



österreichisches
patentamt

(10) **AT 500 370 B1** 2006-03-15

(12)

Patentschrift

(21) Anmeldenummer: A 108/2001

(51) Int. Cl.⁸: G01N 33/68

(22) Anmeldetag: 2001-01-22

(43) Veröffentlicht am: 2006-03-15

(73) Patentanmelder:
RED BULL GMBH.
A-5330 FUSCHL AM SEE (AT)

(72) Erfinder:
LUBEC GERT DR.
WIEN (AT)
LUBEC BARBARA DR.
WIEN (AT)

(54) VERFAHREN ZUM DIAGNOSTIZIEREN, VERHINDERN UND BEHANDELN NEURODEGENERATIVER ERKRANKUNGEN

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung einer neurodegenerativen Erkrankung, welches die Schritte umfasst:

- die Bereitstellung einer Probe eines Individuums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis und Lymphe sowie Nervengewebe, vorzugsweise Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, und Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren, für das eine Diagnose erstellt werden soll,
 - die Messung der Menge an alpha-Endosulfen in dieser Probe, und
 - das Vergleichen der gemessenen Menge an alpha-Endosulfen mit einem Bezugswert,
- und ein Set zur Durchführung dieses Verfahrens.

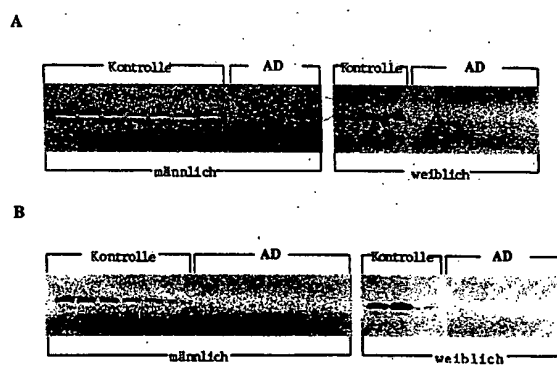


FIG. 1

AT 500 370 B1 2006-03-15

DVR 0078018

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung neurodegenerativer Erkrankungen.

Neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer Krankheit (Alzheimer's Disease, AD), sind für die öffentliche Gesundheit von zunehmender Bedeutung. Was AD betrifft, so sind Berichten zufolge bisher etwa 12 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen. Für das Jahr 2050 schätzt man zwischen 40 und 50 Millionen Patienten. Die Diagnostizierung solcher neurodegenerativer Erkrankungen auf eine entsprechende, verlässliche und sichere Art stellt jedoch noch immer ein großes Problem dar. Abgesehen von neurodegenerativen Prozessen gibt es viele andere mögliche Ursachen für Demenzen bei Patienten, wie Depressionen, Drogenkonsum, Dehydration, Anämie, Syphilis, Virusinfektionen und Vitaminmangel. Eine verlässliche Diagnose - die Voraussetzung für eine wirksame Behandlung - ist daher oft schwierig, wenn nicht unmöglich. Derzeit werden AD-Patienten mittels psychologischer Testmethoden oder (post-mortem) durch morphologische Analyse von Gehirnproben identifiziert. Kriterien für eine wahrscheinliche AD sind z.B. von der National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association oder von CERAD definiert.

Es ist ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine einfache und verlässliche Methode zur Diagnostizierung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere von AD, vorzusehen.

Dieses Ziel wird erfindungsgemäß mit einem Verfahren zur Diagnostizierung einer neurodegenerativen Erkrankung erreicht, welches die Schritte umfasst:

- die Bereitstellung einer Probe eines Individuums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis und Lymphe sowie Nervengewebe, vorzugsweise Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, und Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren, für das eine Diagnose erstellt werden soll,
- die Messung der Menge an alpha-Endosulfin in dieser Probe, und
- das Vergleichen der gemessenen Menge an alpha-Endosulfin mit einem Bezugswert.

Überraschenderweise erwies sich alpha-Endosulfin als hochspezifischer Marker für Zellen von Körperflüssigkeiten von Individuen, die an neurodegenerativen Erkrankungen leiden. Insbesondere bei AD-Patienten sind die alpha-Endosulfin-Mengen fast auf Null reduziert, was alpha-Endosulfin eindeutig als hochselektiven Marker für AD identifiziert, dessen Selektivität viel höher ist als die jedes anderen früher berichteten AD-Markers.

Alpha-Endosulfin ist ein endogener Regulator für K_{ATP} -Kanäle und hat die Sulfonyl-Harnstoff-artige Fähigkeit, K_{ATP} -Kanäle zu hemmen (zu schließen) und dadurch die Insulin-Sekretion in beta-Zellen zu stimulieren. Alpha-Endosulfin wurde mit beta-Endosulfin aus Rinderhirn [1] gereinigt und auch aus Schweinehirn isoliert [2]. Eine cDNA-Teilsequenz von alpha-Endosulfin wurde bestimmt und zeigte eine starke Homologie mit einem zyklischen AMP-regulierten Rinderhirn-Phosphoprotein mit der Bezeichnung ARPP-19, jedoch schienen die beiden Proteine von verschiedenen Genen codiert zu sein [3]. Das humane ENSA-Gen, das für alpha-Endosulfin codiert, ist auf dem Human-Chromosom 14 (14q24.3-q31) ko-lokalisiert mit einem Locus für die Empfänglichkeit gegenüber Diabetes Typ 1, genannt IDDM11 [4]. Man nimmt an, dass alpha-Endosulfin ein Protein-Kinase A-abhängiges, phosphoryliertes, intrazelluläres Protein ist, da es keine offensichtliche Signal-Peptid-Sequenz am N-Terminus gibt und es eine cAMP-abhängige Phosphorylierungsstelle im C-Terminus enthält, wie für ARPP-19 beobachtet [5]. Die Gewebsverteilung von alpha-Endosulfin, das in einem breiten Gewebespektrum, einschließlich Muskel und Gehirn, mit geringen Mengen in der Pankreas, exprimiert wird, ähnelt jener des K_{ATP} -Kanals und stimmt mit der Fähigkeit von alpha-Endosulfin, die K_{ATP} -Kanal-Aktivität zu regulieren, überein [6, 7].

Die K_{ATP} -Kanäle sind große, oktamere Komplexe von zwei strukturell nicht verwandten Typen von Untereinheiten, eine von der nach innen rektifizierenden K^+ Kanalfamilie (Kir6.X) und eine

regulierende Sulfonyl-Harnstoff-Rezeptor-Untereinheit aus der ATP-Bindungskassetten(ABC)-Transporter-Familie (SUR), die sich mit einer Stöchiometrie von 4:4 zusammenfügen. Kir6.X bildet die Kanal-Pore und besitzt eine intrinsische ATP-Sensibilität [6, 11], wogegen SUR eine Sensibilität gegenüber K_{ATP} -Kanalöffnern verleiht [12]. K_{ATP} -Kanäle liegen im Gehirn in hoher Dichte in der Substantia nigra, im Globus pallidus, im Cerebellum und im Cortex vor [13, 14]. Sie liegen auch im Hippocampus vor, und zwar sowohl präsynaptisch als auch postsynaptisch [14] und sind besonders in den moosartigen Fasern, die mit der Glutamat-Freisetzung assoziiert sind [15]. Sie sind gegenüber äußeren Glukose-Konzentrationen empfindlich [16], da sich dadurch das intrazelluläre Maß des ATP/ADP-Verhältnisses ändern könnte, verschließen K_{ATP} -Kanäle, was zu einer zellulären Entpolarisierung, der Erzeugung eines Aktionspotentials, einem Ca^{2+} -Eintritt und einer Insulin-Sekretion in beta-Zellen führt [17]. In Gehirnen könnte die Regulierung der K_{ATP} -Kanäle durch Modulatoren (Öffner und Blocker von K_{ATP} -Kanälen, wie antidiabetischen Sulfonyl-Harnstoffen) sowie extrazelluläre Glukosemengen die Freisetzung von Neurotransmittern steuern [18, 19]. Im Down-Syndrom (DS)-Gehirn sind der gestörte Glucose-Stoffwechsel und die Neurotransmitter-Defizite wohl bekannt und es wurde berichtet, dass eine Erhöhung der zirkulierenden Glucose die Lern- und Gedächtnisprozesse bei einem breiten Spektrum von Individuen, einschließlich gesunder, alter Menschen und Individuen mit schweren kognitiven Pathologien verbessert [20].

Trotz der wichtigen Beziehung zwischen alpha-Endosulfin und den K_{ATP} -Kanälen im Gehirn wurden bisher die Beteiligung und die biologische Funktion von alpha-Endosulfin im menschlichen Gehirn mit kognitiven Defekten noch nicht untersucht. Im Laufe der vorliegenden Erfindung wurden die Expressionsmengen des alpha-Endosulfin-Proteins in Proben von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen untersucht, insbesondere in Gehirnregionen von Patienten mit Down-Syndrom (DS), die die Neurotransmitter-Defizite und den gestörten Glucose-Stoffwechsel zeigen. Insbesondere wurden auch Proben von AD-Patienten im Hinblick auf ihre Expressionsmengen von alpha-Endosulfin-Protein untersucht und mit Kontrollen verglichen. Alle Versuche, die in dieser Hinsicht durchgeführt wurden, ergeben den Beweis für die Beteiligung von alpha-Endosulfin am kognitiven Defekt solcher neurodegenerativer Erkrankungen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren vorgesehen, wobei diese neurodegenerative Erkrankung Alzheimer-Krankheit ist.

Gemäß einer anderen, bevorzugten Ausführungsform ist die bei der vorliegenden Erfindung zu diagnostizierende neurodegenerative Erkrankung die altersabhängige AD-Typ-Neurodegeneration bei Down Syndrom (DS)-Patienten. Es ist bekannt, dass fast alle DS-Patienten von dieser altersabhängigen AD-Typ-Neurodegeneration betroffen sind, wenn sie ein bestimmtes Alter, z.B. über 35 Jahre, erreichen.

Die beim vorliegenden Verfahren zu verwendende Körperflüssigkeit ist ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis, Lymphe, insbesondere Serum oder Liquor cerebrospinalis. Bei diesen Körperflüssigkeiten ist alpha-Endosulfin unter Verwendung von Verfahren leicht quantifizierbar, die - beispielsweise für andere Proteine - bekannt sind und ohne wesentliche und übermäßige Belastung für den Fachmann für die vorliegende Erfindung adaptiert werden können.

Erfindungsgemäße Gewebeextrakte stammen von Nervengewebe, vorzugsweise von Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, vom Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren. Im Prinzip sind alle Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakte, die von der neurodegenerativen, zu diagnostizierenden Erkrankung betroffen sind, ein für die vorliegende Erfindung geeignetes Probenmaterial. Bei diesen bevorzugten Gewebeextrakten und Körperflüssigkeiten sind gesenkte alpha-Endosulfin-Mengen leicht und verlässlich detektierbar, und die neurodegenerative Erkrankung kann auf angemessene und effiziente Weise diagnostiziert werden. Das Mittel, mit welchen die Menge des alpha-Endosulphins gemessen wird, ist nicht von kritischer Bedeutung. Tatsächlich sind im Stand der Technik eine Anzahl

hochspezifischer Detektionsmittel für alpha-Endosulfin beschrieben, beispielsweise hochspezifische Antikörper oder Nukleinsäuresonden.

Vorzugsweise wird die Menge des alpha-Endosulfins durch Immundetektion mit alpha-Endosulfin-spezifischen Antikörpern gemessen, die mittels aller auf dem Gebiet als poly- oder monoklonale Antikörper bekannter Methoden erzeugt werden können.

Obwohl das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung eine rasche, einfache und verlässliche Diagnose der neurodegenerativen Erkrankung erlaubt, kann die Menge des alpha-Endosulfins vorzugsweise in mehr als einer Körperflüssigkeit oder mehr als einem Gewebeextrakt gemessen werden. Dies ermöglicht eine noch verlässlichere Charakterisierung des Zustands des Individuums, insbesondere in einem frühen Stadium der neurodegenerativen Erkrankung. Demgemäß kann die neurodegenerative Erkrankung in einem sehr frühen Stadium diagnostiziert werden, was einen frühen Beginn therapeutischer Maßnahmen, insbesondere für AD-Patienten, ermöglicht.

Vorzugsweise ist dieser Bezugswert der Wert eines gesunden Individuums, das nicht an dieser neurodegenerativen Erkrankung leidet, wobei der Bezugswert in der entsprechenden Körperflüssigkeit oder im betreffenden Gewebeextrakt gegebenenfalls mit der selben Messmethode gemessen wird. Mit einem solchen Bezugswert wird sowohl ein systematischer Fehler in Bezug auf differierende alpha-Endosulfin-Gehalte in verschiedenen Körperflüssigkeiten und Gewebeextrakten wie auch eine Abhängigkeit von absoluten Werten vermieden. Da alle verschiedenen Detektionsmethoden systematische Abweichungen vom absoluten ("realen") Wert der alpha-Endosulfin-Menge zeigen können, sind solche Abweichungen für eine relative, gemeinsame Analyse der Probe des Patienten gemeinsam mit dem Kontrollwert mittels der selben Detektionsmethode, die vorzugsweise zur selben Zeit mit dem selben Reagens oder Reagens-Lots durchgeführt wurde, nicht wichtig. Daher wird der Referenzwert vorzugsweise parallel zur Messung der Probe, für die eine Diagnose erstellt werden soll, gemessen.

Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Set zur Detektion von alpha-Endosulfin vorgesehen, welches umfasst:

- Mittel zur Messung von alpha-Endosulfin,
- eine Probe eines Individuums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis und Lymphe sowie Nervengewebe, vorzugsweise Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, und Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren, für das eine Diagnose erstellt werden soll, und
- einen alpha-Endosulfin-Bezugswert.

Vorzugsweise sind die Mittel zur Messung von alpha-Endosulfin ausgewählt aus alpha-Endosulfin-Antikörpern und alpha-Endosulfin-spezifischen Nukleinsäuren.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Sets ist der Bezugswert eine Probe, die von einem Normalplasma-Pool stammt, vorzugsweise in lyophilisierter Form. Bei einem solchen Bezug sind Abweichungen vom normalen, physiologischen Wert, die bei individuellen Proben selbst von gesunden Personen auftreten können, durch die hohe Anzahl individueller Proben, die in einem solchen Pool enthalten sind, ausgeglichen.

Alternativ zu einer solchen Pool-Probe oder in Kombination mit dieser kann ein Referenzwert vorzugsweise vorgesehen werden, der aus einer Reihe von alpha-Endosulfin-Lösungen mit verschiedenen alpha-Endosulfin-Konzentrationen besteht. Eine solche Reihe von alpha-Endosulfin-Konzentrationen kann entweder durch Verwendung einer gereinigten alpha-Endosulfin-Präparation vorgesehen werden, oder durch Verdünnen oder Konzentrieren einer gegebenen Körperflüssigkeit oder eines Gewebeextrakts für einen Referenzwert.

Als Referenzwert kann auch eine Probe einer Person verwendet werden, von welcher bekannt ist, dass sie an einer neurodegenerativen Erkrankung, insbesondere AD, leidet. Vorzugsweise kann eine Reihe von Proben mit verschiedenen alpha-Endosulfin-Konzentrationen auf Grund verschiedener Stufen oder Stadien der entsprechenden Krankheit vorgesehen werden, insbesondere eine Reihe verschiedener Stadien von AD.

Alpha-Endosulfin kann auch zur Herstellung eines Diagnosemittels für neurodegenerative Erkrankungen, insbesondere für AD, verwendet werden.

Da alpha-Endosulfin als verlässlicher Marker für neurodegenerative Erkrankungen etabliert wurde und da man weiß, dass dieses Protein die physiologische Rolle eines endogenen Regulators für K_{ATP} -Kanäle hat, können auch effiziente therapeutische Mittel zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere AD, vorgesehen werden: Da alpha-Endosulfin bei solchen Patienten fast vollständig fehlt, umfasst eine Therapie für diese Krankheiten die aktive Gabe von alpha-Endosulfin an solche Patienten.

Alpha-Endosulfin, das die Sulfonyl-Harnstoff-ähnliche Fähigkeit zur Blockierung der K_{ATP} -Kanäle besitzt, wird im Gehirn exprimiert, und die Gewebsverteilung von alpha-Endosulfin ähnelt der der K_{ATP} -Kanäle. Die K_{ATP} -Kanäle werden durch Kalium-Kanalöffner, wie Diazoxid, Cromakalim, Pinacidil, Nicorandil oder Aprikalim [21-23] aktiviert und durch die antidiabetischen Sulfonylharnstoffe (oder Blocker), wie Tolbutamid, Glibenclamid und Glipizid inhibiert [24]. Obwohl Öffner und Blocker ihre jeweiligen Wirkungen deutlich dadurch ausüben, dass sie mit verschiedenen Typen von Rezeptorstellen assoziiert sind, gibt es eine ausgezeichnete Korrelation für eine Reihe von Sulfonylharnstoffen zwischen ihrer Effizienz zur K_{ATP} -Kanal-Blockierung und Bindung an ihren Arzneistoffrezeptor [25].

Kürzlich wurde berichtet, dass diese Modulatoren der K_{ATP} -Kanal-Aktivität bei der Freisetzung von Neurotransmittern eine Rolle spielen. Es wurde gezeigt, dass Tolbutamid und Glibenclamid die Acetylcholin-Freisetzung aus cholinergischen Striatum-Interneuronen durch eine Blockade der K_{ATP} -Kanal-Aktivität stimulieren [26]. Die Blockade der K_{ATP} -Kanäle durch Glibenclamid schien auch die Freisetzung von gamma-Aminobuttersäure (gamma-aminobutyric acid, GABA) auf GABAergischen Interneuronen auszulösen, was wiederum serotoninergetische Neuronen hemmt [27]. Von Sulfonylharnstoffen ist auch berichtet, dass sie GABA-synaptische Potentiale bei Ratten-Mittelhirn-Dopamin-Neuronen verbessert [28]. Im Gegensatz dazu verbesserte Diazoxid die exzitatorischen glutamatergetischen Ströme und verringerte GABAergische Ströme bei Neuronen des Hippocampus [29]. Es zeigte sich, dass Cromakalim den Glutamat-induzierten neuronalen Tod bei Hippocampus-Neuronen verhindert, aber diese Wirkung wurde durch Glibenclamid ausgeschaltet [30].

Die K_{ATP} -Kanäle konnten auch durch die Konzentration intrazellulärer ATP, die im Wesentlichen durch den Glucose-Stoffwechsel gesteuert wird, reguliert werden. Die Konzentrationen zirkulierender Glucose regulieren viele Gehirnfunktionen, einschließlich Lernen und Gedächtnis [31]. Umfassende Beweise wiesen darauf hin, dass relativ geringe Steigerungen der zirkulierenden Glucose-Konzentrationen die Lern- und Gedächtnis-Prozesse bei gesunden, alten Menschen und Individuen mit schweren kognitiven Pathologien, wie DS und AD, verbessern [20]. In mehreren Studien wurde von den gestörten Stoffwechselfunktionen im DS-Gehirn berichtet. Ältere, an Demenz leidende Erwachsene mit DS zeigten niedrigere Raten als die normalen Raten des absoluten Glucose-Stoffwechsels in Schläfen- und Scheitelbein-assoziierten neocortikalen Bereichen unter Verwendung von Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit [18F]-Fluordesoxyglucose, einem wohletablierten Verfahren zur Messung regionaler zerebraler Glucose-Stoffwechsel-Raten [32]. Obwohl bei älteren Erwachsenen mit DS ohne kognitive Störung der regionale zerebrale Glucose-Stoffwechsel viele Jahre lang innerhalb des normalen Bereichs bleibt, zeigten wiederholte Messungen im Laufe der Zeit und nach dem Einsetzen einer Demenz eine progressive Abnahme des Glucose-Stoffwechsels.

Auf der Grundlage dieser Studien konnte der der Glucose-Wirkung auf das Gedächtnis zu Grunde liegende Mechanismus mit der Freisetzung von Neurotransmittern über K_{ATP} -Kanäle in Beziehung gebracht werden. Sowohl die lokale als auch die systemische Glucose-Verfügbarkeit konnte die Nigra-GABA-Freisetzung über eine Wirkung auf K_{ATP} -Kanäle beeinflussen, und eine Hemmung der GABA-Freisetzung könnte zum Teil die Hyperexzitabilität, die mit der Hypoglykämie verbunden ist, vermitteln [33].

Bei DS wurden mehrere Neurotransmitter-Defizite untersucht. Es wurde beobachtet, dass die cholinergischen Defizite bei DS eine signifikante Verringerung der Aktivität des spezifischen cholinergischen Marker-Enzyms [34-36], Cholin-Acetyltransferase, das die Synthese von Acetylcholin katalysiert, zeigen. Bei muriner Trisomie 16 (TS16), die als Modell für das humane Trisomie-21-Gehirn angesehen wird, war die Gehirn-Cholinacetyltransferase-Aktivität auf 67% der Kontrolle reduziert, und die gleichbleibende Cholin-Aufnahme war auf 35% reduziert [37]. GABA war im Hippocampus und in der Schläfen-Cortex bei DS-Patienten mit neocortikalen neurofibrillären Verflechtungen reduziert, und diese Ergebnisse stimmen mit den Verlusten GABAergischer Neuronen überein [38]. Substantielle Defizite an Noradrenalin, 5-Hydroxytryptamin und 5-Hydroxyindolessigsäure wurden im Hippocampus, in der Schläfen- und Stirn-Cortex von DS-Patienten beobachtet [39]. Obwohl diese Neurotransmitter-Defizite von der Schädigung der cholinergischen, noradrenergischen und Serotonin-Neurotransmitter-Systeme, die bei DS beobachtet wurden [40], herrühren könnten, konnte die neurobiologische Funktion endogener Regulatoren bei der Steuerung der Neurotransmitter-Freisetzung auf dem Weg über Ionen-Kanäle nicht ausgeschlossen werden.

Da alpha-Endosulfin-Protein bei Individuen mit neurodegenerativen Erkrankungen extrem verringert oder nicht vorhanden ist, insbesondere in der Stirn-Cortex und im Cerebellum von Patienten mit AD und DS, stellt es für solche Krankheiten einen sehr selektiven Marker dar. Eine neurodegenerative Erkrankung wird mit dem vorliegenden Verfahren identifiziert, beispielsweise, wenn eine Probe 50 oder weniger %, insbesondere 10% oder weniger, mehr bevorzugt 5% oder weniger, insbesondere etwa 1% oder weniger, alpha-Endosulfin im Vergleich zu einem normalen physiologischen Wert im selben Gewebeextrakt oder in derselben Körperflüssigkeit aufweist.

In der DS-Gruppe wurde auch ein gestörter Glucose-Stoffwechsel beobachtet, indem die signifikant verringerte Aktivität von Phosphoglucose-Isomerase in früheren Arbeiten aufgezeigt wurde [41]. Solch ein verringertes alpha-Endosulfin könnte die Neurotransmitter-Freisetzung hemmen, die sich aus der kontinuierlichen Öffnung von K_{ATP} -Kanälen bei DS zusammen mit dem gestörten Glucose-Stoffwechsel ergibt.

Gemäß einer alternativen therapeutischen Strategie, die durch die vorliegende Erfindung ermöglicht wird, werden Substanzen, die K_{ATP} -Kanäle schließen können, zur Herstellung einer pharmazeutischen Präparation für die Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen, insbesondere AD, verwendet. Da die K_{ATP} -Kanäle physiologisch durch alpha-Endosulfin geschlossen werden und das Fehlen oder gesenkte Werte von alpha-Endosulfin zu einer verstärkten (unkontrollierten) Öffnung (Aktivität) dieser Kanäle führen, ist ein derartiges Fehlen oder gesenkte Werte von alpha-Endosulfin durch die Bereitstellung alternativer Verschlussmittel für diese K_{ATP} -Kanäle kompensierbar.

Vorzugsweise werden zum Schließen oder zur Blockierung der K_{ATP} -Kanäle antidiabetische Sulfonylharnstoffe verwendet, insbesondere Tolbutamid, Glibenclamid und Glipizid. Diese Substanzen wurden als Pharmazeutika bereits verwendet, doch für ganz andere Indikationen. Die Möglichkeit, diese Substanzen bei der Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu verwenden, insbesondere ihre Verwendung bei der Behandlung von AD, wird durch die vorliegende Erfindung direkt ermöglicht, ist jedoch angesichts des Standes der Technik, in welchem die spezifische Rolle von alpha-Endosulfin oder den K_{ATP} -Kanälen bei neurodegenerativen Erkrankungen überhaupt nicht angesprochen wurde, völlig überraschend.

Die vorliegende Erfindung ist in den Beispielen und Zeichnungsfiguren weiters beschrieben, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Fig. 1 zeigt Western Blots mit den alpha-Endosulfin-Expressionsmengen in der Stirn-Cortex (A) und im Cerebellum (B) von Patienten mit AD und von Kontrollen (denaturierte Gehirn-Proteine (10 µg) wurden auf SDS-PAGE getrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert, mit gereinigten Kaninchen-polyklonalen IgGs gegen alpha-Endosulfin nachgewiesen und mit Chemilumineszenz-Reagentien entwickelt);

Fig. 2 zeigt einen Immunoblot für alpha-Endosulfin in der Stirn-Cortex (A) und im Cerebellum (B) von Patienten mit DS und von Kontrollen (denaturierte Gehirn-Proteine (10 µg) wurden aufgetragen, auf einem homogenen 12,5% Gel getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert; die Membran wurde mit Kaninchen-Antiseren gegen alpha-Endosulfin inkubiert; immunreaktives alpha-Endosulfin wurde in 19 kDa unter Verwendung von Chemilumineszenz-Reagentien nachgewiesen);

Fig. 3 zeigt eine Sequenz-Ausrichtung von alpha-Endosulfin, beta-Endosulfin und ARPP-19.

Beispiele:

1.: Alpha-Endosulfin-Bestimmung bei AD-Patienten

Menschliche Gehirnproben, die von einer Autopsie stammten, wurden von der MRC London Brain Bank for Neurodegenerative Diseases, Institute for Psychiatry, erhalten. Die AD-Patienten erfüllten die Kriterien des National Institute of Neurological Disorders and Stroke and Alzheimer's Disease and Related Disorders Association für eine wahrscheinliche AD. Die neuropathologische Diagnose der "definitiven AD" wurde unter Verwendung der CERAD-Kriterien bestätigt. Normalgehirne, die von Individuen, die keine neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen erlitten hatten, stammten, wurden als Kontrollen verwendet. Zwei Gehirnregionen (Stirn-Cortex und Cerebellum) von Patienten mit AD und Kontrollen wurden verwendet (vgl. Tabelle 1). Die Haupttodesursache war Bronchopneumonie bei AD und eine Herzerkrankung bei den Kontrollen. Die alpha-Endosulfin-Protein-Expressionsmengen wurden durch Western Blot mit spezifischen Antikörpern für alpha-Endosulfin gezeigt (vgl. Fig. 1) [Hinweis auf Antikörper]. Im Vergleich zu Kontrollen wurde alpha-Endosulfin (19 kDa) in der Stirn-Cortex und im Cerebellum von Patienten mit AD, überhaupt oder fast nicht nachgewiesen.

Tabelle 1. Autopsie-Daten, die bei dieser Studie verwendet wurden

	Geschlecht (männl./weibl.)	Alter (Jahre)	Autopsie-Intervall (Stunden)
Stirn-Cortex	Kontrolle 7:3	62,60 ± 8,02	37,30 ± 18,39
	DS 3:4	60,71 ± 9,48	29,43 ± 30,07
Cerebellum	Kontrolle 6:3	63,11 ± 8,33	38,89 ± 18,77
	DS 6:4	60,80 ± 8,42	31,80 ± 28,34

Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Nützlichkeit von alpha-Endosulfin als diagnostischen Marker und als Ziel für eine Arzneistoff-Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie AD.

2.: Alpha-Endosulfin bei DS-Patienten

Materialien und Methoden:

Gehirnproben: Menschliche Gehirnproben, die aus einer Autopsie stammten, wurden von der MRC London Brain Bank for Neurodegenerative Diseases, Institute of Psychiatry, erhalten. Alle DS-Patienten wurden karyotypisiert und hatten Trisomie 21. Eine formal-kognitive Beurteilung der Demenz bei DS wurde nicht durchgeführt. Bei allen DS-Gehirnen gab es reichliche und

umfassende beta-Amyloid-Ablagerungen, Neurofibrillen-Verflechtungen und Neuriten-Plaques, und sie wiesen AD-Neuropathologien auf. Normale Gehirne, die von Individuen stammten, welche keine neurologische oder psychiatrische Krankheit erlitten hatten, wurden als Kontrollen verwendet. Zwei Gehirn-Regionen (Stirn-Cortex und Cerebellum, die bei DS regelmäßig beeinträchtigt sind) von Patienten mit DS und von Kontrollen wurden für die Untersuchungen auf Protein-Ebene verwendet (Tabelle 2). Die Haupttodesursache bei DS war Bronchopneumonie, und bei den Kontrollen eine Herzkrankheit. Koronal-Schnitte wurden sofort gefroren und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

Tabelle 2. Autopsie-Daten, die bei dieser Studie verwendet wurden

	<i>Geschlecht (männl./weibl.)</i>	<i>Alter (Jahre)</i>	<i>Autopsie-Intervall (Stunden)</i>
Stirn-Cortex	Kontrolle 7:3	62,60 ± 8,02	37,30 ± 18,39
DS	6:2	55,88 ± 7,97	32,38 ± 20,70
Cerebellum	Kontrolle 6:3	63,11 ± 8,33	38,89 ± 18,77
DS	4:2	55,83 ± 9,37	28,00 ± 23,21

Probenherstellung: Gehirngewebe wurden in Homogenat-Puffer bestehend aus 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,05% (V/V) Tween 20, 4% CHAPS, 1 mM EDTA und einer Mischung aus Protease-Inhibitoren, 1 mM PMSF und 1 mg/ml jeweils von Pepstatin A, Chymostatin, Leupeptin und Antipain suspendiert. Die Suspension wurde in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator bei 4°C homogenisiert und bei 10.000xg 10 min lang zentrifugiert. Mit dem BCA-Protein-Testset (Pierce, USA) wurde die Protein-Konzentration im Überstand bestimmt.

Immunoblots: Gehirnproben (10 mg) wurden mit demselben Volumen Proben-Puffer (125,5 mM Tris, 70 mM SDS, 0,001% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 2% 2-Mercaptoethanol, pH 6,8) gemischt, bei 95°C 15 min lang inkubiert und auf 12,5% ExcelGel, ein homogenes SDS-Gel (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden), geladen. Die Elektrophorese erfolgte mit einem Multiphor II Electrophoresis System (Amersham Pharmacia Biotech, Schweden). Auf dem Gel separierte Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) übertragen, und die Membran wurde in Blockierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, 1% Mager-Trockenmilch) blockiert. Die Membran wurde 4 h lang bei Raumtemperatur mit 1:2000 verdünnten, gereinigten polyklonalen Kaninchen-IgGs für alpha-Endosulfin inkubiert. Nach dreimaligem 15 min langem Waschen mit Blockierungspuffer wurden die Membranen mit einer 1:1000-Verdünnung des sekundären Antikörpers, anti-Kaninchen-IgG(H+L), an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Southern Biotechnology Associates, Inc., Alabama, USA) als Sonde 1 h lang untersucht. Die Membran wurde dreimal 15 min lang gewaschen und mit dem Western Blot-Chemilumineszenz-Reagens (NENä Life Science Products, Inc., USA) entwickelt.

Ergebnisse: Die Immunoblot-Analyse zeigte, dass das 19-kDa alpha-Endosulfin-Protein sowohl in der Stirn-Cortex als auch im Cerebellum von Patienten mit DS im Vergleich zu den Kontrollen extrem verringert oder nicht vorhanden war. Wie in Fig. 2 gezeigt, wurde alpha-Endosulfin in der Stirn-Cortex von männlichen DS-Patienten und im Cerebellum von weiblichen DS-Patienten absolut oder fast nicht nachgewiesen. In der Stirn-Cortex von weiblichen DS-Patienten und im Cerebellum von männlichen DS-Patienten wurde alpha-Endosulfin in einer von beiden Proben schwach nachgewiesen, hatte jedoch im Vergleich zu den Kontrollen eine sehr geringe Dichte.

Die vorliegenden Ergebnisse legen daher die biologische Rolle von alpha-Endosulfin im Gehirn sehr deutlich nahe. Sie zeigen, dass alpha-Endosulfin ein sehr nützlicher endogener Marker für Neurotransmitter-Defizite, die mit K_{ATP}-Kanälen bei neurodegenerativen Erkrankungen mit kognitiven Defekten verbunden sind, ist.

Literaturstellen (durch Bezugnahme hierin mit eingeschlossen):

- [1] Virsolvy-Vergine A., Leray H., Kuroki S., Lupo B., Dufour M., und Bataille D. Endosulfine, an endogenous peptidic ligand for the sulfonylurea receptor: purification and partial characteri-
5 sation from ovine brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 (1992) 6629-6633.
- [2] Virsolvy-Vergine A., Salazar G., Sillard R., Denoroy L., Mutt V., und Bataille D. Endosulfine, endogenous ligand for the sulfonylurea receptor: isolation from porcine brain and partial struc-
tural determination of the alpha form, *Diabetologia*, 39 (1996) 135-141.
- [3] Peyrollier K., Heron L., Virsolvy-Vergine A., Le Cam A., Bataille D. Alpha endosulfine is a
10 novel molecule, structurally related to a family of phosphoproteins, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223 (1996) 583-586.
- [4] Heron L., Virsolvy A., Apiou F., Le Cam A., und Bataille D. Isolation, characterization, und chromosomal localization of the human ENSA gene that encodes alpha-endosulfine, a regulator of beta-cell K(ATP) channels, *Diabetes*, 48 (1999) 1873-1876.
- [5] Heron L., Virsolvy A., Peyrollier K., Gribble F., Le Cam A., Ashcroft F. M., und Bataille D.,
15 Human alpha-endosulfine, a possible regulator of sulfonylurea-sensitive K_{ATP} channel: Molecular cloning, expression and biological properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 8387-8391.
- [6] Inagaki N., Gonoi T., Clement J. P. 4th, Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., und Bryan J. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus sulfonylurea
20 receptor, *Science*, 270 (1995) 1166-1170.
- [7] Sakura H., Ammala C., Smith P. A., Gribble F. M., und Ashcroft F. M., Cloning and functional expression of the cDNA encoding a novel ATP-sensitive potassium channels subunit expressed in pancreatic beta-cells, brain, heart and skeletal muscle, *FEBS Lett.*, 377 (1995)
25 338-344.
- [8] Clement J. P. 4th, Kunjilwar K., Gonzalez G., Schwantstecher M., Panten U., Aguilar-Bryan L., und Bryan J., Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits, *Neuron*, 18 (1997) 827-838.
- [9] Shyng S., und Nichols C. G., Octameric stoichiometry of the KATP channel complex, *J. Gen. Physiol.*, 110 (1997) 655-664.
- [10] Schwappach B., Zerangue N., Jan Y. N., und Jan L. Y., Molecular basis for K(ATP) assembly: transmembrane interactions mediate association of a K⁺ channel with an ABC transporter,
30 *Neuron*, 26 (2000) 155-167.
- [11] Tucker S. J., Gribble F. M., Zhao C., Trapp S., und Ashcroft F. M. Truncation of Kir6.2 produces ATP-sensitive K⁺ channels in the absence of the sulfonylurea receptor, *Nature*, 387
35 (1997) 179-183.
- [12] Aguilar-Bryan L., Nichols C. G., Wechsler S. W., Clement J. P. 4th, Boyd A. E. 3rd, Gonzalez G., Herrera-Sosa H., Nguy K., Bryan J., und Nelson D. A., Cloning of the beta cell high-affinity sulfonylurea receptor: a regulator of insulin secretion, *Science*, 268 (1995) 423-426.
- [13] Miller R. J., Glucose-regulated potassium channels are sweet news for neurobiologists,
40 *Trends Neurosci.*, 13 (1990) 197-199.
- [14] Mourre C., Widmann C., und Lazdunski M., Sulfonylurea binding sites associated with ATP-regulated K⁺ Channels in the central nervous system: autoradiographic analysis of their distribution and ontogenesis, and of their localization in mutant mice cerebellum, *Brain Res.*, 519
45 (1990) 29-43.
- [15] Mourre C., Widmann C., und Lazdunski M., Specific hippocampal lesions indicate the presence of sulfonylurea binding sites associated to ATP-sensitive K⁺ channels both post-synaptically and on mossy fibers, *Brain Res.*, 540 (1991) 340-344.
- [16] Amoroso S., Schmid-Antomarchi H., Fosset M., und Lazdunski M., Glucose, antidiabetic sulfonylureas and neurotransmitter release. Role of ATP-sensitive K⁺ channels, *Science*, 247
50 (1990) 852-854.
- [17] Lazdunski M., Ion channel effects of antidiabetic sulfonylureas, *Horm. Metab. Res.*, 28 (1996) 488-495.
- [18] Lopez L., und Sannita W. G., Glucose availability and the electrophysiology of the human
55 visual system, *Clin. Neurosci.*, 4 (1997) 336-340.

- [19] Sakuta H., ATP-sensitive potassium channel and hormone/neuropeptide, *Nippon. Naibunpi. Gakkai. Zasshi.*, 71 (1995) 579-586.
- [20] Gold P. E. Role of glucose in regulating the brain and cognition, *Am. J. Clin. Nutr.*, 61 (suppl), (1995) 987S-995S.
- 5 [21] Kozlowski R. Z., Hales C. N., and Ashford M. L. J. Dual effects of diazoxide on ATP-K⁺ currents recorded from an insulinsecreting cell line. *Br. J. Pharmacol.* 97 (1989) 1039-1050.
- [22] Edwards G., Weston A. H., The pharmacology of ATP-sensitive potassium channels, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 33 (1993) 597-637.
- [23] Quast U., Potassium channel openers: pharmacological and clinical aspects, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, 6 (1992) 279-293.
- 10 [24] Sturgess N. C, Hales C. N., Cook D. L., and Ashford, M. L. J. The sulphonylurea receptor may be an ATP-sensitive K⁺ channel. *Lancet*, 2 (1985) 474-475.
- [25] Schmid-Antomarchi H., De Weille J. R., Fosset M., and Lazdunski M., The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 15840-15844.
- 15 [26] Lee K., Brownhill V, and Richardson P. J. Antidiabetic sulphonylureas stimulate acetylcholine release from striatal cholinergic interneurons through inhibition of K(ATP) channel activity, *J. Neurochem.*, 69 (1997) 1774-1776.
- [27] Haj-Dahmans S., Laporte A. M., Vantalon V., Fattaccini C. M., Hamon M., and Lanfumey L. Possible involvement of K(ATP) channels in the control of 5-HT neurons, *Brain Res.*, 614 (1993) 270-278.
- 20 [28] Grenhoff J., and Johnson S. W., Sulfonylureas enhance GABA_A synaptic potentials in rat midbrain dopamine neurons, *Acta Physiol. Scand.*, 156 (1996) 147-148.
- [29] Crepel V., Rovira C., and Ben-Ari Y., The K⁺ channel opener diazoxide enhances glutamatergic currents and reduces GABAergic currents in hippocampal neurons, *J. Neurophysiol.*, 69 (1993) 494-503.
- 25 [30] Lauritzen I., De Weille J. R., and Lazdunski M. The potassium channel opener (-)-cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons, *J. Neurochem.*, 69 (1997) 1570-1579.
- [31] Korol D. L., and Gold P. E., Glucose, memory, and aging, *Am. J. Clin. Nutr.*, 67(suppl), (1998) 764S-771S.
- 30 [32] Schapiro M. B., Haxby J. V., and Grady C. L., Nature of mental retardation and dementia in Down syndrome: study with PET, CT, and neuropsychology, *Neurobiol. Aging*, 13 (1992) 723-734.
- [33] During M. J., Leone P., Davis K. E., Kerr D., and Sherwin R. S. Glucose modulates rat substantia nigra GABA release in vivo via ATP-sensitive potassium channels, *J. Clin. Invest.*, 95 (1995) 2403-2408.
- 35 [34] Kish S. J., Distefano L. M., Dozic S., Robitaille Y., Rajput A., Deck J. H., and Hornykiewicz O., [3H] Vesamicol binding in human brain cholinergic deficiency disorders, *Neurosci. Lett.*, 117 (1990) 347-352.
- 40 [35] Godridge H., Reynolds G. P., Czudek C., Calcutt N. A., and Benton M., Alzheimer-like neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 50 (1987) 775-778.
- [36] Yates C. M., Simpson J., Gordon A., Maloney A. F., Allison Y., Ritchie I. M., and Urquhart A., Catecholamines and cholinergic enzymes in pre-senile and senile Alzheimer-type dementia and Down's syndrome, *Brain Res.*, 280 (1983) 119-126.
- 45 [37] Fiedler J. L., Epstein C. J., Rapoport S. I., Caviedes R., and Caviedes P., Regional alteration of cholinergic function in central neurons of trisomy 16 mouse fetuses, an animal model of human trisomy 21 (Down syndrome), *Brain Res.*, 658 (1994) 27-32.
- [38] Reynolds G. P., and Warner C. E., Amino acid neurotransmitter deficits in adult Down's syndrome brain tissue, *Neurosci. Lett.*, 94 (1988) 224-227.
- 50 [39] Reynolds G. P., and Godridge H., Alzheimer-like brain monoamine deficits in adults with Down's syndrome, *Lancet*, 2 (1985) 1368-1369.
- [40] Mann D. M., Yates P. O., Marcyniuk B., and Ravindra C. R., Pathological evidence for neurotransmitter deficits in Down's syndrome of middle age, *J. Ment. Defic. Res.*, 29 (1985)
- 55

125-135.

[41] Labudova O., Cairns N., Kitzmuller E., und Lubec G., Impaired brain glucose metabolism in patients with Down syndrome, J. Neural. Transm. (Suppl), 57 (1999) 247-256.

5

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Diagnostizierung einer neurodegenerativen Erkrankung, welches die Schritte umfasst:
 - 10 • die Bereitstellung einer Probe eines Individuums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis und Lymphe sowie Nervengewebe, vorzugsweise Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, und Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren, für das eine Diagnose erstellt werden soll,
 - 15 • die Messung der Menge an alpha-Endosulfin in dieser Probe, und
 - das Vergleichen der gemessenen Menge an alpha-Endosulfin mit einem Bezugswert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die neurodegenerative Erkrankung Alzheimer-Krankheit ist.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die neurodegenerative Erkrankung die altersabhängige Neurodegeneration vom Alzheimer Krankheits-Typ bei Down-Syndrom Patienten ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Menge an alpha-Endosulfin durch Immundetektion mit alpha-Endosulfin-spezifischen Antikörpern gemessen wird.
- 25 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Menge an alpha-Endosulfin in mehr als einer Körperflüssigkeit oder in mehr als einem Gewebeextrakt gemessen wird.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Bezugswert der Wert eines gesunden Individuums ist, das nicht von der neurodegenerativen Erkrankung betroffen ist, wobei der Bezugswert in der entsprechenden Körperflüssigkeit oder im entsprechenden Gewebeextrakt gemessen wird, gegebenenfalls mit derselben Meßmethode.
- 35 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Bezugswert parallel zur Messung der Probe, für die eine Diagnose erstellt werden soll, gemessen wird.
- 40 8. Set zur Detektion von alpha-Endosulfin, umfassend
 - Mittel zum Messen von alpha-Endosulfin,
 - eine Probe eines Individuums ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Blut, Plasma, Serum, Liquor cerebrospinalis und Lymphe sowie Nervengewebe, vorzugsweise Gehirngewebe, insbesondere Cerebellum und Stirn-Cortex, und Gewebe peripherer Organe, insbesondere Leber, Herz und Nieren, für das eine Diagnose erstellt werden soll,
 - 45 • einen alpha-Endosulfin-Bezugswert.
- 50 9. Set nach Anspruch 8, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Mittel zum Messen von alpha-Endosulfin ausgewählt sind aus alpha-Endosulfin-Antikörpern und alpha-Endosulfin-spezifischen Nukleinsäuren.
- 55 10. Set nach Anspruch 8 oder 9, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Bezugswert eine von einem Normalplasma-Pool stammende Probe, vorzugsweise in lyophilisierter Form, ist.

11. Set nach einem der Ansprüche 8 bis 10, *dadurch gekennzeichnet*, dass der Bezugswert eine Reihe von alpha-Endosulfin-Lösungen mit verschiedenen alpha-Endosulfin-Konzentrationen ist.

5

Hiezu 3 Blatt Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

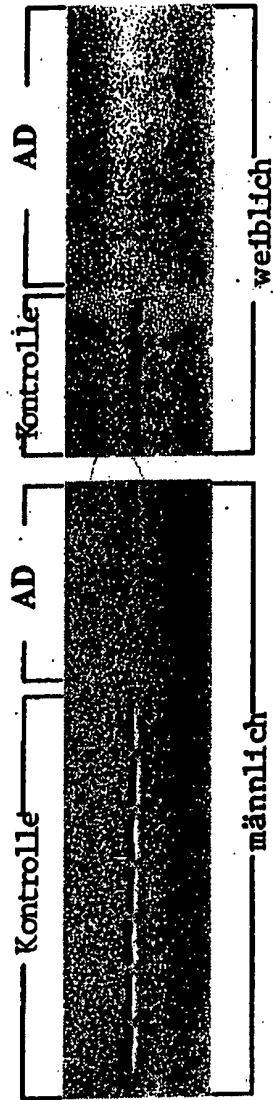
45

50

55



A



B

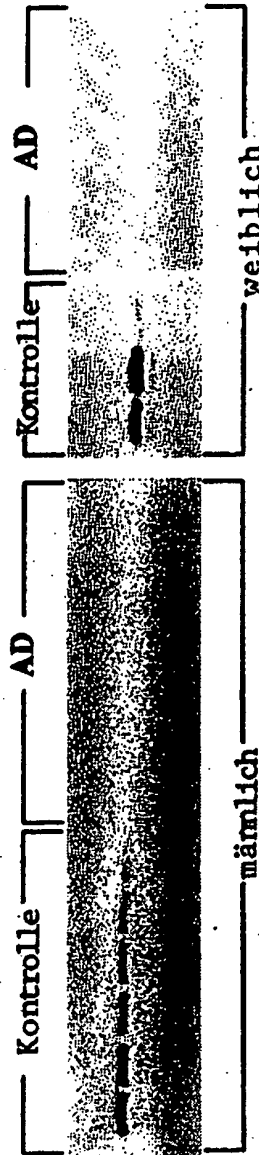


FIG. 1

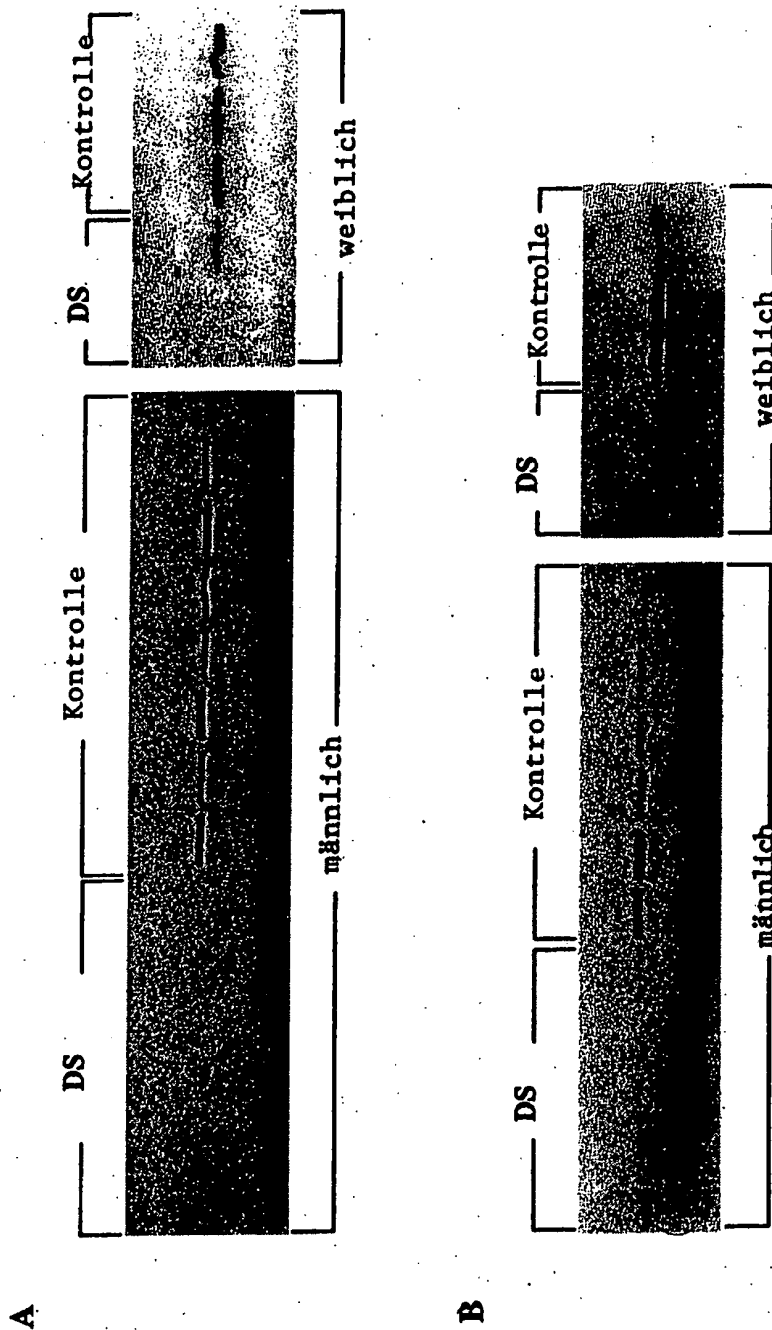


FIG. 2



Alpha-Endosulfin

SQ SEQUENZ 121 AA; 13389 MW; 7C76315AA17E7542 CRC64;
MSQKQEEENP AEETGEEKQD TQKEGILPE RAERAKLAK YPSLGQKPGG SDFLMKRLQK GKQYFDSGDY NNAKAKNNK QLPFAGPDKN LVTGDHIPTP QDLFQRSSSL
VTSKLAGGV E

Beta-Endosulfin

SQ SEQUENZ 117 AA; 12976 MW; D17E754219767472 CRC64;
MSQKQEEENP AEETGEEKQD TQKEGILPE RAERAKLAK YPSLGQKPGG SDFLMKRLQK GKQYFDSGDY NNAKAKNNK QLPFAGPDKN LVTGDHIPTP QDLFQRSSSL
VTSKLAG

ARPP-19

SQ SEQUENZ 111 AA; 12192 MW; 357D3F039EDCABC1 CRC64;

SAEVPBAASA EEQKEMEDKV TSPEKAREAK LEARYPHLQK KFGSDYLAK RLQKGQKYFD SGIYNNAKAK MNKQLPTAA PDKTEVTGDH IPTPDQLPQR KPSLVASKLA G

A-ES: MSQKQEEENP AEETGEEKQD TQKEGILPE RAERAKLAK YPSLGQKPGG SDFLMKRLQK GKQYFDSGDY NNAKAKNNK QLPFAGPDKN LVTGDHIPTP QDLFQRSSSL VTSKLAGGV E
B-ES: MSQKQEEENP AEETGEEKQD TQKEGILPE RAERAKLAK YPSLGQKPGG SDFLMKRLQK GKQYFDSGDY NNAKAKNNK QLPFAGPDKN LVTGDHIPTP QDLFQRSSSL VTSKLAG
ARPP-19: PBAASA EEQKEMEDKV TSPEKAREAK LEARYPHLQK KFGSDYLAK RLQKGQKYFD SGIYNNAKAK MNKQLPTAA PDKTEVTGDH IPTPDQLPQR KPSLVASKLA G

Fig. 3