ttaatctga aaaatgtaca
 gaatttctct attttgatt ttttcaatg aaaattttgc tegtttcgac tcaatttaac tcaaattttc aaattttcca
 aatagctatt ttaagtctaa aaatcgaaa atctccgttt ttcaccggaa aaatccgaaa aaatatgcat ttttaagatc
 aaagatcaat ttttagtag taaaaaattc gactacacca ctttaataa aaaaataaca cattttccag acaattatc
 gccgacgagc gtgtccgac gttcactccc tactaccog ataaaaagt ggaagcaatt cgaaatattg gctgtggaag
 tgtgaataag tgtattctcg aatttgatcg agttttttg acggcaaatg gtggaagaaa tcaatttggt acggtttcac
 cgaatatgtg agcggttttt tcggactaca aactataaaa cgtactggtt gaggtcaca gactacaac tacaaattc
 tgaggtcac caagttttt gtcgttttt aagttttcc gaacgaattt tccctgaaa aactaggttt ttgaacaaaa
 tttctgtgt ttttcggg tttctatcg attttaaac caaatctgt cagtcaaat ttgattgagg ctagactac
 aaactacact tttctgtta gcctcaacca ttttcgcag aatttgacag tttttttt ttttgaaa atcctaatt
 tctgttaaaa aatcaagatc ttggcccga aatagcgaaa aaaacgtcaa atttgattt taaaagaaca taaattttg
 ttgaggtca gagactaca actacaattc atctcagcc tcaaccaatt actagtgtg aaaatgtcac attttagtt
 acaacgttg gtttgaccg ttttctcta ttttcgatg acaaaattta agatttagca agaaaaatct ttaaggaaac
 tgaaattcgc tcgaaaatag caaaaaaatt tcaaatttc gaagaaaagc ttttactat ttgggtgag gtcctagac
 tacaactac aattttgtt agcctcaacc atagcgaaat tattggaatt aaaaaaaaat attcgttaa aaaatttgtt
 ttttaaga gtgacgaatc aactacaaa ctacacaatt ctaggaaaaa ccgaatttt tccgataaa aaatttttg
 aaatcaggtt ttgactaca aactacaaaa aaaaaagtt attttggtt aaaaaatctg aaaaaacact ttttggtta
 ataaaaattt atattttcg tagttgtag tgtgtacatt tctaaaaatt ttcgataaaa atcaatttt tttgaaaaa
 aattttggag ctcccacaaa actacaaact acaaaatgtt aaaatttaatt tttgaaaaa aaaattgtct gatttttaga
 ttgtagttt gtagcctttt gaaaatgaaa tttctacga atttctcatt aataacgttt attctaagaa gtcctgacta
 caaactacaa tttttattt taaaacaat tgggtgaggc tcagagacta caaactacac aaatctatca gcctaccca
 taattttaaa tttcattat atttgatga ggctcagaga ctacaaacta caaactacac aaaattccat ttttctatg
 aagaaatcaa ttttaatat tttgaaata caaaattgaa aaaaaaaaat ttaattagg ctcccacaaa actacaaact
 acaaaaagtc acattattag atttgatgt tgcagtctct catataaac atttattcct taaaaaaaaa acaagaattg
 tgactgaaaa ataagctccg actacaaact acaatatgac tatttggtg agttgcgcag actacaaact acaactaca
 caaaattaaa tttttttc cagaaaaaca cgtggctcca tgaatatctg gtcacagtg cctggctcaa aagtactgtg
 tacctacatt gtaggcgaag aggcaatgct cgagctacc gatgacgtca taattcaaaa tgcgatgata aatcttcaa
 aagcatttg aaataattgt ccacgtgct caatcagtc acatattaca cgttgcatg atgatgatt ggcatttgga
 tccggtgcat ttatgagctt aaggactgaa actacaagct ttgatgacgt catggaacct ctcaaacct ccgatggaat
 gtcacgggtc tatttgctg gagaacacac gtgtccagc tataatcga cgattcaagg agcatggatg tctggggcga
 ggtacagaca ctacaaacta caaactacac tttttttt gctggctaca aactacataa ttgtggtgga agctttagt
 tgtgaggccc agcgtgacta caaactacac ttttgactg gcgaaaattg caatttcta ctagggaata ttgtaatatg
 gggaattgct aggaagacac acaaaacttt aaacgacaga tgaggtctt ggctacaaaa atcattttt ggaatctgt
 aaactctgcc ccaaagctga aatttcggc cttaaaaagt agtctctt ttgctcaaaa tgcggtttt cgtgtgtaga

agtggctaca taaaagtttg gcactgcagc cgccgttcga atggccgatt ggtgaactct cgtgctcatt aatctaaagg
 tcacgggttc gttcccaact aggtattaat tttttttt gaattttcc tctagcatga aaaatgcaca aaacacaaac
 aaattgctag ttgaatctac tctgctaaat ttatggga gagagatatg ggcattagta attaagtatg ttaaagcttc
 acttcgatta ttattggta ctttgaaac aactttgcag ttgacaactt tttttattt tacccgtcaa cggagctgga
 agtctttgaa agtaggtcct ttctgtgaaa aactctagag aaaacaacag tggttttctc ctaaaaatga cattgatcc
 tccaaaatcg tagaaatc caaactaatg ctgttcttc aaaccaaaaca cttttgaaa aaattttgaa aaattttt
 tgaagaaaaa tatgtgcata tcaggtggga gaaaagtga aatttatcaa aaaaagaaaa ctccaaaaa gttccaaat
 tactttatg attaccagga accaaaaaatt ttattccgaa gttacaaaa aacggaagaa accgtgtttt tgtgcattt
 tcatgctaga ggaaaaattc aaaaaaaaaa ttaataccta gtggggaacg aaccctgac ctttagatta atgagcacga
 gagttacca atcggccatt cgaacggcgg ctgcagtcc aaactttat gtagccactt ctacacacga aaaacggcat
 tttagcaaa aagaggacta cttttaagg cggaaaattt cagctttggg gcagagtta gcagattcca aaaaatgatt
 tttagacca aagacctcat ctgtcgtta aagtgtgtg tgttctcta gcaattcccc tattaacaat attccctagt
 tagcacaat ccaattata ttcaacaaa aaaaattgag aaatcgtatg aaacctgca gatttcagcg aaaagcatcg
 gaaaacgaca aaatttaac gaaaatccaa ttttgttt aagtgggt cactacaa actacaacat tttagctc
 aaccattgtt gtttggtga ggctgaaaat tttagttt tagtcgggc ctcaaccaat gttgattgtc caattttcca
 gaaattcat ggaattttc tgaagagac aaattttc taactttt gaaaaatcg aaaaaaaaaa cgattttga
 acgaaaaatc acgtttcaa aaaaatttg gttgagctc acactacaaa ctacaacatt tttagctca accattgtg
 tttagtgag gctgaaacgt tttagttt tagtctattg tgaataacc tgtttctga aataaaaacg gtgctaaaaa
 gacacgtgga ttattttaa aaatcgcag ttctgttag tttagtgtt aattaagtct cactacaa actacaatg
 ttataaaaa ttcgaaaaa aagtattaa aaatttgaa aattgcctt ttattgaaa taaaatttt ttacaaatt
 tccaaaaa aatgatttc tgtgaaaaa ttgtcacta caactacaa aattcgaga aatctgtaa aaattgaaa
 aatgtgataa aattctata tttgctta aagttttt ttctacaa taactttt tggaaaaa ttgaaggt
 tcatcttt tttagttt tagtgtaatt agttacta caactacaa taattgtaa cgaattcaa aaattcgaa
 gaaacattt ttgtgttag tttagtgtt aaattcgata attttacaa tattccgaa gaaaagctc taaaattga
 ggacacacta caactacaa gataaataa gtttagttt gtagctgag accctttga aaatattat aaaaatata
 gaaagtcacc atttttaac caaaattga aaatctgt atctaaatt tgtccaaaa aatatttag tttagtgtt
 acctaaaaa aactacaaac tacattttc tctatttt agagccgccc cgcacattc caacgatcat attggcatc
 gcttttgga tataagtga acacgtggtc aacgcggtg tgaagaagaa gagcttctc ttgaagtga tattgatga
 aaattccgg agaaggatga aaatgaggt gtagctgata ttccaatgc tccaatgct ccaatgctc aaaaaccga
 agaaatcccg aaatcgccg aagaattga actcgtggc gaagctgaaa aggtgaaa agctgaagtc cagctggagc
 cactagtcc aacagttgaa tag