



(10) **DE 10 2012 017 566 A1** 2013.10.10

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2012 017 566.3**

(22) Anmeldetag: **04.09.2012**

(43) Offenlegungstag: **10.10.2013**

(51) Int Cl.: **G01N 33/53** (2012.01)

(66) Innere Priorität:
10 2012 006 597.3 04.04.2012

(72) Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

(71) Anmelder:
Labeit, Dittmar, Dr. med., 68219, Mannheim, DE

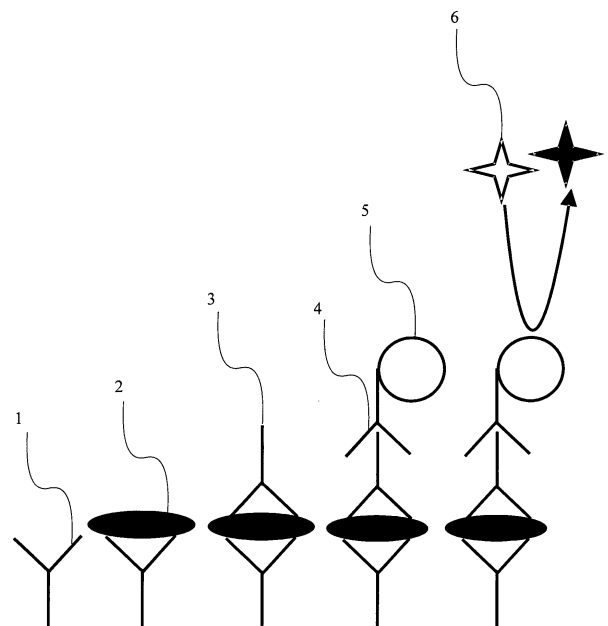
Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Der Inhalt dieser Schrift weicht von den am Anmeldetag eingereichten Unterlagen ab.

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelschäden und Herzumbauprozessen (Remodelling) durch den Nachweis von herzspezifischem Titin in Körperflüssigkeiten mittels Titin-Exon-49 (N2B) spezifischer Antikörper**

(57) Hauptanspruch: Feststellung einer Herzmuskelschädigung und Herzumbauprozessen (Remodelling) durch den Nachweis von herzspezifischen Titinsequenzen aus dem Titin-Exon-49-(N2B)-Bereich. dadurch gekennzeichnet, dass aus der Exon-49-(N2B)-Titinsequenz, bestehend aus 928 Aminosäuren oder Abschnitten davon, polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt werden, die Titin-Exon 49 (N2B)-spezifisch sind.



Beschreibung

Definition der Herzmuskelschädigung

[0001] Die häufigste Herzmuskelschädigung ist der Untergang von Herzmuskelzellen auf Grund einer Sauerstoffunterversorgungssituation (Ischämie) des Herzens bzw. einer umschriebenen Region des Herzens. Die Herzhyskelzellen sind nicht mehr (ausreichend) mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt, weshalb sie absterben. Die Ursachen für die Unterversorgung mit Sauerstoff sind vielfältig: Verengung der Herzkranzgefäße durch Verkalkung oder Verschluss. Gefördert wird dieser Umstand durch Zigarettenrauchen, Bluthochdruck, hohe Blutfette, Zuckerkrankheit, Übergewicht, Bewegungsmangel, Stress usw. Daneben gibt es weitere Ursachen für eine Herzmuskelschädigung wie Reizleitungsstörungen, infektiöse und postinfektiöse, metabolische, toxische Ursachen. Weiter führen erworbene oder genetisch bedingte Kardiomyopathien zu einer Herzmuskelschädigung.

Definition „Remodelling“

[0002] Remodelling beschreibt Umbauprozesse des Herzens, die aufgrund einer veränderten Herzbelastung entstehen. So hypertrophieren z. B. nach einem Herzinfarkt die Herzmuskelbezirke, die von der Sauerstoffunterversorgung (Ischämie) nicht betroffen sind. Diese Hypertrophie dient der Kompensation der geschädigten (infarzierten) und nicht mehr kontrahierenden Herzbereiche. Aber auch bei Bluthochdruck (Hypertonie) oder Herzklappenfehlern kann es zum Remodelling und somit zu einer Herzmuskelhypertrophie kommen. Das Remodelling ist pathophysiologisch von großer Bedeutung, weil es die Pumpfunktion des Herzens aufrecht erhält, diese jedoch im weiteren Verlauf bedingt durch die Hypertrophie zunehmend einschränken kann und schließlich zur Herzinsuffizienz führen kann. Im hypertrophierten Zustand ist das Herz auch sehr anfällig für Herzrhythmusstörungen (z. B. Tachyarrhythmien), die tödlich enden können. Auch die Kardiomyopathien (erworben oder vererbt) fallen unter den Begriff „Remodelling“.

Vorkommen der Herzmuskelschädigung

[0003] Der Herzinfarkt ist die führende Todesursache für die Bevölkerung in Industrienationen. In Deutschland sterben jährlich ca. 200.000 Menschen an einem Herzinfarkt. Männer haben ein Risiko von ca. 30% in ihrem Leben einen Herzinfarkt zu erleiden, für Frauen in Deutschland liegt dieses Risiko bei ca. 15%.

[0004] Bei instabiler Angina Pectoris ist die Diagnose sehr unzuverlässig was die Interpretation einer Herzmuskelschädigung angeht. Bei der instabilen Angina Pectoris ist eine Verengung der Herzkranzgefäße durch Arteriosklerose die Ursache. Hier aber kommt es durch Risse und Brüche in den Ablagerungen zu einer Anlagerung von Blutplättchen (Thrombozyten), die einen Thrombus (Blutgerinnsel) bilden. Jedoch halten sich die Thrombusbildung und die thrombusauflösenden Vorgänge in etwa die Waage. So wird ein kompletter Gefäßverschluss verhindert. Gleichzeitig können aufgebrochene Plaques funktionell nicht richtig repariert werden. Der Zustand ist deshalb instabil. Die Gefahr, dass sich ein Thrombus löst und einen akuten Herzinfarkt bewirkt, ist sehr groß.

Verlauf der Herzmuskelschädigung

[0005] Je länger die Ischämiezeit (Zeit, in der der Herzmuskel mit Sauerstoff minderversorgt ist) andauert, umso ausgeprägter sind der Prozess des Zelluntergangs und desto schwerwiegender die Beeinträchtigung der Herzleistung.

Bisherige Diagnose der Herzmuskelschädigung

[0006] Die Diagnose stützt sich auf drei Bereiche:

1. Symptomatik (Druck und Engegefühl in der Brust).
2. Typischen EKG-Veränderungen (ST-Hebung).
3. Nachweis von Herzinfarktmarkern im Blut (vor allem Troponin I und T).

[0007] Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert das Vorliegen eines Infarktes für den Fall, dass mindestens zwei der drei oben genannten Kriterien beim Patienten vorliegen.

Probleme der bisherigen Diagnose einer Herzmuskelschädigung

[0008] Klinische Symptomatik: kann sehr unspezifisch sein. Bei bewusstlosen Patienten nur schwer zu erheben.

EKG-Veränderungen

[0009] Nur in 80% der Fälle zeigen sich die typischen EKG-Veränderungen bei einem frischen Infarkt. In 20% findet sich ein unauffälliges EKG bei bestehendem Infarkt. Der EKG-Befund kann innerhalb der ersten 24 Stunden nach dem Infarktbeginn negativ (unauffällig) sein, weshalb die Bestimmung von Herzinfarktmarkern (Laborwerte) im Blut die Verdachtsdiagnose auch bei unauffälligem EKG bestätigen müssen.

Stand der Technik der Serumdiagnostik einer Herzmuskelschädigung

[0010] Bei einem Herzinfarkt kommt es zu einer Verminderung des Blutflusses mit vermindertem Sauerstoffangebot, so dass der Erhaltungsstoffwechsel der Herzmuskelzelle nicht mehr aufrecht erhalten werden kann und es zu einem Absterben der Herzmuskelzellen kommt. Bisher werden zur Infarktdiagnostik kleine aus der Herzmuskelzelle freigesetzte Proteine (Troponine) und Enzyme (CK) verwendet, die herzspezifisch sind, d. h. nur in einer speziellen Isoform der Herzmuskelzelle vorkommen. Diese bisherigen Marker für eine Herzmuskelschädigung kommen in der Skelettmuskulatur auch vor, jedoch in anderen Isoformen. Da die Troponinbasierte Infarktdiagnostik gegen die Herz-spezifischen Abschnitte der Troponin-I, und -T-Isoformen gerichtet sein müssen und nur wenige herzspezifische Aminosäuren umfassen steht somit nur eine begrenzte Auswahl an herzspezifischen Troponin-Epitopen für die Antikörperentwicklung zur Verfügung.

[0011] Als empfindliche (sensitive) Marker für einen Herzinfarkt haben sich die Herzmuskelproteine Troponin I und Troponin T etabliert: Troponin T und -I sind Proteine der Herzmuskelzellen, die eine wichtige Rolle für die Kontraktion des Herzens spielen. Bei einem Untergang von Herzmuskelzellen im Rahmen des Infarktgeschehens gelangen sie ins Blut, wo ihre Konzentration frühestens drei Stunden nach Beginn des Infarktes ansteigt. Das Konzentrationsmaximum im Blut wird nach 20 Stunden erreicht und ein bis zwei Wochen nach dem Infarktgeschehen haben sich die Troponin-Werte wieder normalisiert.

[0012] Vor allem für Patienten, die an Schmerzen im Brustkorb leiden, aber keine EKG-Verlaufsveränderung aufweisen, dienen die Troponin-Marker der Diagnosestellung:

Ist die Menge der Troponine im Blut über einen bestimmten Wert erhöht, liegt mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ein Myokardinfarkt mit Zelluntergang vor und ein Eingriff zur Gefäßwiedereröffnung ist angezeigt. Fällt die Troponinbestimmung negativ aus, d. h. liegen die Marker-Werte unter einer bestimmten Grenze, so kann ein Herzinfarkt nahezu ausgeschlossen und die Diagnose „instabile Angina pectoris“ gestellt werden.

[0013] Auch die Bestimmung des Enzyms CK-MB (Kreatinkinase des Herzmuskels) dient zur Feststellung einer Herzmuskelschädigung. Bei einem ausgedehnten Herzinfarkt gehen viele Muskelzellen unter, so dass dieses intrazelluläre Enzym in die Blutbahn übertritt. Zusammen mit dem klinischen Zeichen des Brustschmerzes kann die CK-MB-Konzentration in der Blutprobe einen deutlichen diagnostischen Hinweis auf einen Herzinfarkt geben. Die Konzentration im Blut steigt ca. 4–8 Stunden nach Beginn des Infarktes an, womit die CK-MB-Konzentration im Gegensatz zu den Troponinen ein langsamer Marker des Myokardinfarktes ist. Die CK-MB-Bestimmung dient eher der Diagnosesicherung als ihrer Erhebung.

[0014] Auch Myoglobin, GOT (AST), LDH, HBDH dienen zur nachträglichen Bestätigung der Infarktdiagnose.

[0015] Myoglobin: Lokalisation im Zytosol, nicht herzmuskelspezifisch, hoher negativer prädiktiver Wert, Diagnose muss bei erhöhtem Myoglobin durch herzspezifischen Marker wie z. B. Troponin I bestätigt werden. Bei instabiler Angina Pectoris erbringen die Serumwerte der bisherigen Marker für eine Herzmuskelschädigung keine zuverlässigen prädiktiven Ergebnisse.

Troponine als bisheriger Goldstandard

[0016] Da eine schnelle Diagnostik und eine zügige Therapieeinleitung erreicht werden soll, um weiteres Myokardgewebe vor dem Untergang zu schützen, sind die Troponine der Goldstandard (die zurzeit beste und effizienteste Methode zur Feststellung einer vorliegenden Herzmuskelschädigung) in der Enzymdiagnostik (Blutuntersuchung) bei Verdacht auf Herzinfarkt. Aufgrund der Herzspezifität kann ein anderer Schädigungsort aus-

geschlossen werden. Also nicht betroffen bei Muskelerkrankungen, Skelettmuskelverletzungen (Marathonläufen, operativen Eingriffen, Sturz), starke Muskelbeanspruchung, große Verletzungen bei der Wiederbelebung.

Normwert: negativ bzw. $< 0,1$ ng/ml

Kinetik: Troponin T und I werden ca. 3,5 h nach Infarkt im Serum nachweisbar. Biphasische Freisetzung, erster Gipfel nach ca. 20 h, bei erfolgreicher Fibrinolyse nach 11 h. Troponin T bleibt ca. 6–14 Tage nachweisbar.

Bestimmungsmethode:

Quantitativ: ELISA, Normwert: nicht nachweisbar, pathologisch: $> 0,1$ ng/ml.

Qualitativ: Troponin T Schnelltest® (Streifentest). Positives Ergebnis, wenn Troponin T $> 0,1$ ng/ml.

Bewertung: sensitivster Marker eines Herzmuskelschadens, ein Myokardinfarkt liegt bei Spiegel $> 1,5$ ng/ml vor (Sensitivität und Spezifität $> 95\%$). Früh positiv, d. h. es kann noch mit Fibrinolyse oder PTCA (Ballondilatation eines verengten Herzkranzgefäßes) reagiert werden.

Charakterisierung von Troponin

[0017] Troponin I ist ein 23 kDa Protein und bildet zusammen mit den weiteren Untereinheiten Troponin C (18 kDa) und Troponin T (35 kDa) den Troponin-Komplex für die kalzium-abhängige Interaktion zwischen den Aktin- und Myosinfilamenten. Für Troponin C gibt es keine herzspezifische Isoform, für Troponin I und T gibt es herzspezifische Isoformen, d. h. ihre Aminosäuresequenz unterscheidet sich von denen der Skelettmuskulatur, und lassen sich daher selektiv detektieren. Jedoch ist der Unterschied gering, so dass man nur eine geringe Anzahl an potentiellen herzspezifischen Troponinabschnitten hat, gegen die man Antikörper herstellen kann.

[0018] Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegen die Mängel der bisherigen Methoden der Serumdiagnostik einer Herzmuskelschädigung bzw. von Herzumbauprozessen (Remodelling) zugrunde.

1. 4% des Troponins I liegt nicht komplexgebunden am Aktin vor und ist somit damit frei im Cytosol zu finden und kann bei schwerer Ischämie durch passagere Störung der Zellmembran freigesetzt werden. Die ist bei der instabilen Angina Pectoris der Fall. Hier kann es also zu falsch positiven Ergebnissen für einen Herzinfarkt kommen.
2. Bei Troponin T (nicht bei Troponin I) sind bei Nierenfunktionsstörungen falsch hohe Konzentrationen bekannt. Ursache wahrscheinlich durch verminderte Nierenausscheidung.
3. Heterophile Antikörper, Autoantikörper und Rheumafaktoren erzeugen falsch-positive Werte für den Immunoassays für Troponin I und T, weil diese Antikörper mit den im Immunoassay eingesetzten Antikörpern reagieren.
4. Problem der Kreuzreaktivität: CK-MB und Troponine sind zwar herzspezifisch, jedoch gibt es Isoformen auch in der Skelettmuskulatur. Je nach Spezifität der verwendeten Antikörper sind Kreuzreaktionen nicht ausgeschlossen, d. h. bei einer gleichzeitig vorliegenden Skelettmuskelschädigung (z. B. durch Sturz oder im Rahmen der Reanimation) können auch falsch positive Troponin- oder CK-MB-Werte angezeigt werden.
5. Bisher gibt es keine geeigneten Marker für Restrukturierungs(Umbau)-Prozesse des Herzens.

[0019] Diese Probleme werden durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale gelöst.

1. Herzspezifität. Die Titin-Exon-49-(N2B)-Sequenz ist absolut herzspezifisch, d. h. diese Sequenz kommt nur im Herzmuskel vor und findet sich nicht in der Skelettmuskulatur und nicht im glatten Muskel. Es gibt somit keine Problematik der Kreuzreaktivität, da es keine Isoformen der Titin-Exon 49-(N2B)-Sequenz in anderen Muskeln (Skelettmuskel, glatter Muskel) gibt.
2. Spezifität für den Myofibrillenuntergang. Titin-Exon 49-(N2B)-Aminosäuren kommen nicht frei im Cytosol vor, sondern sind fest eingebunden in den elastischen Titinanteil des kontraktile Apparates. Erst wenn die kontraktile Einheit geschädigt wird, können Titin-Exon 49-(N2B)-Proteine freigesetzt werden.
3. Hohe Spezifität und Sensitivität durch die ausgedehnte Zielstruktur für den Nachweis. Titin ist das größte Protein des Menschen und besteht aus bis zu 38.138 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht bis zu 4,2 Mega-Dalton. Es umspannt die gesamte Myofibrille und ist im Verbund mit Aktin und Myosin an der Kontraktion beteiligt. Die herzspezifische Titinsequenz Exon-49-(N2B) besteht aus 928 Aminosäuren (Exon 49). Wir zeigen hier dass Abschnitte dieser Sequenz im Serum bei Herzmuskelschädigung mittels spezifischer Antikörper im ELISA quantitativ nachgewiesen werden können. Dabei ergibt die Kombination mehrerer Antikörper aus dem Titin-Exon 49-(N2B)-Bereich eine besonders hohe Sensitivität und Spezifität. Da das Titin-Exons 49 (N2B) nach unseren Arbeiten der größten bekannten Herz-spezifischen Sequenz entspricht, können gegen eine Vielzahl von Titin-Exon-49-(N2B)-Epitopen Herzspezifische Antikörper hergestellt werden mit den üblichen Verfahren zur Gewinnung polyklonaler oder monoklonaler Antikörper. Dadurch ergeben

sich vielfältige Kombinationsmöglichkeiten zur Erhöhung der Spezifität und Sensitivität. Durch die Sensitivitätssteigerung lassen sich erstmals auch sehr geringe Mengen an Titin-Exon 49-(N2B)-Peptiden in Körperflüssigkeiten nachweisen, wie sie bei Umbauprozessen im Rahmen von Restrukturierungsprozessen beim Herzen vorkommen. Somit konnten wir einen Remodelling und Marker für das für Kardiomyopathien finden.

Ausführungsbeispiel

Nachweisverfahren von Titin-Exon 49 (Titin-N2B) in Körperflüssigkeiten

Bau eines ELISA als Nachweissystem für herzspezifisches Titin (Exon 49)

[0020] Da die Menge der Freisetzung Titin-Exon 49 bei einer Herzschädigung (Zelluntergang beim Herzinfarkt) und Übergang ins Blutsystem sehr gering sein wird, ist eine direkte Nachweismethode nicht sinnvoll. Es bleibt nur die sehr empfindliche Nachweismethode über rekombinant hergestellte Antikörper, die sehr sensitiv und gleichzeitig auch hochspezifisch sind. Der ELISA („Enzyme-linked Immunosorbent Assay“) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren und basiert auf einer enzymatischen Farbreaktion. Wir benutzten die Technik des Sandwich-ELISA. Elisa-Sandwich-Technik ([Fig. 1](#). Stand der Technik): Hier werden zum Nachweis des Proteins zwei Antikörper verwendet, die beide an das nachzuweisende Protein binden. Der erste Antikörper (**1**) (auch coat oder capture-Antikörper genannt) wird an die feste Phase, in unserem Fall an den Boden der Mikrotiterplatte gebunden. Wir benutzen einen ersten rekombinant aus dem Titin-Exon 49-Bereich hergestellten Antikörper. Anschließend wird die zu untersuchende Probe dazugegeben (**2**), (diese enthält durch die Herzmuskelschädigung freigesetztes Titin-Exon 49-Proteine). Der an der Platte gebundene Antikörper bindet die freigesetzten Titin-Exon-49-Proteine. Nun findet ein Waschschriff statt und alle nicht gebundenen Anteile werden herausgewaschen. Zurück bleibt nur das am Coat-Antikörper gebundene Titin-Exon 49-Protein. Nun kommt ein zweiter (**3**) rekombinant hergestellter Titin-Exon 49-Antikörper (sogenannte Detektionsantikörper) hinzu. Dieser zweite Antikörper bindet ebenfalls an das Titin-Exon 49-Protein. Durch erneutes Waschen wird wieder überflüssiger Detektionspuffer ausgewaschen. Nun kann das Titin-Exon 49-Protein nachgewiesen werden. Der letzte Schritt ist die Zugabe eines dritten Antikörpers (**4**) (sogenannter sekundärer Antikörper). Es handelt sich um einen Antikörper der gegen den zweiten Antikörper gewonnen wurde. Dieser sekundäre Antikörper wird industriell hergestellt und ist mit einem Enzym (**5**) gekoppelt. Diese Antikörper binden an die nicht variablen Antikörperregionen und sind deshalb universal gegen alle Antikörper einsetzbar. Zum Enzym wird farbiges Substrat hinzugegeben (**6**), mit dem das Enzym arbeiten kann. Diese Reaktion führt zu einer Farbveränderung, die dann photometrisch ausgewertet wird. Um die Menge zu bestimmen, wird eine Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen aufgestellt und die gemessenen Werte mit dieser Kurve verglichen. Der Capture-Antikörper und der Detektionsantikörper werden rekombinant aus Fragmenten der Exon 49 Titinregion hergestellt. Grundlage war die humane Aminosäuresequenz der Exon 49 Titinregion.

Reaktionen im Einzelnen

Mikrotiterplatte mit 96 wells (NUNC, Maxisorp).

[0021] Zugabe von 100 µl Capture-Anti-Titin-N2B ($c = 5 \mu\text{g/ml}$). Coating buffer bestehend aus 0,2 M sodium carbonate/bicarbonate pH 9,4). Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Waschen 3 mal mit TEST (TBS mit 0,05% Tween 20). Anschließend blocken mit 300 µl 5% BSA in TEST über Nacht. Blocking Buffer entfernen und 100 µl Probenbuffer zufügen. Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nun 3 mal waschen mit TEST und hinzufügen von 100 µl Detektions-anti-titin-Exon 49 mit einer Konzentration von 1 mg/ml gelöst in Blockingbuffer. Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur und anschließend waschen 3 mal mit 100 µl TBST. Nun 100 µl Sekundär-Antikörper-HRP (Dako) verdünnt 1:2000 in Blockingbuffer. Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur wiederum waschen mit TBST (6 mal mit 100 µl). Nun zufügen von 100 µl Substrat (1 mg/ml TMB in DMSO, verdünnt 1:10 in 50 mM Phosphat-Zitrat-Buffer, der 0.001% H_2O_2 enthält. Die Reaktion wurde nach 60 Minuten gestoppt durch Hinzufügen von einem gleichen Volumen von 1 N HCL. Im Photometer wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

Ergebnis

[0022] [Fig. 2](#): Vergleich der Troponin T für 6 verschiedene Blutproben (Serum) bei Patienten mit sicherem Herzinfarkt (Proben 4 und 6) und unsicherem Herzinfarkt (Proben 1 bis 3 und 5).

[0023] [Fig. 2](#): Vergleich der Titin-Exon-49-Werte für 6 verschiedene Blutproben (Serum) bei denselben Patienten mit sicherem Herzinfarkt (Proben 4 und 6) und unsicherem Herzinfarkt (Proben 1 bis 3 und 5). Ein sicherer Herzinfarkt liegt vor, wenn Troponin T größer als 0.1 ng/ml, d. h. größer als 100 pg/ml ist.

[0024] Auf der X-Achse ist jeweils die Konzentration von Troponin T, bzw. von Titin-Exon-49 (Titin-N2B) in pg/ml dargestellt. Auf der Y-Achse sind dargestellt die Patienten mit klinisch sicherem Herzinfarkt (4 und 6) und klinisch unsicherem Herzinfarkt (1, 2, 3 und 5).

1. Es konnten zirkulierende Titin-Exon-49-(N2B)-Proteine im Serum von Herzinfarktpatienten und bei Patienten mit instabiler Angina Pectoris quantitativ nachgewiesen werden.
 2. Die Nachweisgrenze mit Titin-Exon 49-(Titin-N2B) beträgt zurzeit unter 10 pg/ml.
 3. Bei gesunden Patienten wurden deutlich weniger als 10 pg/ml Exon-49-(Titin-N2B)-Protein oder Fragmente davon im Serum nachgewiesen.
 4. Die Instabile Angina Pectoris Patienten werden mit größerer Sicherheit als solche klassifiziert als es mit den herkömmlichen Verfahren (Troponin T) möglich ist. Es findet ein deutlicherer Anstieg der Titin-Exon 49-Werte schon bei geringer Myokardschädigung statt im Vergleich zur Troponinbestimmung. Es findet bei den Patienten mit instabiler Pectoris eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 3 statt.
 5. Sicherere Diagnose schon bei geringer Herzmuskelschädigung im Vergleich zur Troponinbestimmung.
5. Es besteht eine hohe Korrelation zwischen den etablierten Troponin-T-Werten und den Titin-Exon-49-Werten ($R = 0.92$ bei 30 Fällen).

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0025] Die Nachweismethode lässt sich automatisieren und es lässt sich auch ein Schnelltest entwickeln.

Sequenzprotokoll: Titin Exon 49-(N2B) herzspezifische Sequenz

Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelschäden und Herzumbauprozessen
(Remodelling) durch den Nachweis von herzspezifischem Titin in
Körperflüssigkeiten mittels Titin-Exon-49 (N2B) spezifischer Antikörper.

<110> Dr. Dittmar Labeit

<120> Verfahren zur Bestimmung von Herzmuskelschäden und Herzumbauprozessen
(Remodelling) durch den Nachweis von herzspezifischem Titin in
Körperflüssigkeiten mittels Titin-Exon-49 (N2B) spezifischer Antikörper.

<130>

<140>

<141>

<150>

<151>

<160> 1

<170> word 2003

<210> 1

<211> 2784

<212> DNA

<213> Human

<220>

<221> CDS

<222> 1-2784

<223> Die Titin-Exon 49 (N2B)-Sequenz kommt nur in der Herzmuskulatur vor.
Das N2B-Exon entspricht dem Exon-49 in der Genbank-Einreichung
AJ277892.

<300>

<301> Freiburg A., Trombitas K., Hell W., Cazorla O., Fougerousse F.,
Centner T., Kolmerer B., Witt C., Beckmann J.S., Gregorio C.C.,
Granzier H., Labeit S.

<302> Series of exon-skipping events in the elastic spring region of titin as the
structural basis for myofibrillar elastic diversity.

<303> Circ. Res

<304>

<305> 86

<306> 1114-1121

<307> Datum der Zeitschrift

<308> AJ277892
 <309> Datenbank_eingangsdatum
 <310>
 <311>
 <312>
 <313>
 <400> 1

aca	gag	ttt	tct	agt	tct	ttt	ctg	tct	gcc	30
Thr	Glu	Phe	Ser	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	
1				5					10	
gag	gaa	gaa	gga	ctt	cat	agc	gcc	gaa	ctt	60
Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	His	Ser	Ala	Glu	Leu	
				15					20	
caa	tta	tct	aaa	ata	aat	gaa	aca	ctt	gaa	90
Gln	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Glu	Thr	Leu	Glu	
				25					30	
ctt	ttg	tct	gaa	tct	cca	gtt	tac	tca	act	120
Leu	Leu	Ser	Glu	Ser	Pro	Val	Tyr	Ser	Thr	
				35					40	
aaa	ttt	gat	tcc	gaa	aag	gaa	ggc	act	ggc	150
Lys	Phe	Asp	Ser	Glu	Lys	Glu	Gly	Thr	Gly	
				45					50	
cca	Att	ttc	atc	aaa	gaa	gtg	tca	aat	gct	180
Pro	Ile	Phe	Ile	Lys	Glu	Val	Ser	Asn	Ala	
				55					60	
gat	ata	agc	atg	ggg	gat	gtg	gct	aca	ctg	210
Asp	Ile	Ser	Met	Gly	Asp	Val	Ala	Thr	Leu	
				65					70	
tct	gta	act	gtc	att	ggc	atc	ccc	aaa	cct	240
Ser	Val	Thr	Val	Ile	Gly	Ile	Pro	Lys	Pro	
				75					80	
aaa	att	cag	tgg	ttc	ttt	aat	gga	gtg	cta	270
Lys	Ile	Gln	Trp	Phe	Phe	Asn	Gly	Val	Leu	
				85					90	
tta	acc	cct	tct	gct	gac	tac	aaa	ttt	gtt	300
Leu	Thr	Pro	Ser	Ala	Asp	Tyr	Lys	Phe	Val	
				95					100	
Ttt	gac	ggt	gat	gat	cat	agc	ctg	atc	att	330
Phe	Asp	Gly	Asp	Asp	His	Ser	Leu	Ile	Ile	
				105					110	
ctg	ttc	acc	aaa	ttg	gag	gat	gag	gga	gag	360
Leu	Phe	Thr	Lys	Leu	Glu	Asp	Glu	Gly	Glu	
				115					120	
Tat	aca	tgt	atg	gcc	agt	aat	gac	tat	gga	390
Tyr	Thr	Cys	Met	Ala	Ser	Asn	Asp	Tyr	Gly	
				125					130	
aag	aca	ata	tgt	agt	gcc	tat	cta	aaa	att	420

Lys	Thr	Ile	Cys	Ser 135	Ala	Tyr	Leu	Lys	Ile 140	
aat	tcc	aaa	gga	gag	ggt	cac	aaa	gac	act	450
Asn	Ser	Lys	Gly	Glu 145	Gly	His	Lys	Asp	Thr 150	
gaa	aca	gaa	tca	gca	gtg	gca	aaa	tct	ctg	480
Glu	Thr	Glu	Ser	Ala 155	Val	Ala	Lys	Ser	Leu 160	
gaa	aag	ctg	gga	ggt	cct	tgt	cct	cct	cac	510
Glu	Lys	Leu	Gly	Gly 165	Pro	Cys	Pro	Pro	His 170	
ttc	ctt	aag	gag	tta	aaa	cca	att	cgc	tgt	540
Phe	Leu	Lys	Glu	Leu 175	Lys	Pro	Ile	Arg	Cys 180	
gct	caa	ggg	ctt	cct	gcc	atc	ttt	gag	tac	570
Ala	Gln	Gly	Leu	Pro 185	Ala	Ile	Phe	Glu	Tyr 190	
aca	gtg	gtt	gga	gag	cct	gcc	cct	act	gtt	600
Thr	Val	Val	Gly	Glu 195	Pro	Ala	Pro	Thr	Val 200	
aca	tgg	ttc	aaa	gaa	aac	aag	cag	ctt	tgc	630
Thr	Trp	Phe	Lys	Glu 205	Asn	Lys	Gln	Leu	Cys 210	
acc	agt	gtt	tat	tac	act	atc	att	cat	aac	660
Thr	Ser	Val	Tyr	Tyr 215	Thr	Ile	Ile	His	Asn 220	
cct	aat	ggc	tct	gga	act	ttc	att	gtc	aat	690
Pro	Asn	Gly	Ser	Gly 225	Thr	Phe	Ile	Val	Asn 230	
gac	cct	cag	agg	gaa	gac	agt	ggc	ctc	tat	720
Asp	Pro	Gln	Arg	Glu 235	Asp	Ser	Gly	Leu	Tyr 240	
atc	tgt	aaa	gca	gag	aat	atg	ttg	ggt	gag	750
Ile	Cys	Lys	Ala	Glu 245	Asn	Met	Leu	Gly	Glu 250	
tcc	acc	tgt	gca	gca	gag	ctg	ctt	gtg	ctt	780
Ser	Thr	Cys	Ala	Ala 255	Glu	Leu	Leu	Val	Leu 260	
ctg	gaa	gac	aca	gac	atg	act	gat	acc	ccc	810
Leu	Glu	Asp	Thr	Asp 265	Met	Thr	Asp	Thr	Pro 270	
tgc	aaa	gca	aag	tcc	aca	cca	gag	gct	cct	840
Cys	Lys	Ala	Lys	Ser 275	Thr	Pro	Glu	Ala	Pro 280	
gag	gat	ttt	cca	cag	aca	ccc	tta	aag	ggt	870
Glu	Asp	Phe	Pro	Gln 285	Thr	Pro	Leu	Lys	Gly 290	
ccc	gca	gtt	gaa	gca	ctt	gac	tca	gag	cag	900
Pro	Ala	Val	Glu	Ala	Leu	Asp	Ser	Glu	Gln	

295					300					
gaa	att	gca	acg	ttt	gta	aaa	gac	acc	att	930
Glu	Ile	Ala	Thr	Phe	Val	Lys	Asp	Thr	Ile	
305					310					
ttg	aaa	gct	gct	tta	atc	aca	gaa	gaa	aac	960
Leu	Lys	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Glu	Glu	Asn	
315					320					
cag	caa	cta	tct	tat	gag	cat	att	gct	aaa	990
Gln	Gln	Leu	Ser	Tyr	Glu	His	Ile	Ala	Lys	
325					330					
gcc	aat	gaa	ttg	agc	agt	cag	ctt	cct	ttg	1020
Ala	Asn	Glu	Leu	Ser	Ser	Gln	Leu	Pro	Leu	
335					340					
gga	gct	cag	gaa	ttg	caa	tcc	att	ttg	gag	1050
Gly	Ala	Gln	Glu	Leu	Gln	Ser	Ile	Leu	Glu	
345					350					
caa	gac	aag	ctc	act	cct	gaa	agc	acc	agg	1080
Gln	Asp	Lys	Leu	Thr	Pro	Glu	Ser	Thr	Arg	
355					360					
gaa	ttt	ctt	tgc	atc	aat	ggc	agt	att	cac	1110
Glu	Phe	Leu	Cys	Ile	Asn	Gly	Ser	Ile	His	
365					370					
ttt	cag	cct	ctc	aag	gaa	cca	tct	ccc	aac	1140
Phe	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Pro	Ser	Pro	Asn	
375					380					
cta	cag	ctg	cag	att	gta	cag	tcc	cag	aaa	1170
Leu	Gln	Leu	Gln	Ile	Val	Gln	Ser	Gln	Lys	
385					390					
acc	ttc	tcc	aaa	gaa	ggc	att	cta	atg	cct	1200
Thr	Phe	Ser	Lys	Glu	Gly	Ile	Leu	Met	Pro	
395					400					
gaa	gag	cct	gag	aca	cag	gca	gtt	cta	tca	1230
Glu	Glu	Pro	Glu	Thr	Gln	Ala	Val	Leu	Ser	
405					410					
gat	acc	gag	aaa	atc	ttc	cca	agt	gcc	atg	1260
Asp	Thr	Glu	Lys	Ile	Phe	Pro	Ser	Ala	Met	
415					420					
tcc	ata	gaa	caa	att	aat	tca	tta	aca	gtt	1290
Ser	Ile	Glu	Gln	Ile	Asn	Ser	Leu	Thr	Val	
425					430					
gag	cct	ctg	aaa	act	tta	tta	gct	gaa	cct	1320
Glu	Pro	Leu	Lys	Thr	Leu	Leu	Ala	Glu	Pro	
435					440					
gaa	ggg	aat	tat	cca	cag	tct	tca	ata	gaa	1350
Glu	Gly	Asn	Tyr	Pro	Gln	Ser	Ser	Ile	Glu	
445					450					
cct	cca	atg	cat	tct	tat	cta	acc	tct	gtg	1380
Pro	Pro	Met	His	Ser	Tyr	Leu	Thr	Ser	Val	
455					460					

gct Ala	gag Glu	gaa Glu	gta Val	ctt Leu 465	tca Ser	cca Pro	aaa Lys	gaa Glu	aag Lys 470	1410
aca Thr	gta Val	tct Ser	gac Asp	acc Thr 475	aac Asn	aga Arg	gag Glu	caa Gln	aga Arg 480	1440
gtg Val	act Thr	ctt Leu	caa Gln	aag Lys 485	caa Gln	gag Glu	gca Ala	caa Gln	agt Ser 490	1470
gct Ala	ctc Leu	atc Ile	ttg Leu	agt Ser 495	cag Gln	agc Ser	tta Leu	gct Ala	gag Glu 500	1500
gga Gly	cac His	gtg Val	gag Glu	agt Ser 505	ctc Leu	cag Gln	agt Ser	cct Pro	gat Asp 510	1530
gtc Val	atg Met	atc Ile	tct Ser	cag Gln 515	gta Val	aac Asn	tat Tyr	gag Glu	ccc Pro 520	1560
cta Leu	gtc Val	cct Pro	tca Ser	gaa Glu 525	cac His	tca Ser	tgc Cys	aca Thr	gaa Glu 530	1590
gga Gly	ggg Gly	aaa Lys	att Ile	ttg Leu 535	ata Ile	gaa Glu	agt Ser	gca Ala	aat Asn 540	1620
cca Pro	ctg Leu	gaa Glu	aat Asn	gca Ala 545	ggg Gly	caa Gln	gat Asp	tct Ser	gcg Ala 550	1650
gtc Val	aga Arg	att Ile	gag Glu	gaa Glu 555	ggc Gly	aag Lys	tcc Ser	tta Leu	aga Arg 560	1680
ttt Phe	cca Pro	cta Leu	gca Ala	ctt Leu 565	gaa Glu	gaa Glu	aag Lys	cag Gln	gta Val 570	1710
ctg Leu	ctc Leu	aaa Lys	gaa Glu	gag Glu 575	cat His	tct Ser	gac Asp	aac Asn	gtg Val 580	1740
gtg Val	atg Met	ccc Pro	cca Pro	gac Asp 585	caa Gln	atc Ile	att Ile	gag Glu	tct Ser 590	1770
aaa Lys	aga Arg	gag Glu	ccc Pro	gtg Val 595	gca Ala	ata Ile	aag Lys	aaa Lys	gtg Val 600	1800
cag Gln	gag Glu	gta Val	cag Gln	gga Gly 605	agg Arg	gac Asp	ctt Leu	ctt Leu	tct Ser 610	1830
aag Lys	gaa Glu	agc Ser	ttg Leu	ctt Leu 615	tct Ser	ggg Gly	att Ile	cca Pro	gaa Glu 620	1860
gag	cag	aga	tta	aac	ctg	aaa	att	caa	atc	1890

Glu	Gln	Arg	Leu	Asn 625	Leu	Lys	Ile	Gln	Ile 630	
tgc	cgg	gct	ttg	caa	gca	gct	gtg	gcc	agc	1920
Cys	Arg	Ala	Leu	Gln 635	Ala	Ala	Val	Ala	Ser 640	
gag	cag	cca	ggt	ctt	ttc	tct	gag	tgg	cta	1950
Glu	Gln	Pro	Gly	Leu 645	Phe	Ser	Glu	Trp	Leu 650	
aga	aat	att	gaa	aag	gtg	gag	gtc	gag	gct	1980
Arg	Asn	Ile	Glu	Lys 655	Val	Glu	Val	Glu	Ala 660	
gta	aac	atc	acc	caa	gag	ccc	aga	cac	atc	2010
Val	Asn	Ile	Thr	Gln 665	Glu	Pro	Arg	His	Ile 670	
atg	tgc	atg	tac	ctt	gtt	act	tcg	gca	aag	2040
Met	Cys	Met	Tyr	Leu 675	Val	Thr	Ser	Ala	Lys 680	
tct	gta	aca	gaa	gaa	gta	acc	atc	att	att	2070
Ser	Val	Thr	Glu	Glu 685	Val	Thr	Ile	Ile	Ile 690	
gaa	gat	gtt	gat	cct	caa	atg	gct	aac	ctg	2100
Glu	Asp	Val	Asp	Pro 695	Gln	Met	Ala	Asn	Leu 700	
aaa	atg	gaa	ctt	agg	gat	gct	ttg	tgt	gct	2130
Lys	Met	Glu	Leu	Arg 705	Asp	Ala	Leu	Cys	Ala 710	
att	ata	tat	gag	gaa	ata	gac	atc	cta	aca	2160
Ile	Ile	Tyr	Glu	Glu 715	Ile	Asp	Ile	Leu	Thr 720	
gct	gag	ggt	cct	aga	att	cag	caa	gga	gcc	2190
Ala	Glu	Gly	Pro	Arg 725	Ile	Gln	Gln	Gly	Ala 730	
aaa	aca	agt	ttg	caa	gaa	gaa	atg	gat	tct	2220
Lys	Thr	Ser	Leu	Gln 735	Glu	Glu	Met	Asp	Ser 740	
ttt	tca	ggt	tca	cag	aag	gtt	gaa	ccc	att	2250
Phe	Ser	Gly	Ser	Gln 745	Lys	Val	Glu	Pro	Ile 750	
act	gaa	cca	gaa	gtt	gaa	tct	aaa	tat	ctg	2280
Thr	Glu	Pro	Glu	Val 755	Glu	Ser	Lys	Tyr	Leu 760	
atc	tca	cct	gaa	gag	gtc	agt	tat	ttt	aac	2310
Ile	Ser	Pro	Glu	Glu 765	Val	Ser	Tyr	Phe	Asn 770	
gtg	caa	agt	agg	gtt	aaa	tat	ttg	gat	gcc	2340
Val	Gln	Ser	Arg	Val 775	Lys	Tyr	Leu	Asp	Ala 780	

DE 10 2012 017 566 A1 2013.10.10

aca	cct	gtc	act	aaa	ggg	gtt	gct	tca	gct	2370
Thr	Pro	Val	Thr	Lys	Gly	Val	Ala	Ser	Ala	
				785					790	
gtt	gtc	tct	gac	gaa	aaa	caa	gat	gag	agt	2400
Val	Val	Ser	Asp	Glu	Lys	Gln	Asp	Glu	Ser	
				795					800	
ctg	aaa	cca	tca	gag	gaa	aaa	gag	gag	tct	2430
Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Glu	Lys	Glu	Glu	Ser	
				805					810	
tcc	tct	gaa	agt	ggc	act	gag	gag	gtt	gct	2470
Ser	Ser	Glu	Ser	Gly	Thr	Glu	Glu	Val	Ala	
				815					820	
aca	gta	aag	ata	cag	gaa	gct	gag	ggc	ggc	2500
Thr	Val	Lys	Ile	Gln	Glu	Ala	Glu	Gly	Gly	
				825					830	
ttc	atc	aaa	gag	gat	ggc	ccc	atg	ata	cat	2530
Phe	Ile	Lys	Glu	Asp	Gly	Pro	Met	Ile	His	
				835					840	
aca	cct	tta	gtg	gac	act	gtt	tct	gag	gaa	2550
Thr	Pro	Leu	Val	Asp	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	
				845					850	
ggc	gat	att	gta	cac	ctc	aca	aca	tcc	ata	2580
Gly	Asp	Ile	Val	His	Leu	Thr	Thr	Ser	Ile	
				855					860	
aca	aat	gct	aaa	gag	gtg	aat	tgg	tat	ttt	2610
Thr	Asn	Ala	Lys	Glu	Val	Asn	Trp	Tyr	Phe	
				865					870	
gag	aat	aaa	ctg	gtg	cct	tca	gat	gaa	aag	2640
Glu	Asn	Lys	Leu	Val	Pro	Ser	Asp	Glu	Lys	
				875					880	
ttc	aag	tgt	tta	caa	gat	caa	aat	aca	tat	2670
Phe	Lys	Cys	Leu	Gln	Asp	Gln	Asn	Thr	Tyr	
				885					890	
acg	cta	gtc	atc	gac	aaa	gta	aat	acc	gaa	2700
Thr	Leu	Val	Ile	Asp	Lys	Val	Asn	Thr	Glu	
				895					900	
gac	cat	caa	gga	gag	tat	gtc	tgt	gag	gcc	2730
Asp	His	Gln	Gly	Glu	Tyr	Val	Cys	Glu	Ala	
				905					910	
ttg	aat	gac	agc	gga	aaa	aca	gca	act	tca	2760
Leu	Asn	Asp	Ser	Gly	Lys	Thr	Ala	Thr	Ser	
				915					920	
gcc	aaa	ctc	act	gta	gta	aaa	aga			2784
Ala	Lys	Leu	Thr	Val	Val	Lys	Arg			
				925						

Patentansprüche

1. Feststellung einer Herzmuskelschädigung und Herzumbauprozessen (Remodelling) durch den Nachweis von herzspezifischen Titinsequenzen aus dem Titin-Exon-49-(N2B)-Bereich. **dadurch gekennzeichnet**, dass aus der Exon-49-(N2B)-Titinsequenz, bestehend aus 928 Aminosäuren oder Abschnitten davon, polyklonale oder monoklonale Antikörper hergestellt werden, die Titin-Exon 49 (N2B)-spezifisch sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass diese so hergestellten Antikörper zum quantitativen oder/und qualitativen Nachweis von in Körperflüssigkeiten vorhandenen Titin-Exon-49-(N2B)-Epitopen verwendet werden können.

3. Verfahren nach Anspruch 1

dadurch gekennzeichnet,

dass zum Nachweis von Titin-Exon 49-(N2B)-Proteinen in Körperflüssigkeiten antigenbasierte Nachweismethoden zur Anwendung kommen.

Beispielhaft etwa der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), der Western Blot, der Immunfluoreszenztest, der Nachweis der Exon-49-(N2B)-Proteine durch Bindung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit einem Fluoreszenzmikroskop, der Immunotest mit Streptavidin beschichtete Membranen und biotinylierten Anti-Titin-Exon-49-(N2B)-Antikörpern.

4. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass das Nachweisverfahren sich automatisieren lässt.

5. Verfahren nach Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass sich die Sensitivität und Spezifität des Nachweises von Titin-Exon-49-(N2B)-Peptiden durch Verwendung mehrerer unterschiedlicher Antikörper gegen verschiedene Epitope aus dem Titin-Exon-49-(N2B)-Bereich steigern lässt. Dies erlaubt den Nachweis geringster Mengen von Titin-Exon 49-(N2B)-Peptiden, die einen gesteigerten Umbau („remodelling“) am Herzen anzeigen. Es lassen sich somit mit dem Nachweis von Titin-Exon-49-(N2B)-Peptiden Umbauprozesse des Herzens erfassen, die aufgrund einer veränderten Herzbelastung entstehen und z. B. zu einer Herzhypertrophie führen.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

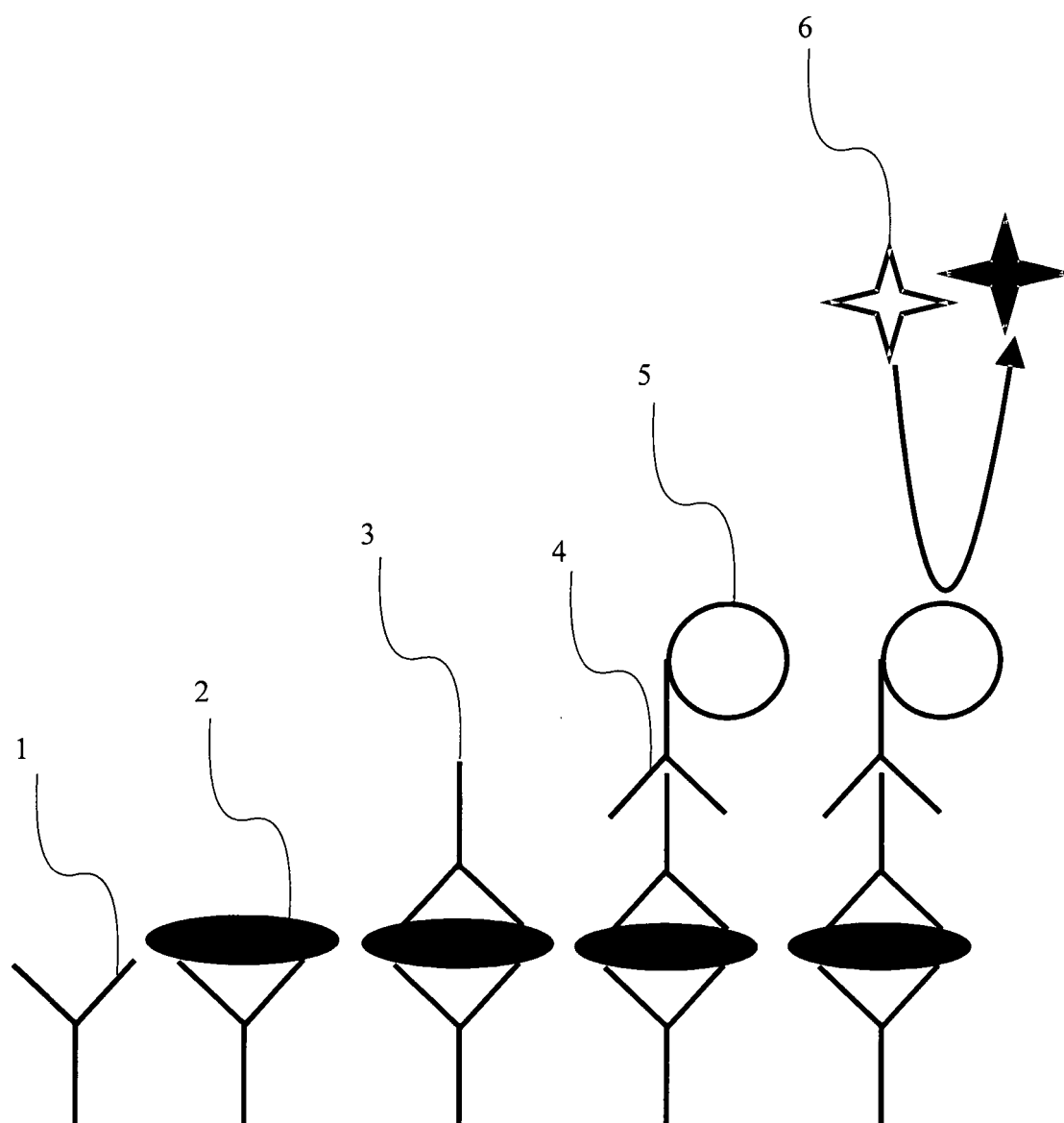


Fig. 1

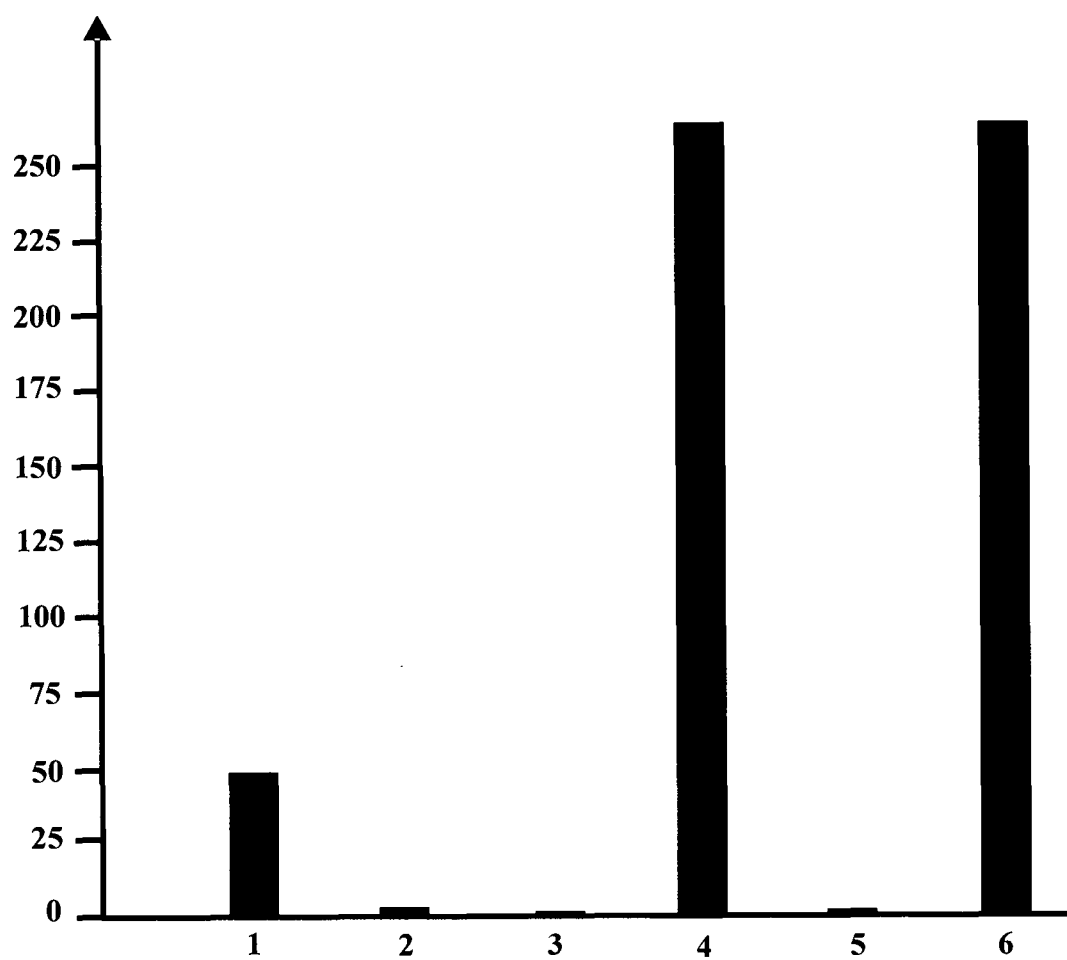


Fig. 2

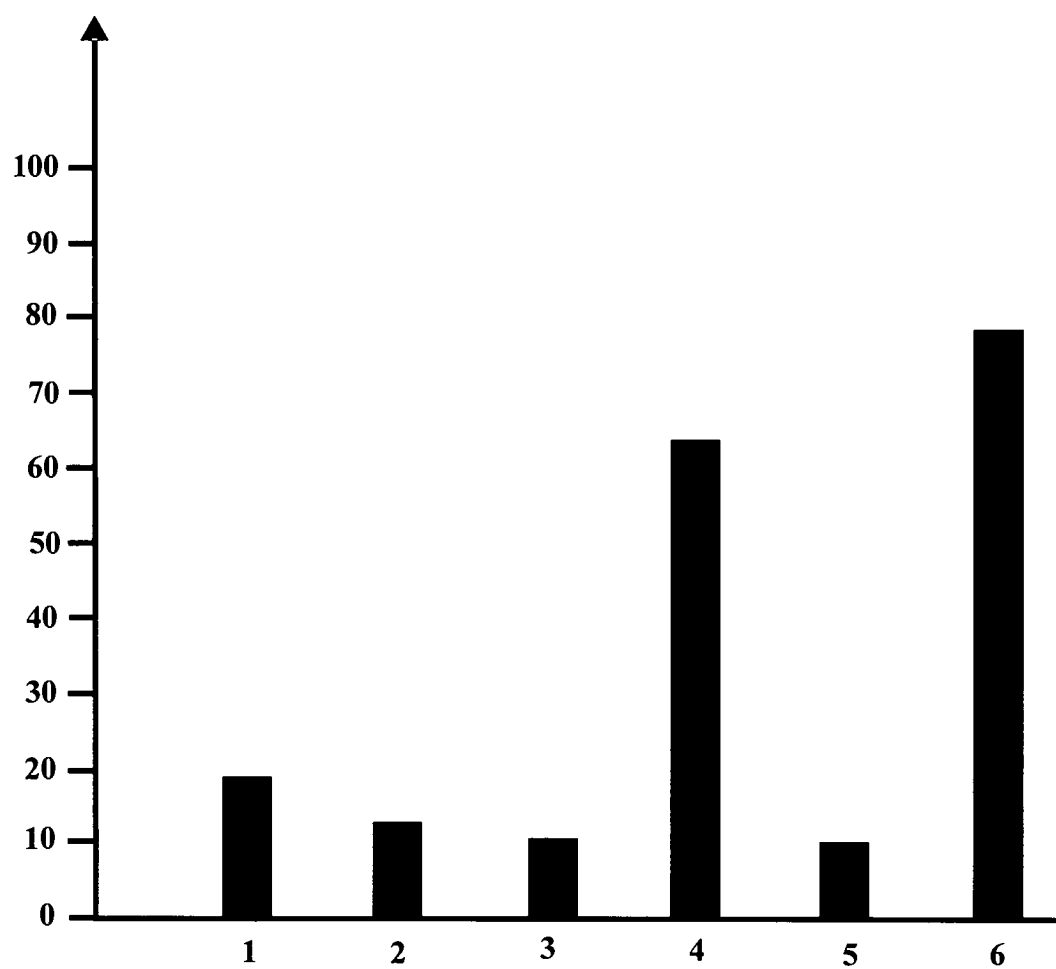


Fig. 3