

(12) **Patentschrift**

(21) Anmeldenummer: A 50189/2014
(22) Anmeldetag: 14.03.2014
(45) Veröffentlicht am: 15.09.2017

(51) Int. Cl.: **G01N 33/50** (2006.01)

(56) Entgegenhaltungen:
Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT, Holland AJ, Bahn S. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. Genomics. 2007 Dec;90(6):647-60. Epub 2007 Oct 22.
Lockstone HE, Harris LW, Swatton JE, Wayland MT et al. Gene expression profiling in the adult Down syndrome brain. Genomics 2007 Dec;90(6):647-60. PMID:17950572: NCBI GEO Profiles: DRD1 - Down syndrome: brain Annotation: DRD1, dopamine receptor D1 Organism: Homo sapiens Reporter: GPL96, 214652_at (ID_REF), GDS2941, 1812 (Gene ID), X58987 (nucleotide) DataSet type: Expression profiling by array, transformed count, 15 samples Unique identifier: 44591930. [from the internet on 12.11.2014 URL: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geoprofiles/44591930>>]
WO 0214547 A2
Das Bhowmik A, Dutta S, Sinha S, Chattopadhyay A, Mukhopadhyay K. Lack of association between down syndrome and polymorphisms in dopamine receptor D4 and serotonin transporter genes. Neurochem Res. 2008 Jul;33(7):1286-91. doi: 10.1007/s11064-007-9581-9. Epub 2008 Feb 13
Hurd YL, Suzuki M, Sedvall GC. D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain. J Chem Neuroanat. 2001 Jul;22(1-2):127-37.
Cadet JL, Jayanthi S, McCoy MT, Beauvais G, Cai NS. Dopamine D1 receptors, regulation of gene expression in the brain, and neurodegeneration. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2010 Nov;9(5):526-38.

(73) Patentinhaber:
Red Bull GmbH
5330 Fuschl am See (AT)

(74) Vertreter:
Sonn & Partner Patentanwälte
WIEN (AT)

(54) **Methode zur in vitro Diagnose des Grades an Geistesschwäche im Down-Syndrom**

(57) Offenbart ist ein Verfahren zur in vitro Diagnose des Grads der mentalen Behinderung im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom (DS) in Hirngewebeproben, dadurch gekennzeichnet, dass die vorliegende Menge an Dopaminrezeptor 1-Komplex (DR1-Komplex) bestimmt und mit der in einer Kontrollgewebeprobe vorliegenden Menge verglichen wird, die von einem Individuum erhalten wurde, das nicht an dem DS leidet, wobei eine reduzierte Menge an DR1-Komplex mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Diagnose und Therapie von Patienten, die am Down-Syndrom (DS) leiden.

[0002] Beim Down-Syndrom, das ebenfalls unter der Bezeichnung Trisomie 21 bekannt ist, handelt es sich um eine genetische Erkrankung, die durch das Vorhandensein einer vollständigen oder unvollständigen dritten Kopie des 21. Chromosoms hervorgerufen wird. Die Erkrankung ist typischerweise mit einer Verzögerung des körperlichen Wachstums, charakteristischen Gesichtszügen sowie einer schwachen bis mäßigen intellektuellen Behinderung assoziiert.

[0003] Die Identifikation des Down-Syndroms ist bereits im Verlauf der Schwangerschaft mittels pränataler Diagnostik und anschließender diagnostischer Tests oder nach der Geburt anhand von direkten Beobachtungen und genetischen Tests möglich.

[0004] Im fetalen und adulten Gehirn von DS-Patienten kommt es zu einer Reihe von Proteinveränderungen [1], jedoch weisen diese Erkenntnisse entweder nicht den Weg zu neuen experimentellen Behandlungen oder sie wurden lediglich in den Gehirnen erwachsener DS-Patienten beobachtet. In den Gehirnen adulter DS-Patienten kommt es ab dem 40. Lebensjahr unweigerlich zu pathologischen Veränderungen, die der Alzheimer-Krankheit recht ähnlich sind. Daher ist es nicht möglich, Veränderungen hinsichtlich der Proteinexpression in einem Erwachsenen eindeutig dem Down-Syndrom zuzuordnen [2].

[0005] Granholm et al. stellten die Hypothese auf, dass das cholinerge System an Defiziten des Gehirns beteiligt sei, die in Tiermodellen des DS beobachtet wurden. Des Weiteren wurden jeweils von Wang et al. eine wahrscheinliche Beteiligung des Glutamatrezeptors sowie von Scott- McKean und Costa, Altafaj et al., Siddiqui et al. und Rueda et al. eine wahrscheinliche Beteiligung des NMDA-Rezeptorsystems angedeutet. Der Nachweis des Wirkens von GABAergen Mechanismen in der Pathologie des DS stammte von Best et al., Kleschevnikov et al., Martinez-Cue et al. und Braudeau et al., denen es gelang zu zeigen, dass kognitive Defizite in einem Tiermodell des DS durch das spezifische Targeting der Alpha-5-Untereinheit des GABA-A-Rezeptors durch einen selektiven inversen Agonisten behoben werden konnten [8, 9].

[0006] Es hat sich mittlerweile erwiesen, dass durch gezielte Förderung und geeignete Betreuung eine Verbesserung der Lebensqualität von DS-Patienten möglich ist. Einige Kinder, die am Down-Syndrom leiden, werden in herkömmlichen Schulklassen unterrichtet, während andere wiederum einer spezielleren Förderung bedürfen. Einige DS-Patienten schließen erfolgreich die Sekundarschule (High School) ab, und einzelne absolvieren sogar weiterführende Ausbildungsgänge. Im Erwachsenenalter gehen in den Vereinigten Staaten etwa 20% in bestimmter Form einer bezahlten Arbeit nach, wobei viele von ihnen eine betreute Arbeitsumgebung benötigen. Unterstützung in finanziellen und rechtlichen Belangen ist in vielen Fällen erforderlich. In den Industrieländern sowie unter Voraussetzung einer angemessenen Gesundheitsversorgung liegt die durchschnittliche Lebenserwartung für DS-Patienten zwischen etwa 50 und 60 Jahren.

[0007] Der durchschnittliche IQ eines jungen, am Down-Syndrom erkrankten Erwachsenen liegt bei 50, entspricht also etwa dem mentalen Reifegrad eines 8- bis 9-jährigen Kindes, allerdings gibt es hier große Unterschiede. Bei den meisten am Down-Syndrom erkrankten Personen findet sich eine leichte (IQ: 50-70) oder mäßige (IQ: 35-50) intellektuelle Behinderung, in einigen Fällen ist diese jedoch auch sehr ausgeprägt (IQ: 20-35). Personen mit Mosaik-Trisomie 21 verfügen typischerweise über einen um 10 bis 30 Punkte höheren IQ. Mit zunehmendem Alter nimmt die Leistungsfähigkeit von DS-Patienten im Vergleich zu ihren Altersgenossen immer stärker ab. Manche können ab einem Alter von 30 Jahren etwa ihre Fähigkeit zu sprechen verlieren. Dieses Syndrom ist für etwa ein Drittel der Fälle von intellektueller Behinderung verantwortlich.

[0008] Im Allgemeinen ist das Sprachverständnis von DS-Patienten besser ausgeprägt als ihre Fähigkeit, selbst zu sprechen. Zwischen 10 und 45 Prozent der DS-Patienten stottern entweder oder sprechen sehr schnell und undeutlich, weshalb es schwer ist, sie zu verstehen. Typischer-

weise sind ihre sozialen Fähigkeiten verhältnismäßig gut ausgebildet. Verhaltensprobleme stellen bei dieser Erkrankung längst kein so großes Problem dar, wie dies bei anderen mit intellektueller Behinderung assoziierten Syndromen oftmals der Fall ist. Bei Kindern mit dem Down-Syndrom kommt es bei beinahe 30% zu psychischen Erkrankungen, wobei 5 bis 10% an Autismus leiden. Menschen mit dem Down-Syndrom verfügen über ein sehr breites emotionales Spektrum. Zwar sind sie im Allgemeinen fröhlich, jedoch können sich im frühen Erwachsenenalter Symptome von Depressionen und Angstzuständen entwickeln.

[0009] Bei Kindern und Erwachsenen mit dem Down-Syndrom besteht ein erhöhtes Risiko für epileptische Anfälle, die bei 5 bis 10% der Kinder sowie bei bis zu 50% der Erwachsenen auftreten. Darin eingeschlossen ist auch ein erhöhtes Risiko für eine spezielle Art von Anfällen, die als infantile Spasmen bezeichnet werden. Bei vielen (15%) der DS-Patienten, die 40 Jahre oder älter werden, entwickelt sich eine Demenz vom Typ der Alzheimer-Krankheit. Bei den DS-Patienten, die 60 Jahre oder älter werden, tritt diese Krankheit in 50 bis 70% auf.

[0010] Es sind Verfahren zur Verbesserung der kognitiven Entwicklung von DS-Patienten verfügbar. So können z. B. Hörhilfen oder andere akustische Verstärkungsrichtungen bei den Patienten mit geschädigtem Gehör zweckmäßig für ein Erlernen der Sprache sein. Auch eine Sprachtherapie kann dienlich sein und es wird empfohlen, etwa im Alter von 9 Monaten mit einer solchen Therapie zu beginnen. Da die DS-Patienten typischerweise über eine gute Hand-Augen-Koordination verfügen, kann unter Umständen auch das Erlernen einer Zeichen- und Gebärdensprache möglich sein. Augmentative und alternative Kommunikationsmethoden, wie z. B. Deuten und Zeigen, Körpersprache, Objekte oder Bilder, werden oftmals zur Unterstützung der Kommunikation verwendet, auch wenn hierfür wenig konkrete Nachweise vorliegen. Verhaltensproblemen und psychischen Erkrankungen wird typischerweise mit therapeutischen und medikamentösen Ansätzen begegnet.

[0011] Auch Förderprogramme vor dem Eintritt ins Schulalter können zweckmäßig sein. Schulkinder, die an dem Down-Syndrom leiden, können von einer integrierten Ausbildung profitieren (d. h. Klassen mit Schülern gleichen Alters aber unterschiedlicher Fähigkeiten), sofern der Lehrplan in geeigneter Weise angepasst wird. Dies ist jedoch bei weitem nicht eindeutig erwiesen. In den Vereinigten Staaten fordert der Individuals with Disabilities Education Act von 1975, dass Schüler mit Down-Syndrom im Allgemeinen an öffentlichen Schulen zugelassen werden.

[0012] Dem entsprechend gibt es viele unterschiedliche Grade des Down-Syndroms, insbesondere im Hinblick auf die mentalen oder intellektuellen Fähigkeiten. Es gibt zwar Trainingsmethoden zur Förderung dieser Fähigkeiten, jedoch kann ein beträchtlicher Teil der mit dem Down-Syndrom assoziierten intellektuellen Behinderung allem Anschein nach nicht durch die im Stand der Technik vorgeschlagenen herkömmlichen Verfahren verbessert werden.

[0013] Es ist Gegenstand der vorliegenden Erfindung, ein diagnostisches und explanatives Hilfsmittel zur Verfügung zu stellen, mit dem eine verbesserte Diagnose des Risikos einer mentalen oder intellektuellen Behinderung in Patienten mit dem Down-Syndrom möglich ist, und zwar sowohl im Rahmen wissenschaftlicher Erforschung von Probenmaterial aus dem Hirngewebe als auch in der in vivo Diagnostik. Es ist ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung, auf Grundlage solcher explanativer Hilfsmittel neue Strategien zur individuellen Behandlung von DS-Patienten zur Verfügung zu stellen, um deren mentale und intellektuelle Fähigkeiten zu verbessern.

[0014] Folglich stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur in vitro Diagnose des Grads der mentalen Behinderung im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom (DS) in Hirngewebe-proben zur Verfügung, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die vorliegende Menge an Dopaminrezeptor 1-Komplex (DR1-Komplex) bestimmt und mit der in einer Kontrollgewebeprobe vorliegenden Menge verglichen wird, die von einem Individuum erhalten wurde, das nicht an DS leidet, wobei eine reduzierte Menge an DR1-Komplex mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert.

[0015] Die wesentlichen Veränderungen der Rezeptoren im Gehirn von DS-Patienten erfordern

unter Umständen experimentelle Behandlungen mit den jederzeit verfügbaren entsprechenden Rezeptoragonisten oder -antagonisten. Daten bezüglich der Rezeptorexpression sind derzeit jedoch nur in begrenzter Anzahl verfügbar. Florez et al. führten eine autoradiographische Studie an muskarinischen Acetylcholinrezeptoren im Mittelhirn zweier am DS leidender Kleinkinder durch und schlugen ein cholinerges Defizit vor [3]. Im Gegensatz hierzu schlossen die von Bar-Peled et al. vorgelegten Ergebnisse kein muskarinerges Defizit in fetalen DS-Gehirnen ein. Bar-Peled et al. führten eine autoradiographische Studie bezüglich der Dichte des 5-Hydroxytryptaminrezeptors 1A (5-HT_{1A}) durch und stellten eine erhöhte Rezeptordichte in zwei fetalen DS-Gehirnen fest [4]. Deutsch et al. beschrieben ein mögliches Nikotinrezeptordefizit, das mit einer reduzierten Aktivität des nikotinergen Acetylcholinrezeptors $\alpha 7$ in fetalen DS-Gehirnen in Verbindung steht, die mit der Gegenwart von A-beta-Peptid 1-42 assoziiert ist, das von dem amyloiden Vorläuferprotein abgeleitet ist, das durch ein auf dem 21. Chromosom lokalisiertes Gen kodiert wird [5]. Abgesehen von den vorstehend genannten an Patienten durchgeführten Studien liegen keinerlei Beweise für eine Beteiligung von zentralen Rezeptoren an den beim DS beobachteten Defiziten des Gehirns vor. In zwei Fachartikeln wurde allerdings auf der Grundlage von aus Tiermodellen des DS erhaltenen Ergebnissen die Anwendung der Modifikation von Rezeptoren als eine mögliche experimentelle Therapie vorgeschlagen [6, 7].

[0016] Basierend auf den derzeitigen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Pathobiologie von Rezeptoren in Tiermodellen und im Menschen wurden daher im Rahmen der vorliegenden Erfindung die bedeutendsten Rezeptorsysteme in fetalen DS-Gehirnen bewertet. Es war möglich, Veränderungen auf der Ebene der Zellrezeptoren anstelle der Ebene der Rezeptoruntereinheiten zu zeigen, da die Assemblierung von Rezeptoren zur Bildung von Rezeptorkomplexen zur Ausführung von Gehirnfunktionen führt. Es wurde ein gelbasierter proteomischer Ansatz verwendet, um die Rezeptorkomplexe der Klassen von NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren, nikotinergen Acetylcholinrezeptoren und Dopaminrezeptoren zu quantifizieren. Der den Dopaminrezeptor 1 enthaltende Komplex wurde mittels Massenspektrometrie identifiziert und es wurden abweichende Mengen an den DR1 enthaltenden Komplexen sowohl in weiblichen als auch in männlichen DS-Gehirnen beobachtet.

[0017] In der Tat wurde ein DR1-Defizit in fetalen DS-Gehirnen festgestellt, das die Grundlage sowie die Erfordernis für eine experimentelle Behandlung mit einem aus der Reihe der verfügbaren und hinreichend etablierten spezifischen Dopaminrezeptoragonisten darstellen kann.

[0018] In früheren Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Untereinheiten von Hirnrezeptoren wurde bereits die Bedeutung dieser signalgebenden Verbindungen bezüglich des Down-Syndroms gezeigt. Es lagen jedoch im Stand der Technik keine Beweise im Hinblick auf Veränderungen der Rezeptorkomplexe vor. Unter Anwendung eines nativen, gelbasierten, immunchemischen Verfahrens zur Bestimmung der vorliegenden Mengen der hauptsächlichen Hirnrezeptorkomplexe in den Gehirnen von DS-Patienten wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung gezeigt, dass die Veränderungen der Rezeptorkomplexspiegel ein Rezeptorkomplexmuster in den kortikalen Hirnregionen von DS-Patienten und den entsprechenden Kontrollpersonen ergeben, das indikativ für das Ausmaß des Gehirndefizits ist, insbesondere für das Ausmaß einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, und das mit einem schwächeren oder stärkeren Ausmaß des DS in Verbindung gebracht werden kann. Diese Gehirndefekte sind, so wie viele andere Faktoren, in unterschiedlichen DS-Patienten äußerst unterschiedlich ausgeprägt. Bisher stehen jedoch noch keine Mittel zur Bestimmung derartiger Unterschiede zur Verfügung. Mit der vorliegenden Erfindung ist es nunmehr nicht nur möglich, den Grad der Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen in Hirngewebeproben zu klassifizieren (basierend auf der vorliegenden Menge an DR1-Komplexen), sondern auch, ein in vivo Verfahren zur bildgebenden Darstellung solcher möglichen beeinträchtigten kognitiven Funktionen zur Verfügung zu stellen (basierend auf der bildgebenden Darstellung dieser Komplexe in den Patienten, insbesondere in deren Gehirn oder in spezifischen Hirnregionen) und darüber hinaus die betreffenden Funktionen sogar zu verbessern, und zwar durch eine Behandlung, die die DR1-Rezeptorkomplexe oder deren Formation oder Funktion induziert, unterstützt oder aktiviert.

[0019] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung gewonnenen Erkenntnisse offenbaren

sogar ein Muster von gestörten Rezeptorkomplexspiegeln (insbesondere in weiblichen DS-Patienten), das indikativ für eine Verschlechterung der konzentrierten Aktion dieser Rezeptoren sein kann, die ihrerseits wiederum indikativ für kognitive Defizite oder die unterschiedlichen Grade von kognitiven Defekten sind, die in Patienten mit DS zu beobachten sind. Es muss betont werden, dass es sich bei den funktionellen Einheiten um die Rezeptorkomplexe selbst und nicht um deren einzelne Untereinheiten handelt (siehe auch Schwenk et al., Neuron 74 (2012), 621-633). Gemäß der vorliegenden Erfindung wurden Rezeptordefizite aufgezeigt, die ebenfalls relevant für das Design von experimentellen Therapien sind, und in der Tat ist eine spezifische pharmakologische Modulation der vorstehend genannten Rezeptoren im Rahmen des pharmazeutischen Repertoires und kann durch die vorliegende Erfindung im Hinblick auf das Endresultat der vorliegenden Erfindung ebenfalls zur Verfügung gestellt werden.

[0020] Mit der vorliegenden Erfindung wird ein objektives biochemisches Mittel zur Diagnose von Hirndefiziten, insbesondere von einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, zur Verfügung gestellt, und zwar sowohl in post mortem erhaltenen Proben aus DS- Gehirnen als auch in in vivo durchgeführten bildgebenden Verfahren für DR1-Rezeptorkomplexe. Dies ist äußerst vorteilhaft gegenüber der derzeit verfügbaren histologischen Diagnose des DS, bei der eine auf Erfahrungen und Kenntnissen basierende und damit nach wie vor auch subjektive Analyse durch Histologen erforderlich ist.

[0021] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfolgte demnach erstmalig eine systematische Bestimmung der vorliegenden Mengen an kortikalen Rezeptorkomplexen im humanen, fetalen DS-Gehirn. Frontale Kortizes wurden sowohl von DS-Patienten (in der 19. bis 22. Gestationswoche) als auch von gesunden Kontrollpersonen erhalten. Die Membranproteine wurden extrahiert, auf blauen nativen Gels untersucht und mit spezifischen gegen die Hirnrezeptoren gerichteten Antikörpern immunoblottet. In den Kortizes von männlichen und weiblichen DS-Patienten waren die vorliegenden Mengen an den DR1 enthaltenden Komplexen deutlich reduziert. Bei den weiblichen DS- Patienten wurde eine deutliche Reduktion der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren $\alpha 4$ und $\alpha 7$, des NMDA-Rezeptors NR1 sowie der Rezeptorkomplexe, die AMPA-Rezeptor-GluR1 und GluR3 enthalten, festgestellt. Die vorliegenden Mengen an weiteren Hirnrezeptorkomplexen (5-Hydroxytryptamin 1A, die GluR2- und GluR4-Rezeptoren enthaltenden Komplexe) waren innerhalb der Gruppen der weiblichen DS- Patienten vergleichbar. Die Spiegel der GluR2 und GluR3 enthaltenden Komplexe waren bei den männlichen DS-Patienten in signifikanter Weise erhöht. In Kombination mit der bei den weiblichen DS-Patienten beobachteten signifikanten Reduktion von $\alpha 7$ enthaltenden Komplexen können die reduzierten Spiegel an DR1-Komplexen bei beiden Geschlechtern eine Erklärung für die Hirndefizite sowie die Beeinträchtigung der Kognition liefern, die beim DS zu beobachten sind.

[0022] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist es daher möglich, die vorliegende Menge an DR1-Komplex in (historischen oder anderweitig bereitgestellten) Gewebeproben aus DS-Gehirnen zu analysieren und mit dem Grad des DS zu korrelieren, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht des Weiteren eine Charakterisierung von unterschiedlichen Graden des DS.

[0023] Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann auf jede beliebige verfügbare Hirngewebeprobe angewandt werden. Es ist bevorzugt, dass die Zellen in den Proben homogenisiert sind und Membranfraktionen der Zellen bereitgestellt werden, um die in der Probe vorliegende Menge an DR1-Komplex zu bestimmen.

[0024] Es ist bevorzugt, dass die Bestimmung der vorliegenden Menge an DR1-Komplex unter Verwendung von Antikörpern durchgeführt wird, die spezifisch für den DR1-Komplex sind.

[0025] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der vorliegenden Menge an DR1-Komplex unter Anwendung von Immunpräzipitation und/oder Massenspektroskopie.

[0026] Der Unterschied bezüglich der vorliegenden Menge an DR1-Komplex ist zwischen den verschiedenen Graden des DS von statistischer Signifikanz. Üblicherweise liegen jedoch größe-

re Unterschiede vor. Es ist daher bevorzugt, dass die reduzierte Menge an DR1-Komplex im Vergleich zu der Kontrollgewebeprobe um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 40%, insbesondere bevorzugt um mindestens 50% reduziert ist.

[0027] Für die Proben von männlichen Gehirnen stellte sich heraus, dass der DR1-Komplex den einzigen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den DS-Proben und den nicht-DS Kontrollproben darstellte. In den Proben aus weiblichen Gehirnen erwiesen sich auch andere Rezeptorkomplexe als relevant. Dem entsprechend wird in einer bevorzugten Ausführungsform des vorliegenden Verfahrens zusätzlich zu der vorliegenden Menge an DR-Komplex ebenfalls die vorliegende Menge an mindestens einem aus den nikotinergen Acetylcholinrezeptoren $\alpha 4$ und $\alpha 7$, dem NMDA-Rezeptor NR1 sowie den Rezeptorkomplexen, die AMPA-Rezeptor-GluR1 und -GluR3 enthalten, bestimmt und mit der in einer von einem Individuum ohne DS erhaltenen Kontrollgewebeprobe vorliegenden Menge an einem oder mehreren Rezeptorkomplexen verglichen, wobei eine reduzierte Menge an mindestens einem oder mehreren Rezeptorkomplexen mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert, sofern die Proben aus weiblichen Gehirnen erhalten wurden.

[0028] Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung des Weiteren ein bildgebendes Verfahren zur in vivo Diagnose des Grads der mentalen Behinderung bei Patienten mit dem Down-Syndrom (DS), wobei ein markiertes Dopaminrezeptor-Bindungsagens, bevorzugt ein radioaktiv markierter DR1-Agonist oder ein an eine Markierungssubstanz gekoppelter DR1-Agonist, an einen DS-Patienten verabreicht wird und im Anschluss die Distribution des Agens im Körper des Patienten analysiert wird, indem die an das Agens gekoppelte Markierungssubstanz abgebildet wird, wobei die Bindung des Agens an den DR1-Komplex anhand der Abbildung des markierten Dopaminrezeptor-Bindungsagens visualisiert wird und wobei eine reduzierte Menge des an den DR1-Komplex bindenden Agens mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert.

[0029] Geeignete bildgebende Verfahren schließen die Positronenemissionstomographie (PET) oder die Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT = Single Photon Emission Computed Tomography) ein.

[0030] Nach dem gleichen Grundprinzip handelt es sich bei der Messung der quantitativen Menge an DR1-Komplex in vivo um ein wichtiges Hilfsmittel zur Einschätzung des Grads des DS, insbesondere im Hinblick auf eine Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, das des Weiteren eine Indikation für mögliche therapeutische Strategien bietet, d. h. für die Korrektur der DR1-Komplex-Defizite durch Agenzien, die an den DR1-Komplex binden (und so die DR1-Präsenz stimulieren), insbesondere durch DR1-Agonisten, um diesen Defiziten zumindest bis zu einem gewissen Grad entgegenzuwirken.

[0031] Das bildgebende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann auf die gleiche Weise eingesetzt werden wie andere PET- oder SPECT-Verfahren. Es ist jedoch bevorzugt, die Distribution des Agens im Gehirn oder in spezifischen Hirnregionen zu analysieren.

[0032] Auch in diesem in vivo Verfahren ist der mengenmäßige Unterschied der vorliegenden Mengen an DR1-Komplex von statistischer Signifikanz zwischen den unterschiedlichen Graden von DS (und nicht-DS). Es ist daher im Rahmen des erfindungsgemäßen bildgebenden Verfahrens ebenfalls bevorzugt, dass die reduzierte Menge an DR1-Komplex im Vergleich zu der Kontrollperson, die nicht an DS leidet, um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 40%, insbesondere bevorzugt um mindestens 50% reduziert ist.

[0033] Die vorliegende Erfindung betrifft des Weiteren ein Agens, das an den DR1-Komplex bindet, zur Verwendung in dem bildgebenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung sowie ebenfalls bei der Behandlung der mentalen Behinderungen von DS-Patienten.

[0034] Bevorzugte Agenzien sind DR1-Agonisten, bevorzugt Derivate von Dihydropyridin, insbesondere A-86929, Dihydropyridin, Dinapsolin, Dinonylin und Doxantrilin; Derivate von Benzazepin, insbesondere SKF-81297, SKF-82958, SKF-38393, Fenoldopam und 6-Br-APB; oder A-

[0035] 68930, A-77636, CY-208,243, SKF-89145, SKF-89626, 7,8-Dihydroxy-5-phenyl-octahydrobenzo[h]isochinolin, Cabergolin und Pergolid. Die Verwendung von DR1-Antagonisten ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls möglich, wie z. B. von Derivaten von Benzazepin, insbesondere SCH-23,390, SKF-83,959 oder Ecopipam (SCH-39,166).

[0036] Zur Verwendung in dem erfindungsgemäßen bildgebenden Verfahren werden diese Substanzen in geeigneter Weise markiert, z. B. mit einer radioaktiven Markierung.

[0037] Der DR1 ist ein Protein, das beim Menschen durch das DRD1-Gen kodiert wird. Dieses Gen kodiert für den D₁-Subtyp des Dopaminrezeptors. Bei dem D₁-Subtyp handelt es sich um den im zentralen Nervensystem am häufigsten vorkommenden Dopaminrezeptor. Dieser an das G-Protein gekoppelte Rezeptor stimuliert die Adenylatzyklase und bewirkt indirekt die Aktivierung von zyklischen AMP-abhängigen Proteinkinasen. Der DR1 reguliert das neuronale Wachstum und die neuronale Entwicklung, vermittelt eine Reihe von behavioralen Reaktionen und moduliert durch den Dopaminrezeptor D₂ vermittelte Ereignisse. Alternierende Transkriptionsinitiationsstellen führen zu zwei Transkriptvarianten dieses Gens. Das DRD1-Gen exprimiert in erster Linie im Caudatus-Putamen im Menschen sowie in Caudatus-Putamen, Nucleus accumbens und im olfaktorischen Tuberkel in Mäusen. Hier sind Genexpressionsmuster aus den Allenschen Hirnatlantanten in Mäusen und Menschen zu finden.

[0038] Es existieren eine Reihe von Liganden, die selektiv für den DR1 sind. Bisher basieren die meisten der bekannten Liganden auf Dihydropyridin oder dem prototypischen partiellen Benzazepinagonisten SKF-38393 (ein Derivat ist der prototypische Antagonist SCH-23390). Keiner der bekannten Liganden ist selektiv für den D₁- vs. den D₅-Rezeptor, jedoch verfügen die Benzazepine im Allgemeinen über eine höhere Selektivität für den D₁- und D₅-Rezeptor vs. die Familie der D₂-ähnlichen Rezeptoren. Einige der Benzazepine weisen eine hohe intrinsische Aktivität auf, andere dagegen nicht.

[0039] Gemäß der vorliegenden Erfindung bevorzugte selektive DR1-Agonisten sind Derivate von Dihydropyridin, insbesondere A-86929, Dihydropyridin, Dinapsolin, Dinoxylin und Doxanthrin; Derivate von Benzazepin, insbesondere SKF-81297, SKF-82958, SKF-38393, Fenoldopam und 6-Br-APB; oder A-68930, A-77636, CY-208,243, SKF-89145, SKF-89626, 7,8-Dihydroxy-5-phenyl-octahydrobenzo[h]isochinolin, Cabergolin und Pergolid. Die Verwendung von DR1-Antagonisten ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung ebenfalls möglich, wie z. B. Derivaten von Benzazepin, insbesondere SCH-23,390, SKF-83,959 oder Ecopipam (SCH-39,166).

[0040] Bei der Positronenemissionstomographie (PET) handelt es sich um eine tomographische, nukleare Bildgebungstechnik, in der radioaktive Markierungsmoleküle (Tracer) verwendet werden, die Positronen emittieren. Trifft ein Positron auf ein Elektron, so annihilieren sich diese gegenseitig, wobei Energie in Form von Gammastrahlen freigesetzt wird, die dann durch den PET-Scanner detektiert werden. Aufgrund der Verwendung von natürlichen Substanzen, die vom Körper als Markierungsmoleküle verwendet werden, stellt die PET nicht nur Informationen über Strukturen im Körper, sondern ebenfalls über die physiologischen Funktionen des Körpers oder bestimmter Körperregionen zur Verfügung. Des Weiteren ist die Auswahl eines Markierungs- oder Tracer-Moleküls abhängig davon, welche Region des Körpers gescannt werden soll. Im Allgemeinen wird eine Markierung verwendet, die sich in der jeweils relevanten Region anreichert oder die von einer bestimmten Gewebeart selektiv aufgenommen wird, z. B. von Gehirnzellen. Das Scanning besteht entweder aus einer dynamischen Serie von Bildern oder aus einem statischen Bild, die bzw. das im Anschluss an ein Zeitintervall erhalten wird, während dessen das radioaktive Markierungsmolekül in den jeweils relevanten biochemischen Prozess eintritt. Der Scanner detektiert die räumliche und zeitliche Verteilung der Markierungsmoleküle. Die PET ist ebenfalls ein quantitatives Bildgebungsverfahren, das die Messung von regionalen Konzentrationen des radioaktiven Markierungsmoleküls gestattet. Üblicherweise in PET-Tracern verwendete Radionukleotide sind ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, ¹³N oder ⁷⁶Br.

[0041] Des Weiteren werden in unterschiedlichen nicht invasiven in vivo Untersuchungen in Kombination mit PET häufig Tracer verwendet, die mit kurzlebigen Positronen emittierenden Radionukleotiden (z. B. mit ¹¹C, t_{1/2} = 20,3 min) markiert sind. Aufgrund der Radioaktivität, der

kurzen Halbwertszeiten sowie der submikromolaren Mengen der markierten Substanzen sind zur Herstellung dieser Tracer außergewöhnliche Syntheseverfahren erforderlich. Ein wichtiger Bestandteil bei der Ausgestaltung dieser Verfahren ist die Entwicklung und Handhabung von neuen mit ^{11}C und ^{18}F markierten Vorläufern. Dies ist nicht nur für die Markierung neuer Arten an Verbindungen von Bedeutung, sondern auch zur Verbesserung der Möglichkeit zur Markierung einer gegebenen Verbindung an unterschiedlichen Positionen.

[0042] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werde markierte, an den DR1 bindende Agenzien eingesetzt, die in den hierin offenbarten Detektionsverfahren anzuwenden sind. Bevorzugte markierte Agenzien sind radioaktiv markierte Agenzien oder radioaktive Pharmazeutika, insbesondere radioaktiv markierte DR1-Agonisten. So wie hierin verwendet bezieht sich der Begriff "radioaktives Pharmazeutikum" oder auch "Radiopharmazeutikum" auf eine Verbindung oder ein Material, die bzw. das zur Verabreichung an den Menschen geeignet ist (und in dem bildgebenden Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann) und an die bzw. das ein oder mehrere radioaktive Atome gebunden sind, die Photonen emittieren, die außerhalb des Körpers detektiert werden können, und zwar mithilfe von Vorrichtungen wie z. B. Positronenemissionstomographie (PET) oder Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (SPECT)-Kameras, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

[0043] Werden Verbindungen mit ^{11}C markiert, so ist es üblicherweise wichtig, die spezifische Radioaktivität zu maximieren. Um dies zu erreichen müssen sowohl die isotopische Verdünnung als auch die für die Synthese benötigte Zeit minimiert werden. Die isotopische Verdünnung von atmosphärischem Kohlendioxid ist unter Umständen erheblich, wenn [^{11}C]-Kohlendioxid in einer Markierungsreaktion verwendet wird. Aufgrund der geringen Reaktivität und atmosphärischen Konzentration von Kohlendioxid (0,1 ppm vs. $3,4 \times 10^4$ ppm für CO_2) wird dieses Problem abgeschwächt, wenn in Reaktionen [^{11}C]-Kohlendioxid verwendet wird.

[0044] Wird ein radioaktives Pharmazeutikum (PET-Tracer) an einen Patienten verabreicht, so werden Radionukleotide verwendet, die Positronen emittieren. Reichert sich der PET-Tracer in spezifischen Regionen an und wird dann ein Positron emittiert, so werden durch die Annihilation zwei Positronen mit hohem Energiegehalt erzeugt, die in exakt entgegengesetzte Richtungen emittiert werden und gemessen werden können. Aus den Koinzidenzen kann dann auf den Ort geschlossen werden, an dem das Ereignis stattgefunden hat.

[0045] Im Zusammenhang mit neurologischen Erkrankungen, wie z. B. Depressionen, Schizophrenie oder der Alzheimer-Krankheit, ist die Erzeugung von PET-Datensätzen, die die räumliche Verteilung beschreiben, und damit letzten Endes auch die Konzentration von Neurotransmittern oder auch Neuromodulatoren im menschlichen Gehirn, aus dem Stand der Technik bereits bekannt (z. B. US 2013/296688 A1). Diese Datensätze können in einfacher Weise an das bildgebende Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung adaptiert werden.

[0046] Ist es aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nicht möglich, die zu detektierenden Substanzen direkt als eine markierte Variante zu verabreichen, so sind weitere Wege bekannt, um die Verteilung von Neurotransmittern und/oder Neuromodulatoren auf indirekte Weise oder als ein Resultat primärer Produkte zu bestimmen. Insbesondere im Fall von Dopamin als Neurotransmitter ist die PET-Bildgebung bereits seit langem bekannt. Es ist daher denkbar, ein Basisprodukt mit ^{11}C oder ^{18}F zu markieren. Dessen ungeachtet wurden ebenfalls bereits Verfahren für weitere Neurotransmitter vorgeschlagen, wie z. B. für Serotonin oder Acetylcholin, um die räumliche Verteilung innerhalb des Gehirns zu messen.

[0047] Um nun eine Diagnose auf Grundlage dieser Art von PET-Daten zu erstellen, ist es erforderlich, die Aktivitätsverteilungen der PET-Messungen auf quantitative Weise mit den Hirnregionen des jeweiligen Patienten zu korrelieren, d. h. das gemessene Vorliegen des Neurotransmitters oder Neuromodulators muss in Relation zu spezifischen Regionen (insbesondere Nuklei) des Gehirns gesetzt werden. Ein Ansatz kann z. B. darin bestehen, den Gehalt an DR1-Komplex im Striatum zu bestimmen. In diesem Fall besteht jedoch die Schwierigkeit, dass nur eine grobe Zuordnung zu einer Region des Gehirns erfolgen kann, da die entsprechenden anatomischen Informationen aus dem PET-Datensatz nicht erhalten werden können. Es ist

daher nicht möglich, den Gehalt an DR1-Komplex in einer spezifischen Hirnregion, insbesondere einem Nukleus, zu bestimmen. Stehen komplementäre Computertomographiedaten zur Verfügung so gestattet dies aufgrund der beschränkten Niedrigkontrastauflösung im Gehirn keine ausreichend gute Segmentierung von anatomischen Strukturen und Regionen des Gehirns. In solchen Fällen kann der PET-Datensatz z. B. anhand von Informationen evaluiert werden, die die räumliche Auflösung von mindestens einem PET-Liganden gemäß der vorliegenden Erfindung im Gehirn eines DS-Patienten betreffen, und zwar mittels eines Verfahrens, das zusätzlich zu dem PET-Datensatz die Aufzeichnung eines morphometrischen Magnetresonanzdatensatzes umfasst, der in dem PET-Datensatz registriert wird oder bereits in diesem registriert ist, wobei Konzentrationsdaten der räumlichen Verteilung mindestens einer spezifischen Region des Gehirns zugeordnet werden, und zwar unter Berücksichtigung der Magnetresonanz-Bilddaten zur Bestimmung von der betreffenden Region zugeordneten Ergebnisdaten (US 2013/296688 A1).

[0048] Die radiopharmazeutischen Zusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung können zur SPECT- oder PET-Bildgebung an Patienten verabreicht werden, und zwar jeweils in einer Menge, die ausreicht, um das gewünschte Signal zu erzeugen. Normalerweise sind die üblichen Dosierungen von Radionukleotiden von 0,01 bis 100 mCi, bevorzugt 0,1 bis 50 mCi, pro 70 kg Körpergewicht zu diesem Zweck ausreichend.

[0049] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird eine Vorgehensweise zur Erstellung von Histogrammen aus PET (Positronenemissionstomographie)- oder SPECT (Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie)-Scans von DR1-Bildern im Gehirn eines Patienten zur Verfügung gestellt. In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Histogramm dazu verwendet, den Grad der Bindung von an den DR1 bindenden Agonisten zu diagnostizieren. In noch einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird ein Histogramm dazu verwendet, die in dem Gehirn eines Patienten vorliegende Gesamtmenge an DR1-Agonisten, deren höchste relative Konzentration im Gehirn sowie die Häufigkeitsverteilung verschiedener Konzentrationen solcher Antagonisten im gesamten Gehirn oder über spezifische Volumenebenen des Gehirns einzuschätzen, um so den Grad des DS in einem Patienten zu diagnostizieren oder zu beobachten.

[0050] Gemäß bestimmten Aspekten der vorliegenden Erfindung wird ein histogrammisches Tool, das in verschiedenen Instrumenten zur Bilddarstellung sowie in zur Analyse von Gehirns-Scans eingesetzten Softwareprogrammen eingeschlossen ist, dazu verwendet, Balkengrafiken zu erstellen, in denen Voxel gegen den numerischen Bereich aufgetragen sind. Diese Histogramme können ein komplettes Bildvolumen darstellen, einschließlich den gesamten Schädel und den umgebenden Bereich. Die Histogramme können zusammen mit aus einem PET- oder SPECT-Scan rekonstruierten dreidimensionalen Abbildungen analysiert oder dargestellt werden oder sie können analysiert oder dargestellt werden, ohne dass irgendeine Form der Bearbeitung oder Präsentation von Abbildungen erforderlich ist, wobei auch nicht zwingend ein fundamentales Wissen über die Anatomie des Gehirns vonnöten ist, um zweckmäßige Informationen bezüglich der Quantität oder Konzentration eines gegebenen pathologischen Ziels im Gehirn eines Patienten ableiten zu können. Die Verteilungen der Voxel-Werte und die damit assoziierten Histogrammformen unterscheiden sich auf eine regelmäßige und sich wiederholende Weise zwischen den Abbildungen von gesunden Kontrollsubjekten und denen von DS-Patienten. An sich kann eine visuelle Prüfung des Histogramms durchgeführt werden, um die Elemente dieser beiden Gruppen (d. h. normale und anomale) zu differenzieren.

[0051] Verschiedene Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung betreffen ein Verfahren zur Detektion und Diagnose des Grads der mentalen Behinderung in einem DS-Patienten anhand der Evaluierung von Histogrammen von Bilddaten, die nach der Verabreichung eines für den DR1 spezifischen Radiopharmazeutikums aus dem Gehirn des jeweiligen Patienten erhalten wurden.

[0052] Gemäß weiteren Aspekten wird ein Verfahren zur Diagnose des Grads der mentalen Behinderung in einem DS-Patienten zur Verfügung gestellt, umfassend die Verabreichung von

mindestens einem für den DR1 spezifischen Radiopharmazeutikum zur Bindung an den DR1-Komplex, die Messung der Verteilung der Radioaktivität des Radiopharmazeutikums in einer Körperregion des Patienten, umfassend eine Hirngewebe-region des Patienten, die Anwendung einer auf einem Computer ausführbaren Logik zur Manipulation der gemessenen Verteilung der Radioaktivität des Radiopharmazeutikums zur Erstellung eines Histogramms sowie die Analyse der Charakteristika des Histogramms zur Detektion und Quantifizierung des Vorliegens des an den DR1 bindenden Agonisten.

[0053] Die vorliegende Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels sowie der Zeichnungen näher erläutert, ohne jedoch auf diese beschränkt zu sein.

[0054] Figur 1A. Zwischen 480 und 720 kDa wurde eine einzelne Bande detektiert. Die Expression des den DRD1 enthaltenden Rezeptorkomplexes war sowohl in männlichen als auch in weiblichen DS-Patienten signifikant reduziert.

[0055] Figur 1B. Die Expression des D2 enthaltenden Rezeptorkomplexes in weiblichen DS-Patienten unterscheidet sich von dessen Expression in weiblichen Kontrollpersonen.

[0056] Figur 2. Die Expression des Komplexes, der den Acetylcholinrezeptor $\alpha 4$ enthält, in weiblichen DS-Patienten unterscheidet sich von dessen Expression in weiblichen Kontrollpersonen.

[0057] Figur 3. Die Expression des Komplexes, der den Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ enthält, war bei den weiblichen DS-Patienten im Vergleich zu dessen Expression bei den weiblichen Kontrollpersonen signifikant reduziert.

[0058] Figur 4. Die Expression des Rezeptorkomplexes, der den NR1 enthält, war bei den weiblichen DS-Patienten signifikant reduziert, wohingegen sich bei den männlichen DS-Patienten lediglich eine leichte Tendenz zu einer Reduktion zeigte.

[0059] Figur 5. Die GluR1-Spiegel waren bei den weiblichen DS-Patienten signifikant reduziert.

[0060] Figur 6. Die Expression des GluR2 war bei den männlichen DS-Patienten signifikant erhöht, nicht jedoch bei den weiblichen.

[0061] Figur 7. Die Expression des GluR3 war bei den weiblichen DS-Patienten signifikant reduziert, bei den männlichen DS-Patienten dagegen signifikant erhöht.

[0062] Figur 8. SDS-PAGE-Analyse eines Immunpräzipitats unter Verwendung eines gegen den D1-Rezeptor gerichteten Antikörpers. Der D1-Rezeptor und weitere Rezeptoren wurden mittels Massenspektrometrie identifiziert.

[0063] BEISPIEL: Reduzierte Spiegel des kortikalen Dopamin-D1-Rezeptors im fetalen DS-Gehirn

[0064] 1. Einleitung

[0065] Basierend auf den derzeitigen Erkenntnissen auf dem Gebiet der Pathobiologie von Rezeptoren in Tiermodellen und im Menschen wurden in dem vorliegenden Beispiel die bedeutendsten Rezeptorsysteme in fetalen DS-Gehirnen bewertet. Dieses Beispiel zeigte ebenfalls Veränderungen auf der Ebene der Zellrezeptoren anstelle der Ebene der Rezeptoruntereinheiten, da die Assemblierung von Rezeptoren zur Bildung von Rezeptorkomplexen zur Ausführung von Gehirnfunktionen führt. Es wurde ein gelbasierter proteomischer Ansatz verwendet, um die Rezeptorkomplexe der Klassen von NMDA-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren, 5-Hydroxytryptamin-Rezeptoren, nikotinergen Acetylcholinrezeptoren und Dopaminrezeptoren zu quantifizieren. Der den Dopaminrezeptor 1 enthaltende Komplex wurde mittels Massenspektrometrie identifiziert und es wurden abweichende Mengen an den D1-Dopaminrezeptor (DRD1) enthaltenden Komplexen sowohl in weiblichen als auch in männlichen DS-Gehirnen beobachtet.

[0066] In der Tat wurde ein Defizit an dem dopaminergen Rezeptor 1 in fetalen DS-Gehirnen festgestellt, das die Grundlage sowie die Erfordernis für eine experimentelle Behandlung mit einem der zahlreichen verfügbaren und bestens etablierten spezifischen Dopaminrezeptoragonisten darstellen kann.

[0067] 2. Materialien und Verfahren

[0068] 2.1. Proben aus dem fetalen humanen Gehirn

[0069] Die im Rahmen dieses Projekts verwendeten, vom Menschen stammenden biologischen Proben wurden zusammen mit der erforderlichen Genehmigung der Ethikkommission von der Fetal Tissue Bank of Vall d'Hebron University Hospital Biobank zur Verfügung gestellt.

[0070] In der vorliegenden Studie wurden Proben aus dem frontalen Kortex verwendet. Die entsprechenden Hirnbank-Zugangsnummern, Gestationswochen und Geschlechter zu den jeweiligen Proben sind in der nachstehenden Tabelle 1 zusammengefasst.

[0071] 2.2. Biochemische Analysen

[0072] 2.2.1. Aufbereitung der Proben

[0073] Es wurden insgesamt 26 Proben (4 männliche Kontrollpersonen und 6 männliche Personen mit Trisomie 21 jeweils in der 21. und 22 Gestationswoche; 8 weibliche Kontrollpersonen und 8 weibliche Personen mit Trisomie 21 in der 19. bis 21. Gestationswoche) in eiskaltem Homogenisierungspuffer (10 mM HEPES, pH 7,5, 300 mM Saccharose und 1 ganze Proteaseinhibitor-Tablette [Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland] pro 50 mL) unter Verwendung eines Ultra Turrax Homogenisiergeräts (IKA, Staufen, Deutschland) homogenisiert. Im Anschluss wurde das Homogenat für 10 min bei 1.000 x g zentrifugiert und das erhaltene Pellet wurde verworfen. Dann erfolgte die Zentrifugation des Überstands für 30 min bei 50.000 x g in einer Ultrazentrifuge (Beckman Coulter Optima L-90K) und das so erhaltene Pellet wurde in 5 mL Waschpuffer (Homogenisierungspuffer ohne Saccharose) homogenisiert, für 30 min auf Eis inkubiert und für weitere 30 min bei 50.000 x g zentrifugiert.

[0074] 2.2.2. Ultrazentrifugation mit Saccharosegradient zur Fraktionierung der Membranen

[0075] Das Verfahren zur Aufreinigung der Plasmamembranen aus den erhaltenen Pellets wurde wie bereits zuvor beschrieben, allerdings mit geringfügigen Modifikationen, durchgeführt [10]. Zur Fraktionierung der Membranen wurden Zentrifugationslösungen mit einem Saccharosegradienten (700 µL) und mit einem Saccharosegehalt von jeweils 69%, 54%, 45%, 41% und 37% (w/v) verwendet. Die erhaltenen Membranpellets (500 µL) wurden in Homogenisierungspuffer resuspendiert und in bereits mit Homogenisierungspuffer gefüllte Gefäße von oben zugefüllt. Im Anschluss wurden die Proben für 3 h bei 4°C und 70.000 x g ultrazentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die 41%-Fraktion an der Saccharose-Schnittstelle gesammelt, 10fach mit Homogenisierungspuffer verdünnt und dann für 30 min bei 4°C und 100.000 x g ultrazentrifugiert. Dann wurde der Überstand verworfen und das Pellet wurde bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert [11].

[0076] 2.2.3. Blau/native Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

[0077] Membranpellets aus der ultrazentrifugierten Fraktion mit 41% Saccharosegradient wurden in Extraktionspuffer (1,5 M 6-Aminocapronsäure, 300 mM Bis-Tris, pH 7,0) und 10% Triton X-100 (es erfolgte die Zugabe einer Stammlösung im Verhältnis 1:4, um eine Endkonzentration von 2% Triton X-100 zu erreichen) solubilisiert und über einen Zeitraum von 1 h alle 10 min gevortext. Im Anschluss an die Solubilisierung wurden die Proben mittels Zentrifugation für 60 min bei 4°C und 20.000 x g geklärt. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des BCA Proteinassay Kits (Pierce, Rockford, IL, USA) bestimmt und es wurden 50 µg des Membranproteinpräparats auf die Gels aufgetragen. Eine Gesamtmenge von 16 µL an BN-PAGE-Ladepuffer [5% (w/v) Coomassie G250 in 750 mM 6-Aminocapronsäure] wurde mit 100 µL des Membranproteinpräparats vermischt, bevor die Gels damit beladen wurden. Die BN-PAGE erfolgte in einer PROTEAN II xi Zelle (BioRad, Deutschland) unter Verwendung eines 4%-igen Sammelgels sowie eines 5- bis 18%-igen Laufgels. Der BN-PAGE Gelpuffer enthielt 500 mM 6-

Aminocaprinsäure und 50 mM Bis-Tris, pH 7,0. Der Kathodenpuffer enthielt 50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris und 0,05% (w/v) Coomassie G250, pH 7,0. Der Anodenpuffer enthielt 50 mM Bis-Tris, pH 7,0. Die Spannung wurde für 1 h auf 50 V und für 6 h auf 75 V eingestellt und dann sequentiell bis 400 V erhöht (maximale Stromstärke 15 mA/Gel, maximale Spannung 500 V), bis die Farbfront das Ende des Gels erreicht hatte [11]. Native hochmolekulare Massenmarker wurden von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

[0078] 2.2.4. Immunoblotting

[0079] Im Anschluss an die BN-PAGE wurden die Membranproteine auf PVDF-Membranen transferiert. Nach der Blockierung der Membranen für 1 h mit 10%-iger fettarmer Trockenmilch in 0,1% TBST (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20) wurden diese mit den folgenden primären Antikörpern inkubiert: Kaninchen-anti-GluR1 (Abcam, ab31232, Cambridge, UK; 1/5.000), Kaninchen-anti-GluR2 (Abcam, ab52932, Cambridge, UK; 1/5.000), Kaninchen-anti-GluR3 (Abcam, ab87609, Cambridge, UK; 1/3.000), Kaninchen-anti-GluR4 (Abcam, ab109431, Cambridge, UK; 1/2.500), Kaninchen-anti-Dopaminrezeptor D1 (Abcam, ab85608, Cambridge, UK; 1/2.500), Kaninchen-anti-Dopaminrezeptor D2 (Millipore, AB5084P; 1/2.000), Kaninchen-anti-nikotinerger Acetylcholinrezeptor $\alpha 4$ (Abcam, ab41172, Cambridge, UK; 1/2.500), Kaninchen-anti-nikotinerger Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ (Abcam, ab10096, Cambridge, UK; 1/2.500), Kaninchen-anti-NMDAR1 (Abcam, ab28669, Cambridge, UK; 1/2.000) und Kaninchen-anti-5HT1A (GenScript, Piscataway, NJ, USA; 1/20.000). Die Antikörper wurden unter Verwendung von mit Meerrettichoxidase konjugiertem Anti-Kaninchen-IgG (Abcam, ab6721, Cambridge, UK; 1/10.000) detektiert und die Entwicklung der Membranen erfolgte unter Verwendung des Detektionssystems ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

[0080] Willkürliche optische Dichten der immunreaktiven Banden wurden unter Verwendung der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) gemessen. Die Färbung der Blottingmembranen wurde (gemäß der Empfehlung) als Beladungskontrolle für Membranproteine verwendet [12].

[0081] 2.2.5. Immunpräzipitation des Dopamin-D1-Rezeptors

[0082] Zur Identifikation der interagierenden Partner des D1-Rezeptors, d. h. zur Bestimmung der Zusammensetzung des Komplexes, wurden unter Verwendung von kortikalem humanem Hirngewebe Immunpräzipitationsanalysen durchgeführt. Alle Membranfraktionen [24] wurden aus kortikalem Gewebe erhalten, in Lysepuffer, enthaltend 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM NaF, 10 mM Na₃VO₄ sowie einen Proteaseinhibitor-Cocktail (Roche, Mannheim, Deutschland), suspendiert und für 1 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler platziert. Im Anschluss an die Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 15.300 x g wurde der Überstand mit einem affinitätsaufgereinigten gegen den Dopamin-D1-Rezeptor gerichteten Kaninchen-Antikörper (D1DR, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert. Die Probe wurde mit Protein G-Agarose-Beads (GE Healthcare, Uppsala, Schweden) für 4 h bei 4°C unter sanfter Rotation inkubiert. Nach fünf Waschschritten mit jeweils dem gleichen Lysepuffer wurden die gebundenen Proteine in Probenpuffer, enthaltend 125 mM Tris (pH 6,8), 4% SDS 20% Glycerin, 10% Beta-Mercaptoethanol und 0,02% Bromphenolblau, für 3 min bei 95°C denaturiert (Ghafari et al., 2012b). Dann wurden die Proben auf 10%-ige SDS-Polyacrylamidgels geladen, elektrophoretisch getrennt und im Anschluss daran auf PVDF-Membranen transferiert (Pall, Ann Arbor, MI, USA). Nach der Blockierung der Membranen für 1 h in 5%-iger fettarmer Trockenmilch in 0,1% TBST (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5, und 0,1% Tween 20) wurden diese mit einem verdünnten primären Antikörper aus der Ziege, der gegen den Dopamin-D1-Rezeptor gerichtet war (1:1.000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), inkubiert und unter Verwendung von Anti-Ziege-IgG (1:5.000, Abcam, Cambridge, UK) detektiert und die Entwicklung der Membranen erfolgte unter Verwendung des Detektionssystems ECL Plus Western Blotting (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

[0083] 2.2.6. In-Gel-Verdau von Proteinen und Peptiden

[0084] Die aus den SDS-Gels selektierten Spots, die von dem gegen die Untereinheit des

Dopamin-D1-Rezeptors gerichteten Antikörper erkannt wurden, wurden in 1,5 mL Eppendorfgefäße transferiert. Die Gelstücke wurden zunächst mit 50 mM Ammoniumbicarbonat und im Anschluss zwei Mal mit Waschpuffer (50% 100 mM Ammoniumbicarbonat/50% Acetonitril) für jeweils 30 min gewaschen (mit Vortexen). Dann erfolgte die Zugabe von Acetonitril (100%, 100 µL) bis die Gelstücke vollständig bedeckt waren und das Gemisch wurde für 10 min inkubiert. Als nächstes wurden die Gelstücke unter Verwendung eines SpeedVac Konzentrators vollständig getrocknet und die Cysteinreste wurden unter Verwendung einer 10 mM Dithiothreitol (DTT)-Lösung in 100 mM Ammoniumbicarbonat, pH 8,6, für 60 min bei 56°C reduziert. Nachdem die DTT-Lösung verworfen worden war, erfolgte die Zugabe eines identischen Volumens einer 55 mM Jodacetamid (IAA)-Lösung in 100 mM Ammoniumbicarbonatpuffer, pH 8,6, und die Probe wurde für 45 min bei 25°C im Dunkeln inkubiert, um eine Alkylierung der Cysteinreste zu erreichen. Im Anschluss wurde die IAA-Lösung durch Waschpuffer (50% 100 mM Ammoniumbicarbonat/50% Acetonitril) ersetzt und es erfolgten 2 Waschschrte von jeweils 15 min unter Vortexen. Dann wurden die Gelstücke in 100% Acetonitril gewaschen und getrocknet, gefolgt von einer Trocknung im SpeedVac. Die getrockneten Gelstücke wurde in einer Lösung von 12,5 ng/µL Trypsin (Promega, Deutschland) rehydriert, die entweder mit einer 25 mM Ammoniumbicarbonatlösung oder mit einer in 25 mM Ammoniumbicarbonat gepufferten 12,5 ng/µL Chymotrypsinlösung (Roche, Deutschland) rekonstituiert wurde. Im Anschluss wurden die Gelstücke für 16 h (über Nacht) bei 37°C (Trypsin) oder bei 25°C (Chymotrypsin) inkubiert. Der Überstand wurde in ein frisches 0,5 mL Gefäß überführt und es erfolgte eine Extraktion der Peptide mit 50 µL 0,5% Ameisensäure/20% Acetonitril (v/v) für 20 min in einem Ultraschallbad. Dieser Schritt wurde zwei Mal wiederholt. Die Proben in dem Extraktionspuffer wurden in 0,5 mL Gefäßen gepoolt und in einem SpeedVac Konzentratorevaporiert. Das Volumen wurde auf etwa 20 µL reduziert und hierzu erfolgte die Zugabe von 20 µL Wasser mit HPLC-Reinheitsgrad (Sigma, Deutschland) [13].

[0085] 2.2.7. Nano-LC-ESI-CID/ETD-MS/MS

[0086] In diesen Analysen wurde das System Ultimate 3000 HPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) eingesetzt, das mit einer PepMap100 C-18 Trap-Säule (300 µm x 5 mm) sowie einer PepMap100 C-18 Analysensäule (75 µm x 150 mm) ausgestattet war. Es wurde der folgenden Gradient angelegt: A = 0,1% FA in Wasser und B = 0,08% FA in Acetonitril: 4 bis 30% B von 0 bis 105 min, 80% B von 105 bis 110 min und 4% B von 110 bis 125 min. Es wurde das Massenspektrometer HCT Ultra ETD II (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) verwendet, um die Peptidspektren über einen Massenbereich von m/z 350 - 1.500 und die MS/MS-Spektren anhand einer informationsabhängigen Datenerhebung über einen Massenbereich von m/z 100 - 2.800 aufzuzeichnen. Die MS-Spektren wurden wiederholt aufgezeichnet, gefolgt von 4 datenabhängigen CID MS/MS-Spektren sowie 4 ETD MS/MS-Spektren, die von den 4 Vorläuferionen mit der höchsten Intensität generiert worden waren. Ein aktiver Ausschluss von 0,4 min nach 2 Spektren wurde dazu eingesetzt, Peptide mit geringer Häufigkeit zu detektieren. Die Spannung zwischen der Ionensprayspitze und dem Sprayschild wurde auf 1.500 V eingestellt. Trocknendes Stickstoffgas wurde auf 150°C erhitzt und die Durchflussrate wurde auf 10 L/min eingestellt. Die Kollisionsenergie wurde in Abhängigkeit von der Masse und dem Ladungszustand der zur Fragmentierung ausgewählten Peptide automatisch eingestellt. Es wurden mehrere geladene Peptide aufgrund ihrer guten Fragmentierungscharakteristik für die MS/MS-Experimente ausgewählt. Die so erhaltenen MS/MS-Spektren wurden interpretiert und Peaklisten wurden mit der Software DataAnalysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland) erstellt.

[0087] Zur Identifikation der Proteine wurden MASCOT-Recherchen gegen die aktuellste Version der Uni-ProtKB-Datenbank durchgeführt, und zwar unter Verwendung von MASCOT 2.2.06 (Matrix Science, London, UK). Die Rechercheparameter wurden wie folgt festgesetzt: Enzymauswahl Trypsin oder Chymotrypsin mit maximal 2 fehlenden Spaltungsstellen; Klassifizierung der Spezies eingegrenzt auf "menschlich"; Massentoleranz von 5 ppm für die Peptidtoleranz; 20 mmu MS/MS-Toleranz; Ionen-Score-Schwellenwert unter 15; fixierte Modifikation von Carbamidomethyl (C); und variable Modifikation von Oxidation (M), Deamidierung (N, Q) und Phosphorylierung (S, T, Y). Die positive Identifikation der Proteine erfolgte auf Grundlage eines signifi-

kanten MOWSE-Scores. Im Anschluss an die Identifikation der Proteine wurde eine fehlertolerante Recherche durchgeführt, um nicht spezifische Spaltungen und nicht zugeordnete Modifikationen zu detektieren. Die daraus erhaltenen Informationen bezüglich der Proteinidentifikation wurde manuell überprüft und gefiltert, um die Proteinidentifikationslisten zu validieren.

[0088] Eine höhere Sequenzabdeckung wurde mit der Software Modiro® und den folgenden Parametern erzielt: ausgewählte Enzyme mit maximal zwei fehlenden Spaltungsstellen; Peptidmassentoleranz von 0,2 Da als Peptidtoleranz; 0,2 Da als Fragmentmassentoleranz; sowie Modifikation 1 für Carbamidomethyl (C) und Modifikation 2 für die Methioninoxidation. Eine positive Identifikation der Proteine erfolgte zuerst auf Grundlage der erhaltenen Spektren und im Anschluss wurde jedes identifizierte Peptid aufgrund seines Ionenladungszustands, der b- und y-Ionen-Fragmentierungsqualität, des Ionen-Scores (> 200) sowie des Signifikanz-Scores (> 80) als signifikant erachtet. Die Informationen bezüglich der Proteinidentifikation wurde manuell überprüft und gefiltert, um die validierten Listen identifizierter Proteine zu erhalten [13].

[0089] 2.3. Statistische Auswertung

[0090] Die aus dem Western-Blot erhaltenen Daten wurden unter Anwendung des Student-t-Tests analysiert und sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Unter Verwendung von IBM SPSS für Windows 19.0 wurden Pearson-Korrelationen durchgeführt.

[0091] 3. Ergebnisse

[0092] 3.1. BN-PAGE

[0093] Wie in Figur 1A dargestellt, wurde eine einzelne Bande zwischen 480 und 720 kDa detektiert. Die Spiegel an den DRD1 enthaltenden Komplexen waren sowohl in den männlichen als auch in den weiblichen DS-Föten signifikant und deutlich reduziert.

[0094] Figur 1B zeigt eine einzelne Bande für den den Dopaminrezeptor D2 enthaltenden Komplex zwischen 480 und 720 kDa und zeigt weiterhin, dass die Spiegel an den DRD2 enthaltenden Komplexen in der weiblichen DS-Gruppe erhöht waren, nicht jedoch in der männlichen DS-Gruppe. Allerdings zeigte sich in der männlichen DS-Gruppe eine Tendenz in Richtung reduzierter Spiegel.

[0095] Figur 2 zeigt einen den Acetylcholinrezeptor $\alpha 4$ enthaltenden Komplex, der zwischen 480 und 720 kDa migriert und dessen Spiegel in den Gehirnen von Föten mit dem Down-Syndrom signifikant reduziert waren.

[0096] In der männlichen Gruppe waren die Spiegel dieses Komplexes bei den Kontrollpersonen und den DS-Patienten vergleichbar.

[0097] Figur 3 zeigt einen den Acetylcholinrezeptor $\alpha 7$ enthaltenden Komplex, der zwischen 480 und 720 kDa migriert. In der weiblichen Gruppe war die Expression dieses Komplexes auf höchst signifikante Weise reduziert. In der männlichen Gruppe wurde kein signifikanter Unterschied beobachtet und die Spiegel dieses Komplexes zeigten eine Tendenz zu einer erhöhten Immunreaktivität.

[0098] Figur 4 zeigt die Untereinheit NR1 des NMDA-Rezeptors enthaltende Rezeptorkomplexe, die zwischen 480 und 720 kDa migrieren. Das Expressionsniveau dieses Komplexes war in der weiblichen Gruppe mit dem Down-Syndrom signifikant reduziert. In der männlichen DS-Gruppe war eine Tendenz zu einer reduzierten Expression zu beobachten.

[0099] Wie in Figur 5 gezeigt ist, migrierte der GluR1 zwischen 480 und 720 kDa und seine Expression war in der weiblichen Gruppe mit DS signifikant reduziert und in der männlichen Gruppe zwischen den DS-Patienten und den Kontrollpersonen vergleichbar.

[00100] In Figur 6 migrierte der GluR2 zwischen 480 und 720 kDa und seine Spiegel waren in der männlichen Gruppe mit DS signifikant erhöht, nicht jedoch in der weiblichen Gruppe.

[00101] Figur 7 zeigt, dass der GluR3 zwischen 480 und 720 kDa migrierte. Die Spiegel dieses Proteins waren in der weiblichen Gruppe der DS-Patienten signifikant reduziert, in der männli-

chen DS- Gruppe dagegen signifikant erhöht.

[00102] Zwischen den einzelnen Rezeptoren enthaltenden Komplexen waren eine Reihe von Korrelationen zu beobachten.

[00103] 3.2. Charakterisierung des den D1-Rezeptor enthaltenden Komplexes

[00104] Figur 8 zeigt das SDS-PAGE-Muster sowie einen Immunblot (unter Verwendung eines gegen den DRD1 gerichteten Antikörpers) immunpräzipitierter Proteine, aus denen die Banden für die massenspektrometrische Bestimmung der in dem Komplex vorhandenen Proteine ausgewählt wurden.

[00105] Wie in Tabelle 2 gezeigt ist, offenbarte eine gelbasierte Massenspektrometrie des Immunpräzipitats das Vorliegen von mehreren Rezeptoren sowie der katalytischen Alpha- und Beta-Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinasen. Die Dopaminrezeptoren D1B, D3 und D4; der GluR2; NR1; NR2A; und 5HT3D wurden mit einer Sequenzabdeckung von mehr als 30% eindeutig in dem Rezeptorkomplex nachgewiesen. Eine Reihe von zusätzlichen Rezeptoren, die in Tabelle 2 aufgelistet sind, wurden mit einer geringeren Sequenzabdeckung (15 - 29%) ebenfalls beobachtet.

[00106] 4. Besprechung

[00107] In erster Linie wurde in dieser Studie festgestellt, dass die Spiegel an den D1-Rezeptor enthaltenden Komplexen in den Kortexen von fetalen DS-Gehirnen signifikant und deutlich reduziert sind. Darüber hinaus bestehen zwischen den Geschlechtern auffällige Unterschiede bezüglich der vorliegenden Mengen an Rezeptorkomplexen.

[00108] Kognitive Defizite sind ein herausragendes Symptom des Down- Syndroms und bei dem D1-Rezeptor handelt es sich um einen bedeutenden Signalgebungskomplex, der kognitive Funktionen im neurobiologischen System von Nagern und Menschen vermittelt. Die Beteiligung des D1-Rezeptors an der Lern- und Gedächtnisleistung ist gemeinhin anerkannt. So sind z. B. in D1-Rezeptor-Knockout-Mäusen Defizite bezüglich des räumlichen Lernens zu beobachten [14] und der D1-Rezeptor spielt sowohl im räumlichen Arbeitsgedächtnis als auch im räumlichen Gedächtnis eine Rolle. El-Ghundi et al. lieferten zu diesem Thema eine umfassende Abhandlung [15]. Des Weiteren ist der D1-Rezeptor in vitro sowie in vivo an einer Reihe von Lern- und Gedächtnisfunktionen beteiligt und wird für die Langzeitpotenzierung [16], für das konditionierte geschmacksaversive Lernen [17], für inhibitorische Vermeidungsaufgaben [18], für durch das Arbeitsgedächtnis gesteuerte Bewegungen [19], für die Speicherung von Objekten im Arbeitsgedächtnis [20] sowie für die Auslöschung von Angsterinnerungen [21] benötigt.

[00109] Diese Erkenntnisse bezüglich der reduzierten Spiegel von den D1-Rezeptor enthaltenden Komplexen ist von zentralen Interesse, und zwar nicht nur im Hinblick auf das Verständnis des Mechanismus, der den kognitiven Defiziten in DS-Gehirnen zugrunde liegt, sondern ebenfalls bezüglich der Bereitstellung eines pharmakologischen Ziels für eine wahrscheinliche Verbesserung des kognitiven Gedächtnisses [22]. Das Gleichgewicht des dopaminergen Systems im Hinblick auf D1 ist von größter Bedeutung, da dieses zentrale Neurotransmittersystem durch Agonismus und Antagonismus gestört werden kann. In der nachfolgenden Besprechung werden zahlreiche Informationen angesprochen, die unter Umständen für mögliche zukünftige experimentelle Therapien von Bedeutung sind, in denen eine Stimulation oder Blockade von D1 in DS-Patienten eine Rolle spielt. Zwar bleibt die Frage offen, ob der D1-Agonismus für experimentelle Behandlungen in Frage kommt, jedoch belegen mehrere gut angelegte Studien die Wirkung von Agonisten. So führt z. B. die Verabreichung einer geringen Dosis an Dopaminagonisten zu einer Verbesserung des Gedächtnisses [23] und die Aktivierung von postsynaptischen D1-Rezeptoren verbessert den Gedächtnisabruf [24]. Cai und Arnsten sowie Arnsten et al. deuteten an, dass sehr geringe Dosierungen an D1-Rezeptoragonisten in gealterten Affen eine kognitionsverstärkende Wirkung hervorrufen können. Darüber hinaus verbessert die Aktivierung von D1-Rezeptoren im medialen Septum von Ratten eine durch Scopolamin induzierte Amnesie [25] und die Verwendung von D1-Rezeptoragonisten kehrt in Ratten ein durch Phencyclidin induziertes Defizit des Wiedererkennens von Objekten um [26]. Der D1-Rezeptoragonist SKF-

38393 verbessert in Ratten die Gedächtnisleistung bezüglich der zeitlichen Reihenfolge [27]. Die Agonisten SKF-38393 und SKF-81297 verkürzen in Ratten mit hohem Alter und beeinträchtigter Gedächtnisleistung die Latenzzeit im Morris-Wasserlabyrinth [28]. Eine supra-physiologische Stimulation [29] blockiert dagegen sowohl aversive als auch mit Belohnungen assoziierte Erfahrungen.

[00110] Was den Antagonismus angeht, so zeigten Granado et al., dass LTP von der Aktivität des D1-Rezeptors abhängig ist, da die Verabreichung von SCH-23390 sowie die genetische Ablation des D1-Rezeptors zu einer Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung (LTP) sowie des räumlichen Lernverhaltens führten [30]. Nach einer systemischen oder limbischen Verabreichung der vorstehend genannten Antagonisten kommt es zu Defiziten bezüglich des Erkundungsverhaltens und des Gedächtnisses, wie von Clausen et al. gezeigt wurde [31].

[00111] Des Weiteren zeigten da Silva et al., dass der Antagonist SKF- 38393 die Verarbeitung im räumlichen Gedächtnis beeinträchtigt; diese Verbindung moduliert ebenfalls die Konsolidierung des unterscheidenden Lernens [32] und beeinträchtigt die Konsolidierung der Wiedererkennung von Objekten [36]. Darüber hinaus zeigten Pezze und Bast, dass eine Blockade des D1-Rezeptors während des Lernprozesses das Trial-Place-Gedächtnis beeinträchtigt [33, 34].

[00112] Bei den reduzierten kortikalen Spiegeln des den D1 enthaltenden Rezeptorkomplexes, die in DS-Patienten beiderlei Geschlechts zu beobachten waren, handelt es sich möglicherweise um eine bedeutende neurochemische Entdeckung, da die Rezeptorkomplexe vielmehr als die Rezeptoruntereinheiten für die Ausführung von Gehirnfunktionen verantwortlich sind. Die den D1-Rezeptor enthaltenden Komplexe, die in der vorliegenden Arbeit durch ein gelbasiertes immunchemisches Verfahren isoliert wurden, wiesen ein scheinbares Molekulargewicht zwischen 480 und 720 kDa auf, was indikativ für die Bildung eines Heterooligomers ist, das aus mehreren Rezeptoren besteht (Tabelle 2). D1B, D3 und D4 (D1B ist ein Vertreter der Familie der D1-Rezeptoren, wohingegen D3 und D4 zur Familie der D2- Rezeptoren gehören) [35] ebenso wie GluR2, NR1, NR2A, 5HT3D und die katalytischen Alpha- und Beta-Untereinheiten der cAMP-abhängigen Proteinkinasen wurden in dem Rezeptorkomplex eindeutig identifiziert. In der Tat interagieren einige der Rezeptoren entweder direkt (durch eine Bindung an den Rezeptor) oder indirekt mit dem D1-Rezeptor, wie z. B. AMPARs [36, 37] und NMDARs [38, 39]. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden eine Reihe an zusätzlichen Rezeptoren bewertet, die in Tabelle 2 aufgeführt sind und mittels Massenspektrometrie identifiziert wurden. Die Rezeptoren mit einer geringeren Häufigkeit wurden mit einer niedrigeren Sequenzabdeckung und die Rezeptoren mit einer größeren Häufigkeit wurden mit einer höheren Sequenzabdeckung identifiziert, was sie in eindeutiger Weise als Komponenten des Komplexes identifizierte. Des Weiteren wurde der Serotoninrezeptor 5HT3D, der eindeutig identifiziert wurde, zuvor noch nie als eine Komponente des D1-Rezeptorkomplexes genannt. D1 und D2 bilden heterooligomere Rezeptorkomplexe [40, 41], obwohl sie sich bezüglich ihrer jeweiligen Aktivitäten bei der Ausübung ihrer biochemischen, elektrophysiologischen oder psychomotorischen Wirkung gegenseitig funktionell opponieren oder verstärken können [42]. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die vorliegenden Mengen an D2 enthaltenden Rezeptorkomplexen in weiblichen DS-Patienten erhöht waren, während die Spiegel der männlichen DS-Patienten mit denen der Kontrollpersonen vergleichbar waren. Die Erkenntnisse reflektieren unter Umständen die mögliche Entkopplung von D1 und D2, die mit den geschlechtsabhängigen Verhaltensdefiziten in Verbindung stehen könnten, wie sie beim Down-Syndrom zu beobachten sind [50]. Die durch die Ergebnisse der vorliegenden Studie aufgezeigten geschlechtsabhängigen Unterschiede bezüglich der untersuchten Rezeptorkomplexe stellen unter Umständen eine Reflexion oder Parallele der primären Veränderungen in Anomalien des D1-Rezeptors dar und können zu den mentalen Defiziten beitragen, die mit dem Down-Syndrom assoziiert sind. In der Tat sind die mentalen Defizite und Verhaltensveränderungen, die in männlichen und weiblichen DS-Patienten zu beobachten sind, unterschiedlich [43, 44]. An diesen Unterschieden kann das cholinerge System beteiligt sein, da eine Aktivierung von D1-Rezeptoren die cholinerge Transmission verstärkt und in Patienten mit dem Down-Syndrom ein nikotineres cholinerges Defizit auftritt (siehe oben). Die vorliegenden Mengen der nikotineren $\alpha 4$ - und $\alpha 7$ -AChR enthaltenden

Komplexe waren in den fetalen Gehirnen von weiblichen DS-Patienten signifikant reduziert. Die in den fetalen Gehirnen von Patienten mit dem Down-Syndrom gemachten Beobachtungen legen nahe, dass Veränderungen der vorliegenden Mengen an Hirnrezeptorkomplexen den neuropathologischen Veränderungen vorausgehen, die unweigerlich im späteren Leben auftreten werden [45]. Es wurde bereits angedeutet, dass der D1-Rezeptor ein zentraler Faktor in neurodegenerativen Erkrankungen ist [46], wie z. B. der Parkinson-Krankheit [47], der Chorea Huntington [48], der Schizophrenie [49] und der Alzheimer-Krankheit, in denen anomale striatale D1-Rezeptoren, nicht jedoch D2-Rezeptoren, sowie eine reduzierte Dichte an D1-Rezeptoren im Hippocampus vorliegen [50].

[00113] Tabelle 1. Aufgeführt sind Code, Gestationswoche, Diagnose und Geschlecht der jeweiligen Individuen. In dieser Studie wurde Gewebe aus dem frontalen Kortex verwendet.

Probe Nr.	Gestationsw.	Gewebe	Diagnose	Geschlecht
MD13	19	FK	Trisomie 21	W
MD14	19	FK	Trisomie 21	W
MD15	19	FK	Trisomie 21	W
MD16	19	FK	Trisomie 21	W
MD17	19	FK	Normale Morphologie	W
MD18	19	FK	Normale Morphologie	W
MD19	19	FK	Normale Morphologie	W
MD20	19	FK	Normale Morphologie	W
MD21	21	FK	Trisomie 21	W
MD22	21	FK	Trisomie 21	W
MD23	21	FK	Trisomie 21	W
MD24	21	FK	Trisomie 21	W
MD25	21	FK	Normale Morphologie	W
MD26	21	FK	Normale Morphologie	W
MD27	21	FK	Normale Morphologie	W
MD28	21	FK	Normale Morphologie	W
MD29	22	FK	Trisomie 21	M
MD30	22	FK	Trisomie 21	M
MD31	22	FK	Trisomie 21	M
MD32	22	FK	Trisomie 21	M
MD33	22	FK	Trisomie 21	M
MD34	22	FK	Trisomie 21	M
MD35	22	FK	Normale Morphologie	M
MD36	22	FK	Normale Morphologie	M
MD37	22	FK	Normale Morphologie	M
MD38	22	FK	Normale Morphologie	M

[00115] Tabelle 2. In einer gelbasierten Massenspektrometrie von Immunpräzipitaten zeigte sich das Vorliegen einiger Rezeptoren und Proteinkinasen.

Zugangsnummer	Molekulargewicht	Aminosäure	Enzym	Abdeckung	Gesamtdeckung
P21928 D1B Dopaminrezeptor	52.951	477	Chymotrypsin	40,00 %	40,00 %
P21728 D1A Dopaminrezeptor	49.293	446	Trypsin	15,00 %	15,00 %
P14416 D2 Dopaminrezeptor	50.619	443	Chymotrypsin	17,60 %	17,60 %
P35462 D3 Dopaminrezeptor	44.225	400	Chymotrypsin	37,50 %	37,50 %
P21917 D4 Dopaminrezeptor	48.361	467	Chymotrypsin	34,40 %	34,40 %
P42261 GluR1	101.506	906	Trypsin	28,9 %	28,9 %
P42262 GluR2	98.821	883	Chymotrypsin	30,00 %	30,00 %
P42263 GluR3	101.157	894	Trypsin	18,50 %	18,50 %
P48058 GluR4	100.871	902	Trypsin	16,7 %	16,7 %
Q05586 NR1	105.373	938	Trypsin Chymotrypsin	18 % 16 %	33,00 %
Q12879 NR2A	165.283	1.464	Trypsin Chymotrypsin	14 % 25 %	34,28 %
Q14957 NR2C	134.209	1.233	Chymotrypsin	24,50	24,50 %
P28222 5HT1B	43.568	390	Chymotrypsin	23,00 %	23,00 %
P28221 5HT1D1	41.907	377	Chymotrypsin	24,00 %	24,00 %
P30939 5HT1F	41.709	366	Chymotrypsin	28,40 %	28,40 %
P46098 5HT3A	55.280	478	Chymotrypsin	15,00 %	15,00 %
Q70Z44 5HT3D	50.191	454	Chymotrypsin	40,00 %	40,00 %
A5X5Y0 5HT3E	51.438	456	Chymotrypsin	21,00 %	21,00 %
P22694 cAMP-abhängige katalytische Beta-Untereinheit der Proteinkinase	40.623	351	Trypsin	30 %	30 %
P17612 cAMP-abhängige katalytische Alpha-Untereinheit der Proteinkinase	40.590	351	Trypsin	28 %	28 %

REFERENZEN:

1. Gardiner KJ. Molecular basis of pharmacotherapies for cognition in Down syndrome. *Trends Pharmacol Sci.* 2010; 31(2): 6673.
2. Arai Y, Mizuguchi M, Takashima S. Excessive glutamatereceptor 1 immunoreactivity in adult Down syndrome brains. *Pediatr Neurol.* 1996; 15(3): 203-6.
3. Florez J, del Arco C, Gonzalez A, Pascual J, Pazos A. Autoradiographic studies of neurotransmitter receptors in the brain of newborn infants with Down syndrome. *Am J Med Genet Suppl.* 1990; 7: 301-5.
4. Bar-Peled O, Israeli M, Ben-Hur H, Hoskins I, Groner Y, Biegon A. Developmental pattern of muscarinic receptors in normal and Down's syndrome fetal brain--an autoradiographic study. *Neurosci Lett.* 1991; 133(2): 154-8.
5. Deutsch SI, Rosse RB, Mastropaolo J, Chilton M. Progressive worsening of adaptive functions in Down syndrome may be mediated by the complexing of soluble Abeta peptides with the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor: therapeutic implications. *Clin Neuropharmacol.* 2003; 26(5): 277-83.
6. Costa AC. On the promise of pharmacotherapies targeted at cognitive and neurodegenerative components of Down syndrome. *Dev Neurosci.* 2011; 33(5): 414-27.
7. Wallace TL, Ballard TM, Pouzet B, Riedel WJ, Wettstein JG. Drug targets for cognitive enhancement in neuropsychiatric disorders. *Pharmacol Biochem Behav.* 2011; 99(2): 130-45.
8. Granholm AC, Sanders LA, Crnic LS. Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol.* 2000; 161(2): 647-63.
9. Wang X, Zhao Y, Zhang X, Badie H, Zhou Y, Mu Y, et al. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med.* 2013; 19(4): 473-80.
10. Chen P, Li X, Sun Y, Liu Z, Cao R, He Q, et al. Proteomic analysis of rat hippocampal plasma membrane: characterization of potential neuronal-specific plasma membrane proteins. *J Neurochem.* 2006; 98(4): 1126-40.
11. Ghafari M, Falsafi SK, Hoeger H, Lubec G. Hippocampal levels of GluR1 and GluR2 complexes are modulated by training in the Multiple T- maze in C57BL/6J mice. *Brain Struct Funct.* 2012; 217(2): 353-62.
12. Welinder C, Ekblad L. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. *J Proteome Res.* 2011; 10(3): 1416-9.
13. Ghafari M, Hoyer H, Keihan Falsafi S, Russo-Schlaff N, Pollak A, Lubec G. Mass spectrometrical identification of hippocampal NMDA receptor subunits NR1, NR2A-D and five novel phosphorylation sites on NR2A and NR2B. *J Proteome Res.* 2012; 11(3): 1891-6.
14. El-Ghundi M, Fletcher PJ, Drago J, Sibley DR, O'Dowd BF, George SR. Spatial learning deficit in dopamine D(1) receptor knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 1999; 383(2): 95-106.
15. El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR. Insights into the role of dopamine receptor systems in learning and memory. *Rev Neurosci.* 2007; 18(1): 37-66.
16. Kerr JN, Wickens JR. Dopamine D-1/D-5 receptor activation is required for long-term potentiation in the rat neostriatum in vitro. *J Neurophysiol.* 2001; 85(1): 117-24.
17. Fenu S, Bassareo V, Di Chiara G. A role for dopamine D1 receptors of the nucleus accumbens shell in conditioned taste aversion learning. *J Neurosci.* 2001; 21(17): 6897-904.

18. Manago F, Castellano C, Oliverio A, Mele A, De Leonibus E. Role of dopamine receptors subtypes, D1-like and D2-like, within the nucleus accumbens subregions, core and shell, on memory consolidation in the one- trial inhibitory avoidance task. *Learn Mem.* 2009; 16(1):46-52.
19. Sawaguchi T. The role of D1-dopamine receptors in working memory-guided movements mediated by frontal cortical areas. *Parkinsonism Relat Disord.* 2000; 7(1): 9-19.
20. Castellano C, Cabib S, Puglisi-Allegra S, Gasbarri A, Sulli A, Pacitti C, et al. Strain-dependent involvement of D1 and D2 dopamine receptors in muscarinic cholinergic influences on memory storage. *Behav Brain Res.* 1999; 98(1): 17-26.
21. El-Ghundi M, O'Dowd BF, George SR. Prolonged fear responses in mice lacking dopamine D1 receptor. *Brain Res.* 2001; 892(1): 86-93.
22. Barch DM. Pharmacological manipulation of human working memory. *Psychopharmacology (Berl).* 2004; 174(1): 126-35.
23. White NM, Packard MG, Seamans J. Memory enhancement by post- training peripheral administration of low doses of dopamine agonists: possible autoreceptor effect. *Behav Neural Biol.* 1993; 59(3): 230-41.
24. Zarrindast MR, Sattari-Naeini M, Motamedi F. Effect of D- 1 or D-2 receptor stimulation on memory retrieval in mice. *J Psychopharmacol.* 1992; 6(4): 526-31.
25. Zarrindast MR, Ardjmand A, Ahmadi S, Rezayof A. Activation of dopamine D1 receptors in the medial septum improves scopolamine- induced amnesia in the dorsal hippocampus. *Behav Brain Res.* 2012; 229(1): 68-73.
26. Horiguchi M, Hannaway KE, Adekun AE, Huang M, Jayathilake K, Meltzer HY. D(1) receptor agonists reverse the subchronic phencyclidine (PCP)-induced novel object recognition (NOR) deficit in female rats. *Behav Brain Res.* 2013; 238: 36-43.
27. Lejeune S, Dourmap N, Martres MP, Giros B, Dauge V, Naudon L. The dopamine D1 receptor agonist SKF 38393 improves temporal order memory performance in maternally deprived rats. *Neurobiol Learn Mem.* 2013.
28. Hersi AI, Rowe W, Gaudreau P, Quirion R. Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience.* 1995; 69(4): 1067-74.
29. Lauzon NM, Bechard M, Ahmad T, Laviolette SR. Supranormal stimulation of dopamine D1 receptors in the prelimbic cortex blocks behavioral expression of both aversive and rewarding associative memories through a cyclic-AMP-dependent signaling pathway. *Neuropharmacology.* 2013; 67: 104-14.
30. Granado N, Ortiz O, Suarez LM, Martin ED, Cena V, Solis JM, et al. D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-Induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cereb Cortex.* 2008; 18(1): 1-12.
31. Clausen B, Schachtman TR, Mark LT, Reinholdt M, Christoffersen GR. Impairments of exploration and memory after systemic or prelimbic D1-receptor antagonism in rats. *Behav Brain Res.* 2011; 223(2): 241-54.
32. Schicknick H, Reichenbach N, Smalla KH, Scheich H, Gundelfinger ED, Tischmeyer W. Dopamine modulates memory consolidation of discrimination learning in the auditory cortex. *Eur J Neurosci.* 2012; 35(5): 763-74.
33. de Lima MN, Presti-Torres J, Dornelles A, Scalco FS, Roesler R, Garcia VA, et al. Modulatory influence of dopamine receptors on consolidation of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem.* 2011; 95(3): 305-10.

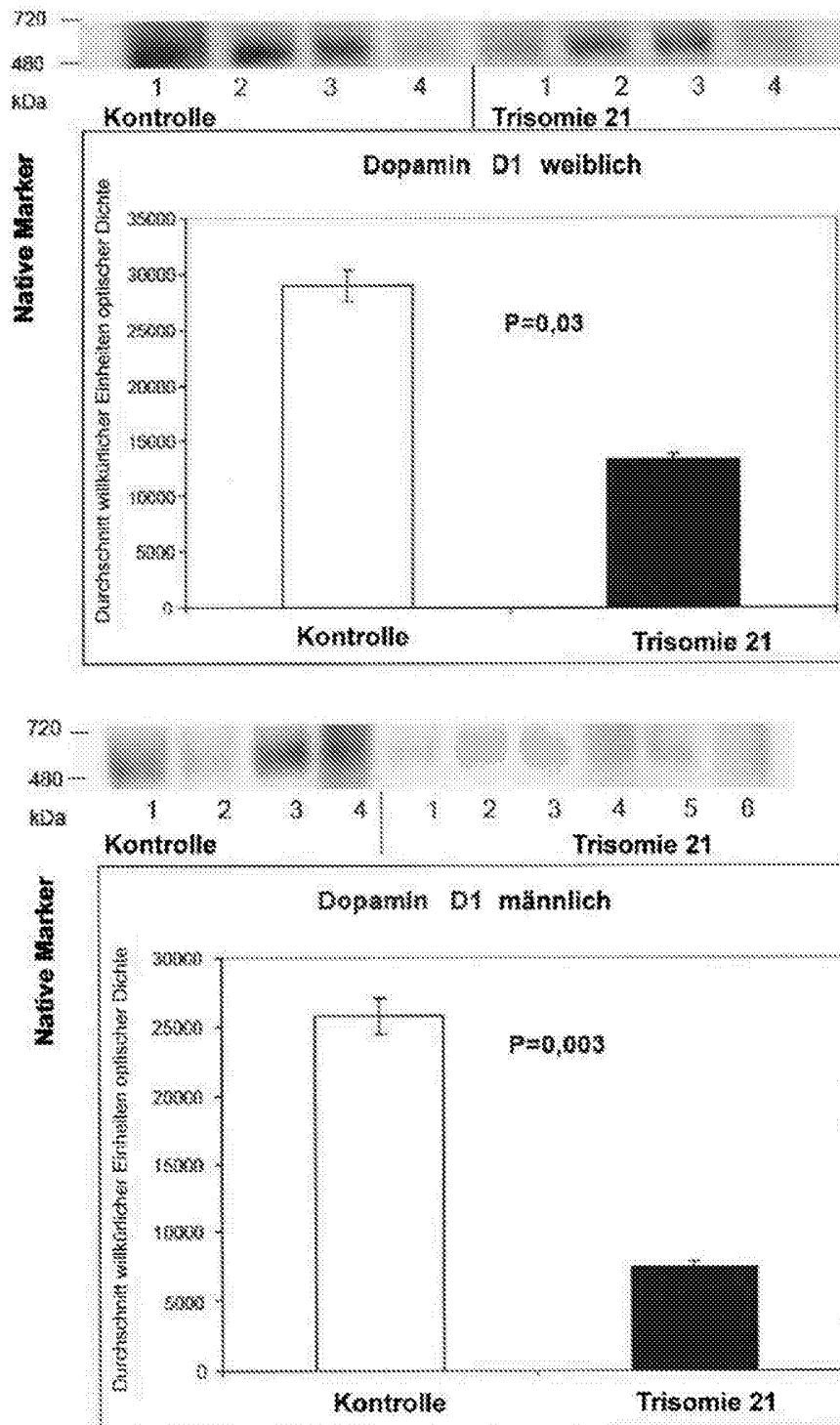
34. Pezze M, Bast T. Dopaminergic modulation of hippocampus- dependent learning: blockade of hippocampal D1-class receptors during learning impairs 1-trial place memory at a 30-min retention delay. *Neuropharmacology*. 2012; 63(4): 710-8.
35. Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. 2011; 63(1): 182-217.
36. Yang SN. Sustained enhancement of AMPA receptor- and NMDA receptor-mediated currents induced by dopamine D1/D5 receptor activation in the hippocampus: an essential role of postsynaptic Ca²⁺. *Hippocampus*. 2000; 10(1): 57-63.
37. Gao C, Sun X, Wolf ME. Activation of D1 dopamine receptors increases surface expression of AMPA receptors and facilitates their synaptic incorporation in cultured hippocampal neurons. *J Neurochem*. 2006; 98(5): 1664-77.
38. Mele A, Castellano C, Felici A, Cabib S, Caccia S, Oliverio A. Dopamine-N-methyl-D-aspartate interactions in the modulation of locomotor activity and memory consolidation in mice. *Eur J Pharmacol*. 1996; 308(1): 1-12.
39. Rios Valentim SJ, Jr., Gontijo AV, Peres MD, Rodrigues LC, Nakamura-Palacios EM. D1 dopamine and NMDA receptors interactions in the medial prefrontal cortex: modulation of spatial working memory in rats. *Behav Brain Res*. 2009; 204(1):124-8.
40. Pei L, Li S, Wang M, Diwan M, Anisman H, Fletcher PJ, et al. Uncoupling the dopamine D1-D2 receptor complex exerts antidepressant- like effects. *Nat Med*. 2010; 16(12): 1393-5.
41. Hasbi A, O'Dowd BF, George SR. Dopamine D1-D2 receptor heteromer signaling pathway in the brain: emerging physiological relevance. *Mol Brain*. 2011; 4: 26.
42. Seeman P, Niznik HB, Guan HC, Booth G, Ulpian C. Link between D1 and D2 dopamine receptors is reduced in schizophrenia and Huntington diseased brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989; 86(24): 10156-60.
43. Maatta T, Tervo-Maatta T, Taanila A, Kaski M, Iivanainen M. Mental health, behaviour and intellectual abilities of people with Down syndrome. *Downs Syndr Res Pract*. 2006; 11(1): 37-43.
44. Asher O, Tanya R, Shula P. Adaptive and Behavioral Development in Children with Down Syndrome at School Age with Special Emphasis on Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD); 2011.
45. Unterberger U, Lubec G, Dierssen M, Stoltenburg- Didinger G, Farreras JC, Budka H. The cerebral cortex in fetal Down syndrome. *J Neural Transm Suppl*. 2003; (67): 159-63.
46. Lebel M, Robinson P, Cyr M. Canadian Association of Neurosciences Review: the role of dopamine receptor function in neurodegenerative diseases. *Can J Neurol Sci*. 2007; 34(1): 18-29.
47. Rinne JO, Rinne JK, Laakso K, Lonnberg P, Rinne UK. Dopamine D-1 receptors in the parkinsonian brain. *Brain Res*. 1985; 359(1-2): 306-10.
48. Tang TS, Chen X, Liu J, Bezprozvanny I. Dopaminergic signaling and striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*. 2007; 27(30): 7899-910.
49. Goldman-Rakic PS, Castner SA, Svensson TH, Siever LJ, Williams GV. Targeting the dopamine D1 receptor in schizophrenia: insights for cognitive dysfunction. *Psychopharmacology (Berl)*. 2004; 174(1): 3-16.
50. Kempainen N, Ruottinen H, Nagren K, Rinne JO. PET shows that striatal dopamine D1 and D2 receptors are differentially affected in AD. *Neurology*. 2000; 55(2): 205-9.

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro Diagnose des Grads der mentalen Behinderung im Zusammenhang mit dem Down-Syndrom (DS) in Hirngewebeproben, **dadurch gekennzeichnet**, dass die vorliegende Menge an Dopaminrezeptor 1-Komplex (DR1-Komplex) bestimmt und mit der in einer Kontrollgewebeprobe vorliegenden Menge verglichen wird, die von einem Individuum erhalten wurde, das nicht an dem DS leidet, wobei eine reduzierte Menge an DR1-Komplex mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Zellen in den Proben homogenisiert sind und Membranfraktionen der Zellen bereitgestellt werden, um die vorliegende Menge an DR1-Komplex in der Probe zu bestimmen.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bestimmung der vorliegenden Menge an DR1-Komplex unter Verwendung von Antikörpern durchgeführt wird, die spezifisch für den DR1-Komplex sind.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bestimmung der vorliegenden Menge an DR1-Komplex unter Anwendung von Immunpräzipitation und/oder Massenspektroskopie erfolgt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, dass die reduzierte Menge an DR1-Komplex im Vergleich zu der Kontrollgewebeprobe um mindestens 30%, bevorzugt um mindestens 40%, insbesondere bevorzugt um mindestens 50% reduziert ist.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, dass zusätzlich zu der vorliegenden Menge an DR-Komplex ebenfalls die vorliegende Menge an mindestens einem aus den nikotinergen Acetylcholinrezeptoren $\alpha 4$ und $\alpha 7$, dem NMDA-Rezeptor NR1 sowie den Rezeptorkomplexen, die AMPA-Rezeptor-GluR1 und GluR3 enthalten, bestimmt und mit der in einer von einem Individuum ohne DS erhaltenen Kontrollgewebeprobe vorliegenden Menge an einem oder mehreren Rezeptorkomplexen verglichen wird, wobei eine reduzierte Menge an mindestens einem oder mehreren Rezeptorkomplexen mit dem Grad der mentalen Behinderung korreliert, sofern die Proben aus weiblichen DS-Gehirnen erhalten wurden.

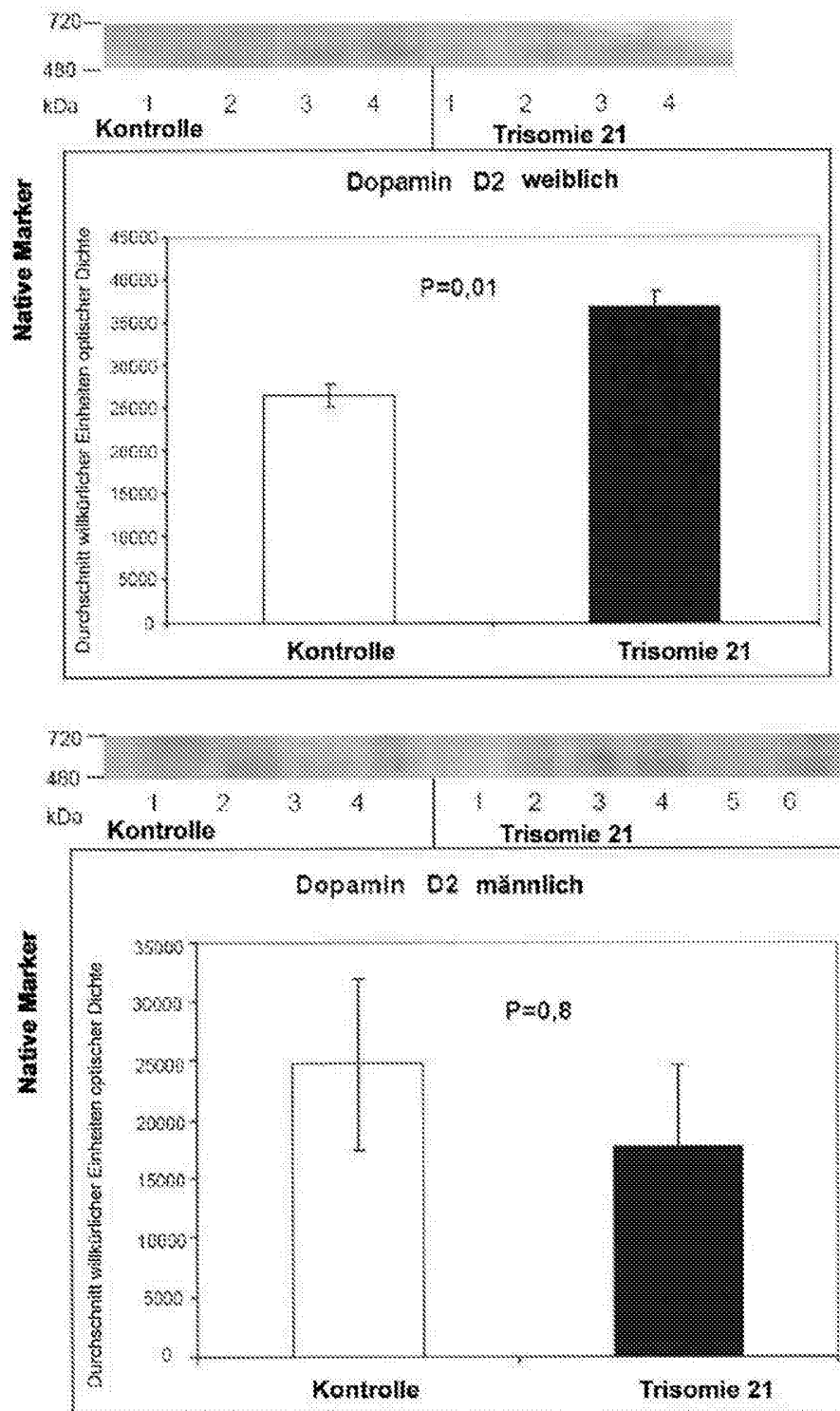
Hierzu 9 Blatt Zeichnungen

1/9



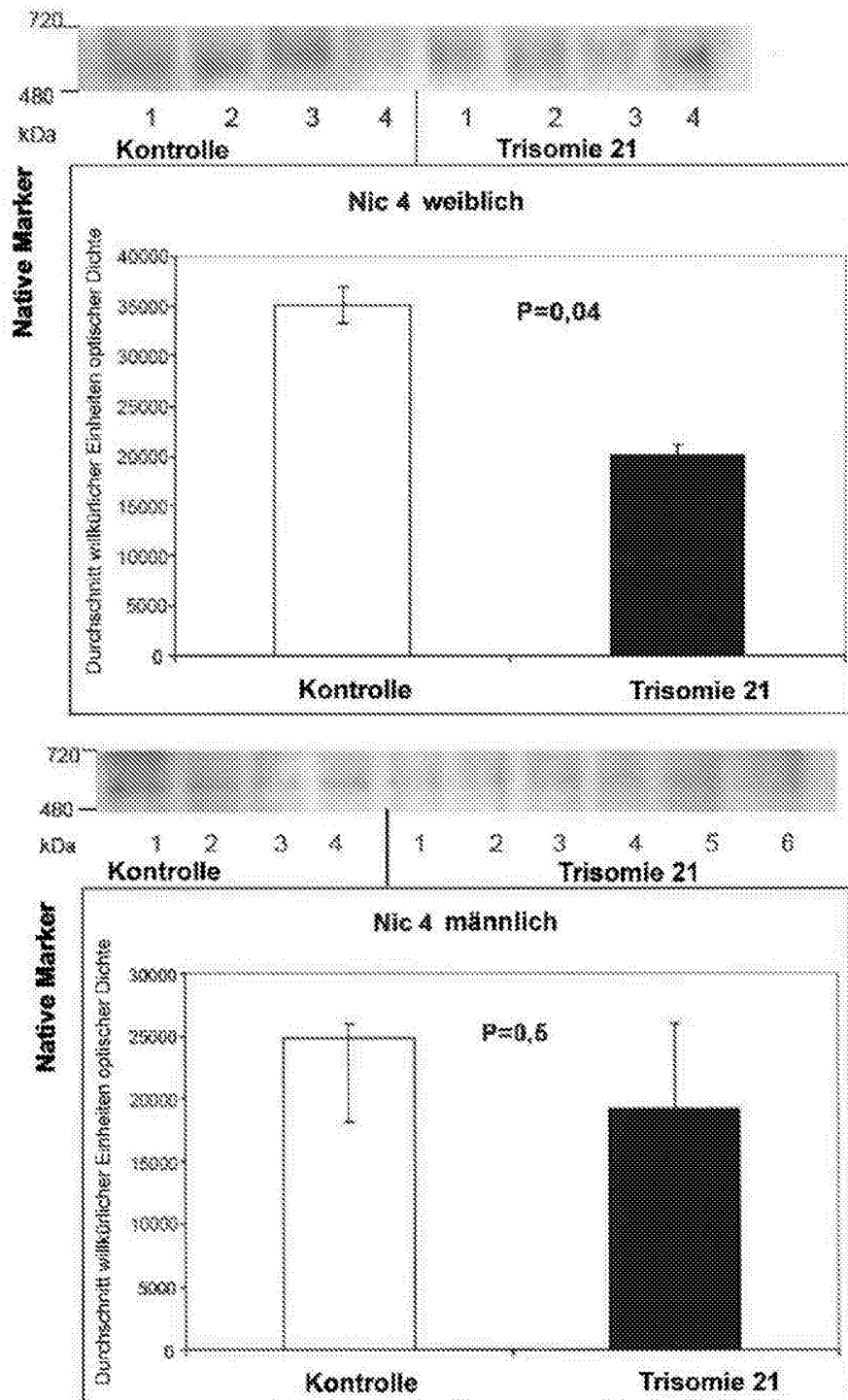
Figur 1A

2/9



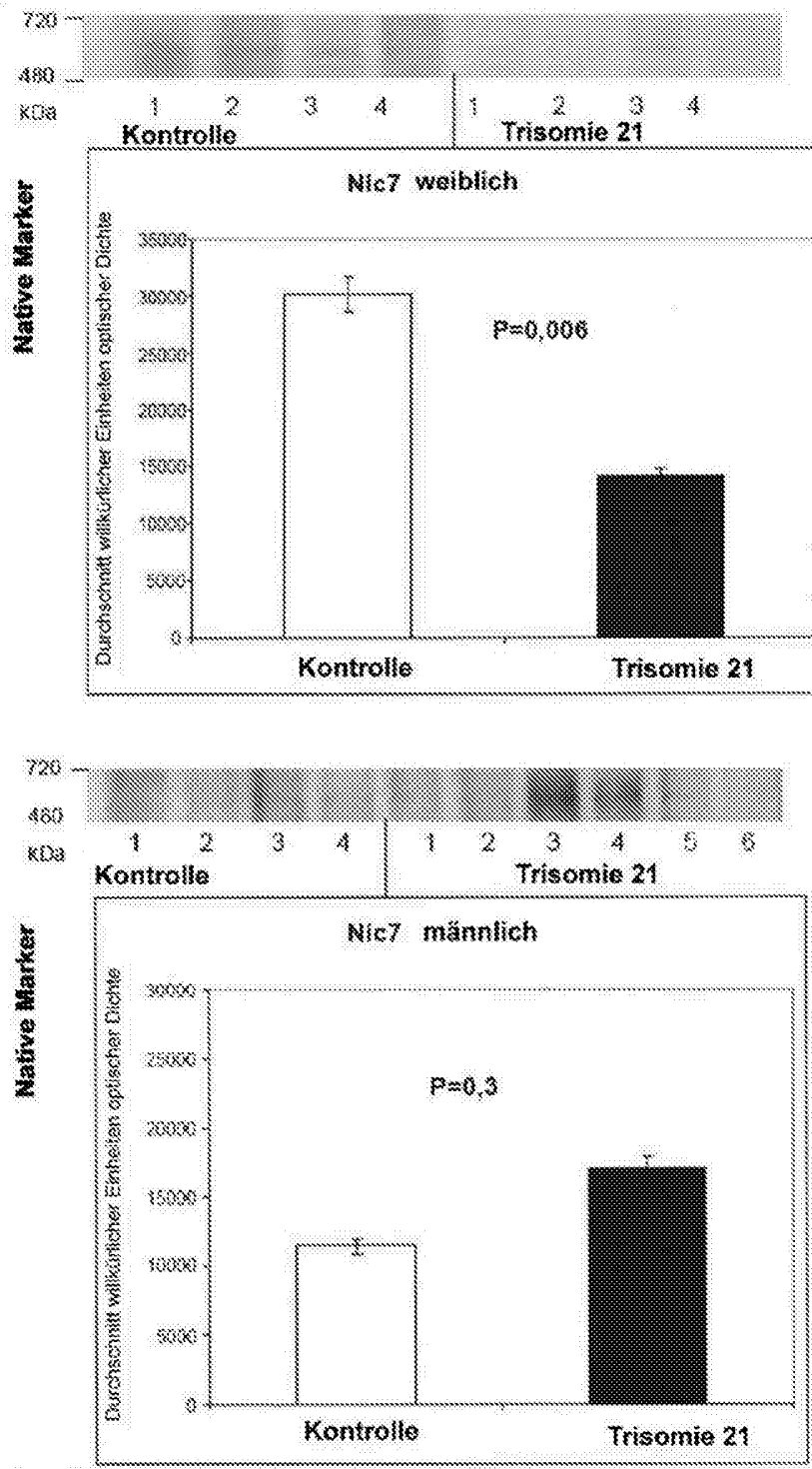
Figur 1B

3/9



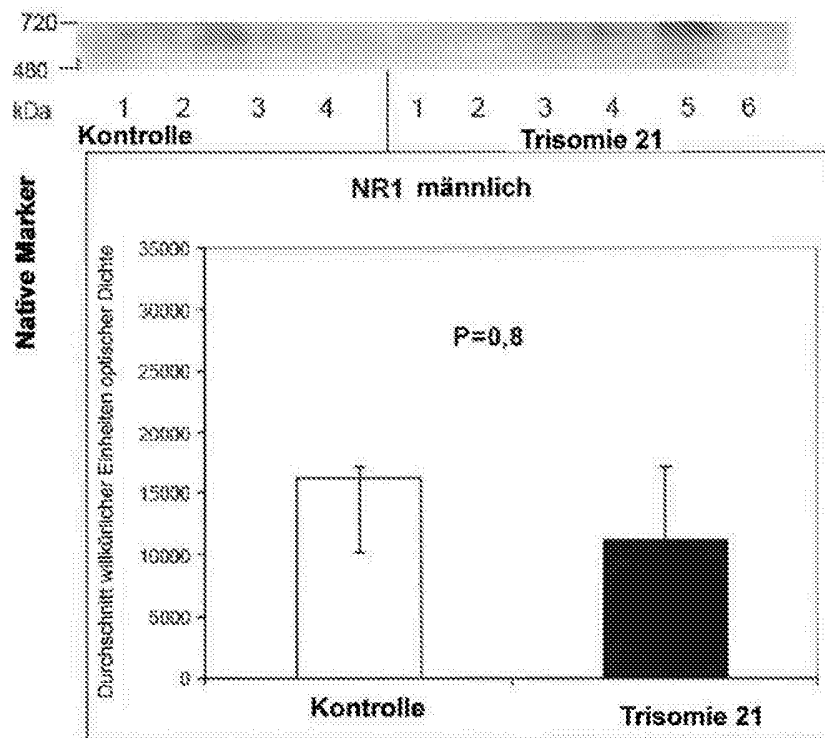
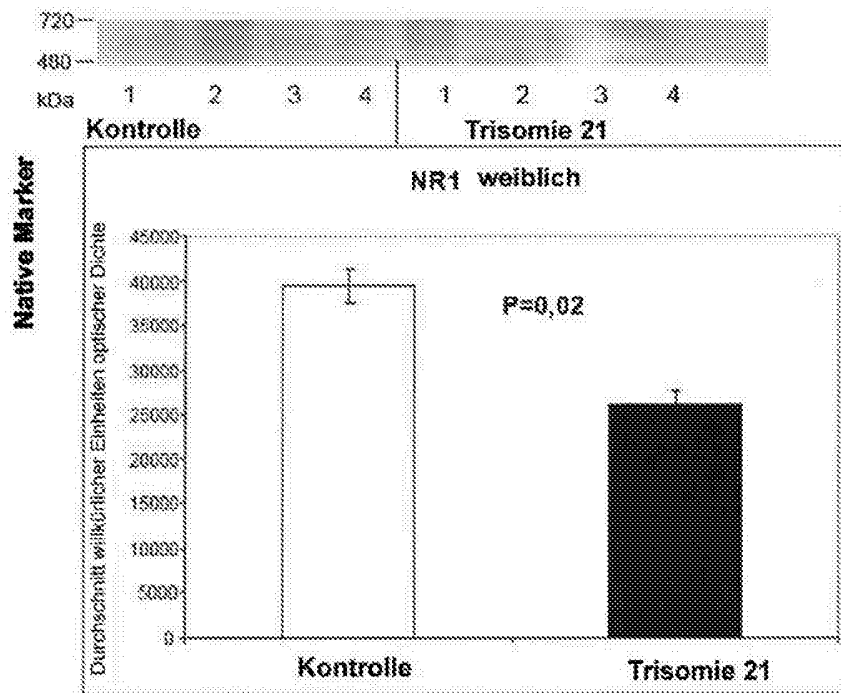
Figur 2

4/9



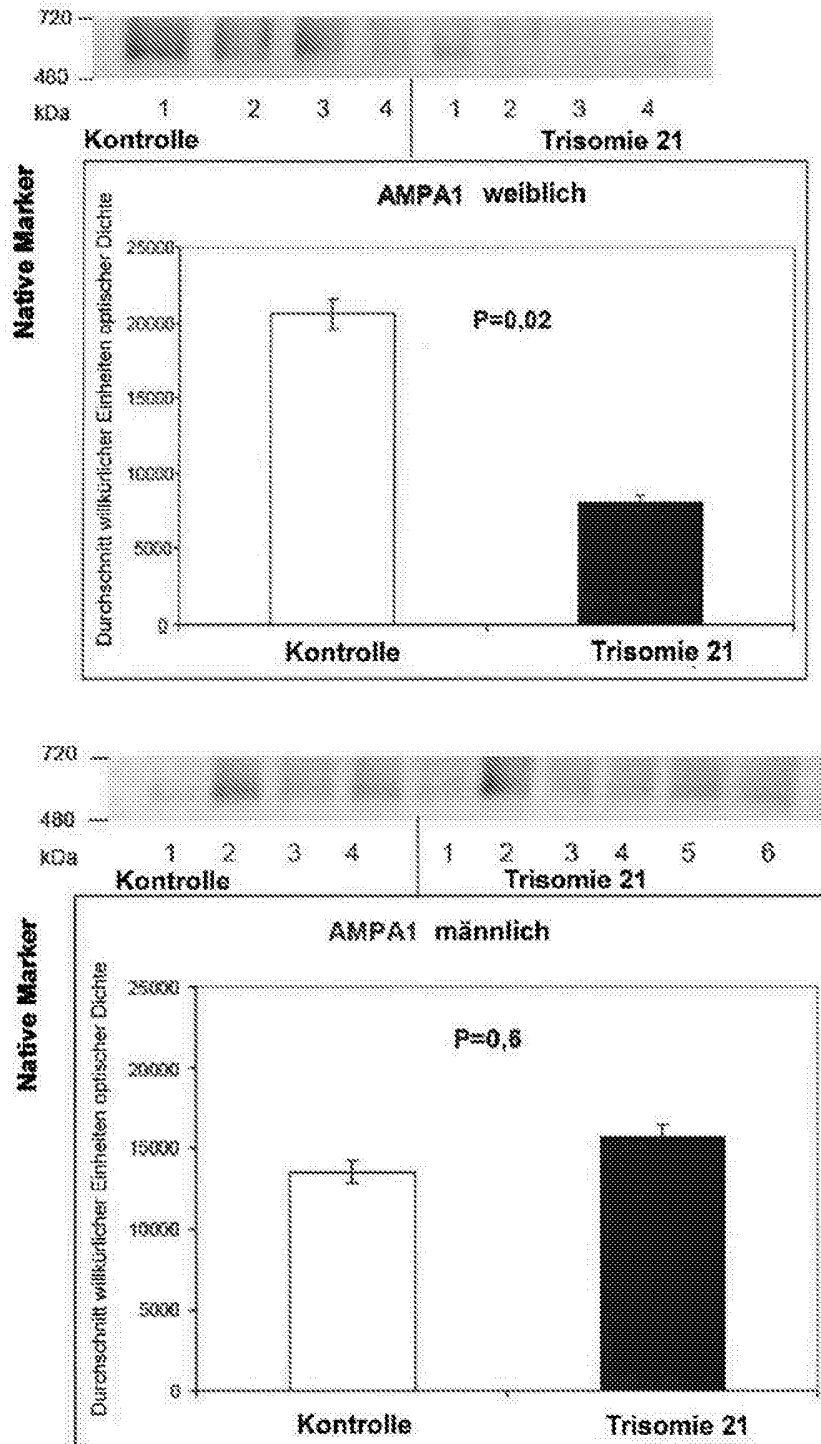
Figur 3

5/9



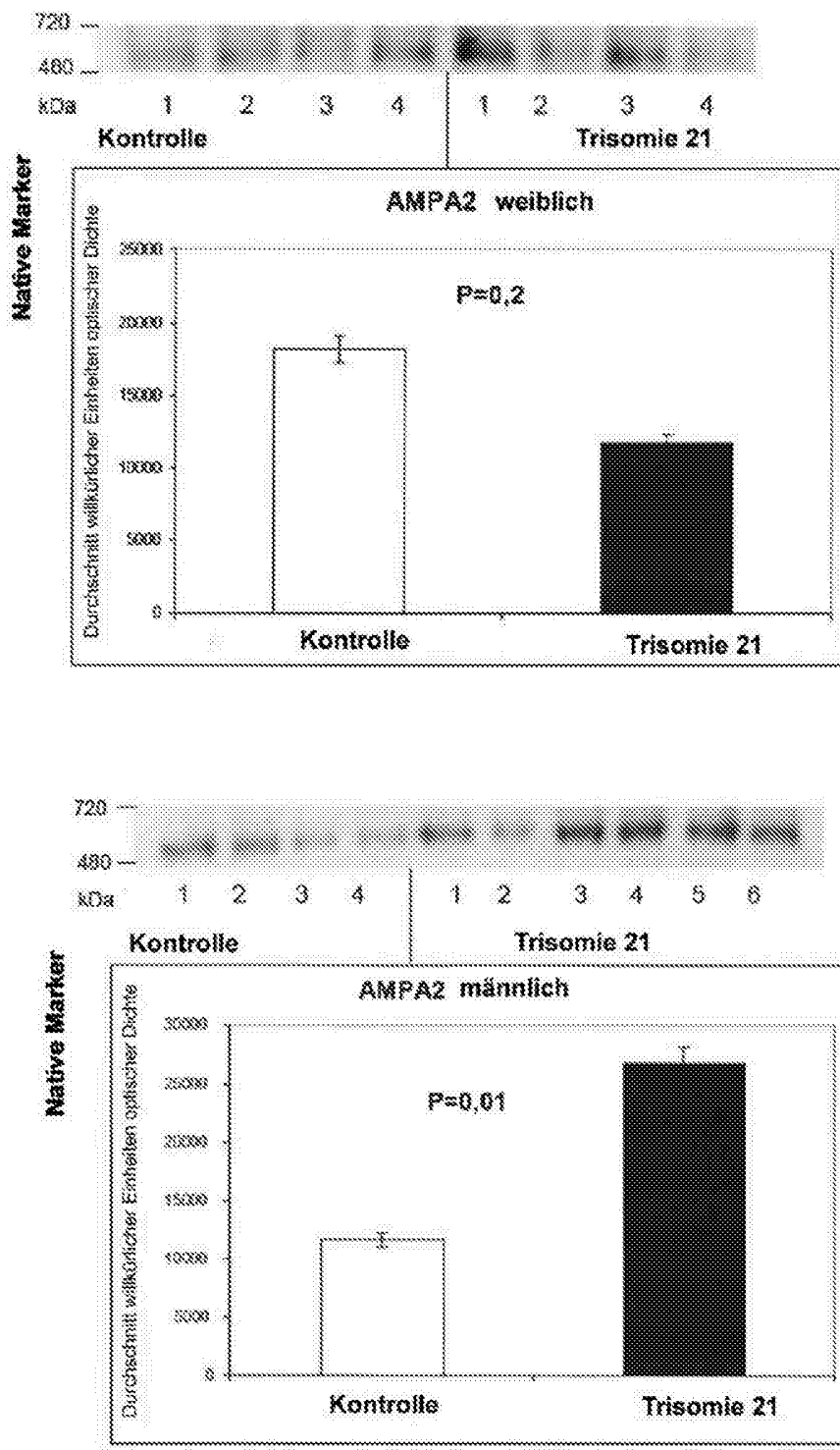
Figur 4

6/9



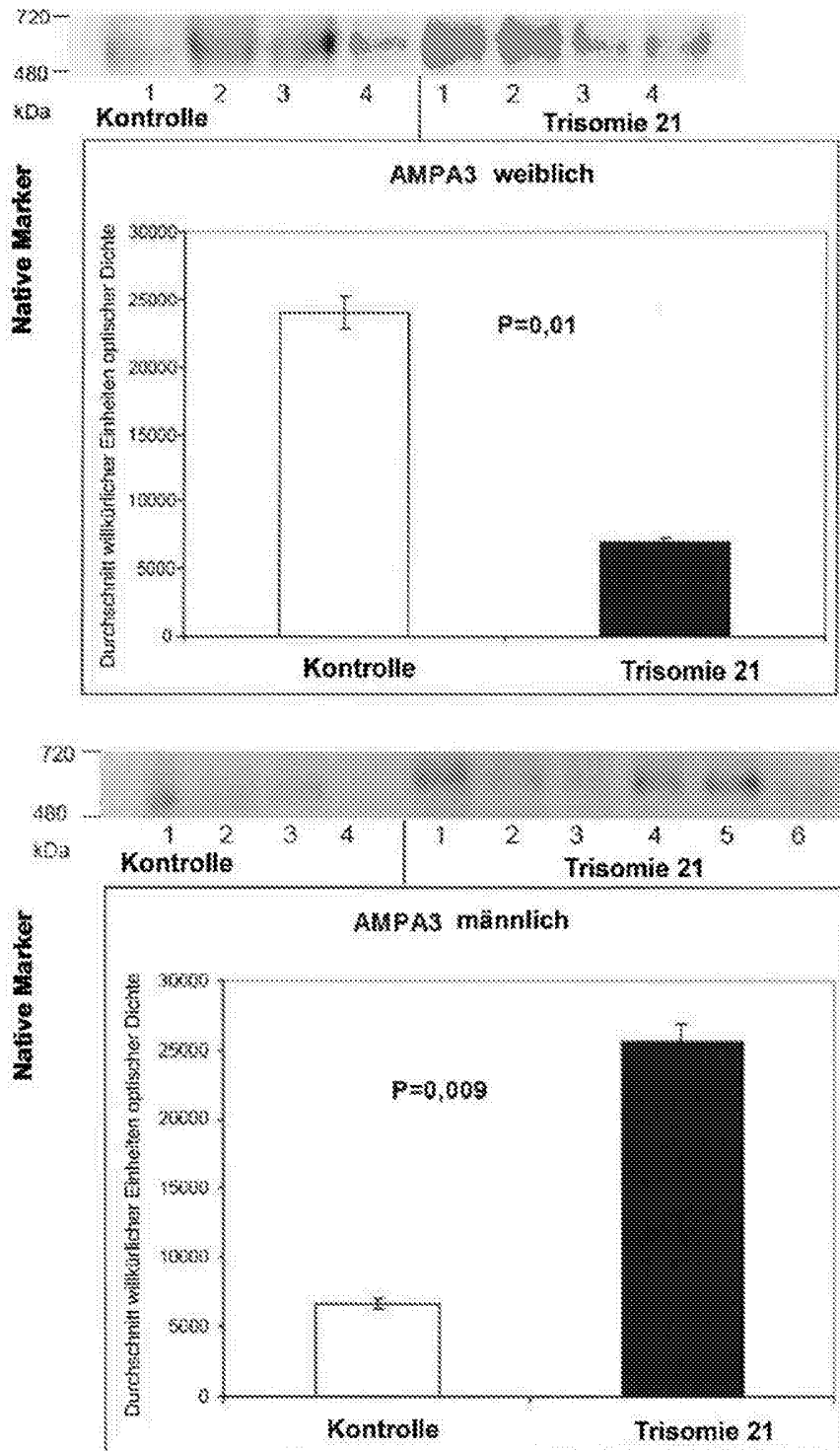
Figur 5

7/9



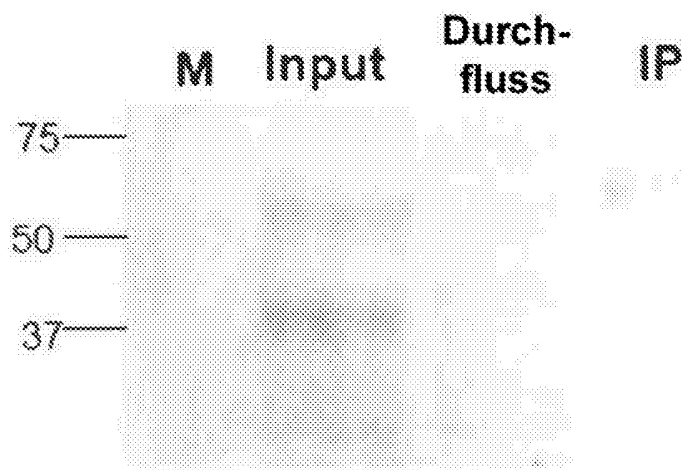
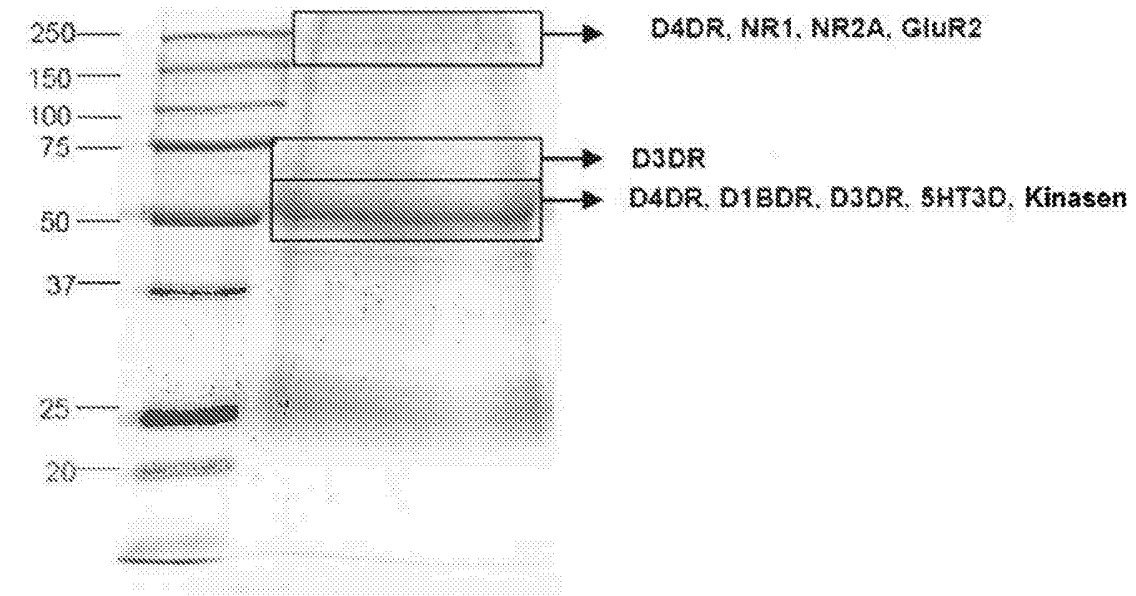
Figur 6

8/9



Figur 7

9/9



Figur 8