

(19)



österreichisches
patentamt

(10)

AT 500 613 A4 2006-02-15

(12)

Österreichische Patentanmeldung

(21) Anmeldenummer:

A 1590/2004

(51) Int. Cl.⁷: **C12Q 1/00**

(22) Anmeldetag:

22.09.2004

C12Q 1/68

(43) Veröffentlicht am:

15.02.2006

(73) Patentanmelder:

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

(72) Erfinder:

LUBEC BARBARA DR.
WIEN (AT)

(54) **VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIZIERUNG NEURODEGENERATIVER STÖRUNGEN**

(57) Ein Verfahren zum Diagnostizieren neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, ist beschrieben, wobei ADAMTS-1 und/oder ADAMTS-5 als Marker-Proteine verwendet werden.

AT 500 613 A4 2006-02-15

Zusammenfassung:

Ein Verfahren zum Diagnostizieren neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, ist beschrieben, wobei ADAMTS-1 und/oder ADAMTS-5 als Marker-Proteine verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Diagnostizieren neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, in einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe.

Neurodegenerative Erkrankungen (neurodegenerative diseases, ND) sind Krankheiten, die die Gehirnfunktion beeinträchtigen und das Bewegungsvermögen eines Patienten beeinträchtigen können und einen Gedächtnisverlust und Demenz verursachen können. Diese Erkrankungen haben auf das Wohlbefinden von Individuen eine signifikante Auswirkung und beeinträchtigen sowohl die Fähigkeit von Individuen, für sich selbst zu sorgen als auch in Unabhängigkeit zu leben und erfordern die Fürsorge und Dienste der Gemeinschaft, in der sie leben. Wegen der zunehmenden Anzahl an Menschen, die an neurodegenerativen Erkrankungen, wie Down-Syndrom (DS), Alzheimer-Krankheit (AD) und Pick-Krankheit (PD) leiden, ist es wichtig, neue therapeutische Ziele und neue Methoden zur Diagnostizierung dieser Erkrankungen in einem frühen Stadium der Entwicklung vorzusehen.

Down Syndrom (DS) ist der häufigste, mit geistiger Behinderung verbundene Geburtsfehler und tritt mit einer Häufigkeit von 1 bei 700-800 Lebendgeburten auf. Es resultiert aus einer Trisomie des Chromosoms 21, wovon 95% freie Trisomien und der Rest Mosaik sind oder eine Translokations-Trisomie 21 aufweisen (Antonarakis, 1998; Epstein, 2001). DS ist mit einer Entwicklungsstörung verbunden, gefolgt von Neurodegenerationsprozessen, von welchen man weiß, dass sie sich in späteren Altersstufen plötzlich einstellen. Diese neurodegenerativen Veränderungen sind durch eine progressive Ansammlung von senilen Plaques und Neurofibrillengewirr gekennzeichnet und treten mit einer ähnlichen regionalen Verteilung wie bei Morbus Alzheimer auf (Wisniewski et al., 1985; Mann, 1988; Cork, 1990).

Die den pathologischen Veränderungen bei DS zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind nicht bekannt, und man weiß auch nicht, ob sie die Entwicklungsstörung reflektieren oder degenerative Prozesse sind. Außerdem wurden, während bestimmte Aspekte der morphologischen Entwicklung der Großhirnrinde bei DS während der Schwangerschaft normal zu sein scheinen, Anomalien in der postnatalen Periode entdeckt (Takashima et al., 1981; Becker et al., 1991). Dies weist darauf hin, dass Abnormitäten höchstwahrscheinlich im letzten Trimester auftreten oder Abnor-

mitäten auch im zweiten Trimester existieren, jedoch in einem unterschwelligen Bereich liegen, um irgendwelche signifikante morphologische Veränderungen zu bewirken.

Zusätzlich zur geistigen Behinderung weisen Individuen mit DS eine Reihe neuropathologischer Merkmale auf, einschließlich einer Verringerung der Gehirngröße, einer abnormen neuronalen Migration, Differenzierung und abnormen Dendriten-Verzweigung. Es ist jedoch noch immer unbekannt, wie drei Kopien normaler Gene am Chromosom-21-Segment zu einer komplexen Stoffwechsel- und Entwicklungsstörung führen können.

DS wird gewöhnlich pränatal durch eine Chromosomen-Analyse der Fötal-Flüssigkeits-Punktierung oder durch (Ultraschall)-morphologische Analyse diagnostiziert. Diese Tests sind jedoch nicht für den Nachweis von Mosaik-Formen des DS geeignet (etwa 2 bis 4%). Gewöhnlich sind alle Zellen des Körpers für Chromosom 21 trisomal. Bei Mosaik-Formen des DS gibt es zwei Zell-Populationen, eine diploide, eine mit Trisomie.

Dieser Mosaik-Zustand kann sich entweder aus einer meiotischen oder einer mitotischen Nondisjunktion ergeben. Bei meiotischer Nondisjunktion findet die Nondisjunktion während der frühen Embryogenese statt, um sowohl 47.+21 und 45.-21 Zell-Populationen zu erzeugen, wobei die monosomen Zellen vermutlich während des embryonalen und fötalen Lebens verloren gehen. Auf Grund einer Analyse des Alters der Mütter zum Zeitpunkt der Geburt wurde geschätzt, dass etwa 20% der phänotypisch erkannten Mosaik-Formen mitotischen Ursprungs sein könnten. Es wurde auch vermutet, dass es mit zunehmendem Alter einen gesteigerten Verlust an Chromosom 21 gibt, was zum vermehrten Auftreten eines geringgradigen Mosaik-Zustands führt. Es kann auch ein Mosaik-Zustand für die anderen Arten von Chromosom-Abnormitäten vorliegen, die zum Vorhandensein eines extra-Chromosoms 21q führen.

Der Nachweis und die Quantifizierung eines Mosaik-Zustands birgt ernste methodologische Probleme, insbesondere wenn der Anteil trisomaler Zellen niedrig ist.

Andere Arten von Veränderungen des Chromosoms 21 (Translokationen, somatische Trisomie 21 in Gehirnzellen, andere Fälle mit Isochromosom 21) stellen auch große Probleme für eine richtige Diagnose dar.

Alzheimer-Krankheit (AD) wurde erstmals im Jahr 1906 von Alois Alzheimer als Erkrankung beschrieben, die die Großhirn-

rinde betrifft. AD ist eine fortschreitende degenerative Krankheit, die das Gehirn beeinträchtigt und das Gedächtnis, das Verhalten und die Intelligenz eines an dieser Krankheit leidenden Individuums beeinflusst, zur Demenz und schließlich zum Tod führt. Heute sind 5% der Bevölkerung im Alter von mehr als 65 Jahren und 20% der Bevölkerung im Alter von mehr als 80 Jahren von AD betroffen, was zeigt, dass infolge des steigenden Durchschnittsalters der Bevölkerung die Anzahl der an AD leidenden Menschen stark zunehmen wird. Routinemäßig wird AD heute mittels Computer-Tomographie und Elektroenzephalographie diagnostiziert.

Die Pick-Krankheit (PD) ist eine Form der Demenz, die durch eine langsam fortschreitende Verschlechterung der sozialen Fähigkeiten und Persönlichkeitsveränderungen zusammen mit einer Beeinträchtigung des Intellekts, des Gedächtnisses und der Sprache gekennzeichnet ist. Obwohl sich die Krankheit bei einzelnen Individuen sehr unterschiedlich auswirkt, gibt es eine gemeinsame Kernsymptomatik, die in verschiedenen Stadien der Erkrankung bei den Patienten vorliegen kann. Zu diesen Symptomen zählen Gedächtnisverlust, Denk- und Konzentrations-Schwierigkeiten und Sprachstörungen. Zu den anderen Symptomen zählen eine allmähliche emotionale Stumpfheit, Verlust der moralischen Urteilsfähigkeit und fortschreitende Demenz. Obwohl die Krankheit üblicherweise Individuen im Alter zwischen 40 und 60 Jahren befällt, kann das Alter des Befalls im Bereich von 20 bis 80 Jahren liegen. Die Patienten weisen typischerweise eine Atrophie des Stirn- und Schläfenlappens des Gehirns auf. Einige Nervenzellen weisen bei Betrachtung unter einem Mikroskop charakteristische Abnormitäten auf. Die Ursache der Krankheit ist unbekannt.

Es gibt jedoch keine Heilung oder spezifische Behandlung für PD. Ihr Fortschreiten kann nicht verlangsamt werden. Trotzdem können einige der Symptome der Krankheit wirksam behandelt werden. Der Verlauf von PD ist eine unvermeidlich fortschreitende Verschlechterung. Die Dauer des Verlaufs ist unterschiedlich und reicht von weniger als 2 Jahren bei einigen bis zu mehr als 10 Jahren bei anderen. Der Tod wird gewöhnlich durch eine Infektion verursacht.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, geeignete Mittel zur Diagnostizierung neurodegenerativer Erkrankungen, vorzugsweise von Down-Syndrom, Alzheimer-Krankheit und Pick-Krankheit vorzusehen. Diese Mittel sollten vorzugsweise zur Dia-

NACHGEREICHT

gnostizierung neurodegenerativer Erkrankungen in einem frühen Krankheitsstadium geeignet sein.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung vor, umfassend die folgenden Schritte:

- Vorsehen einer Probe einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe,
- Bestimmen der Menge an ADAMTS-1 und/oder ADAMTS-5,
- Vergleichen der nachgewiesenen Menge mit einer Standard-Menge des (der) entsprechenden Proteins (Proteine) in einer nicht von einer neurodegenerativen Erkrankung betroffenen Probe, die der Probe einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe entspricht, und
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge unter der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-5 bestimmt wird, oder
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge über der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-1 bestimmt wird.

ADAMTS-1 ist ein Disintegrin und eine Metalloproteinase mit Thrombospondin 1 (TSP1)-artigen Motiven, das ursprünglich als im murinen Colon-26-kachektigenen Tumor stark exprimiertes Gen berichtet wurde (Kuno et al., 1997). Das humane Ortholog wurde METH-1 genannt und beim cDNA-Screenen unter Verwendung des TSP1-anti-angiogenen Motivs als Köder identifiziert (Vázquez et al., 1999).

METH-1/ADAMTS-1 besteht aus einem Signal-Peptid im NH₂-terminalen Ende, was auf ein sezerniertes Protein hinweist, das Zink-Metalloproteinase und Disintegrin/Cystein-reiche Domänen enthält. Die Abstand-Region und die drei TSP-Typ1-Motive, die man im Carboxy-terminalen Ende des Proteins findet, sind für die Verankerung der extrazellulären Matrix verantwortlich (Wei et al., 2002). Das humane pro-METH-1-Protein wird in zwei aufeinander folgenden Stufen prozessiert: zuerst eine Furin-Deletion der N-terminalen Prodomäne, was zu einer 87kDa-Form führt. Im zweiten Schritt entfernen spezifische Metalloproteinasen zwei Thrombospondin-Repeats aus dem C-terminalen Ende, wobei eine 67kDa-Form erzeugt wird, die die Affinität des Heparin-Proteins ändert und somit jeder Form eine andere extrazelluläre Verteilung und anti-angiogene Eigenschaften verleiht (Luque et al., 2003; Rodriguez-Man-

NACHGEREICHT

zaneque et al., 2000).

Die Proteinase-Aktivität von METH-1/ADAMTS-1 wurde durch die Fähigkeit, Komplexe mit dem hoch-affinen Proteinase-Inhibitor $\alpha 2$ -M zu bilden, und durch eine differentielle Inhibition, welche durch die Metalloproteinase-Inhibitoren TIMP2 und TIMP3 (Rodriguez-Manzaneque et al., 2000, Wei et al., 2002) erfolgt, bestätigt. Mindestens zwei Mitglieder der Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan-Familie binden an Hyaluronan, das Knorpel-Aggregan und das weit verbreitete Versican wurden bisher als Substrate für diese Metalloproteinase berichtet (Kuno et al., 2000; Sandy et al., 2001). ADAMTS-1 null-mutierte Mäuse zeigten die Wichtigkeit dieses Enzyms für das normale Wachstum, die Fertilität, Organstruktur und -funktion (Shindo et al., 2000).

Die Expression von ADAMTS-1 wurde vor allem mit RNase-Schutz-Assays (RNase protection assay, RPA) im Epithel der sich entwickelnden Lunge, Pankreas, Niere und einer Untergruppe von Neuronen auf zeitlich eingeschränkte Weise nachgewiesen; die Expression war in adulten Organen stark reduziert (Thai und Iruela-Arispe, 2002). Das Expressionsmuster von METH-1 wurde in humanen adulten und fötalen Geweben mittels Northern-Analyse untersucht, und ein Signal wurde in allen analysierten Geweben nachgewiesen, wobei ein schwaches Signal sowohl im fötalen als auch im adulten Gehirn vorlag (Vázquez et al., 1999). Interessanterweise wurden erhöhte mRNA-Mengen von ADAMTS-1 als Reaktion auf verletzte motorische Neuronen und in Kainate-sensitiven Gehirn-Regionen nach Kainate-Verabreichung bei Ratten nachgewiesen (Sasaki et al., 2001; Yuan et al., 2002).

ADAMTS-5 (Aggrecanase-2) ist ein weiteres Disintegrin und eine Metalloproteinase mit Thrombospondin 1 (TSP1)-artigen Motiven, das auch an der Aggrecan- und Versican-Spaltung beteiligt ist (Apte, 2004; Tortorella et al., 2002). In adulten humanen Geweben, die mit humanen cDNA-Sonden untersucht wurden, wurden mRNA-Mengen in einer Vielfalt von Geweben nachgewiesen, mit einem niedrigen Signal im Gehirn (Hurskainen et al., 1999). METH-1- und ADAMTS-5-Proteine sind das Produkt von Genen, die am Chromosom 21 codiert sind.

Der immunologische Nachweis der Expression der Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5 kann zur Diagnostizierung einer ND verwendet werden. Die Marker für eine neurodegenerative Erkrankung können auch mit anderen, bereits zum Stand der Technik gehörenden Mar-

NACHGEREICHT

kern kombiniert werden (z.B. Österreichische Patentanmeldung A1899/2002 für DS), was zu einem noch leistungsfähigeren Werkzeug zur Diagnostizierung von ND's *in vitro* führt.

Diese Proteine und die Gene dafür sind bereits auf dem Gebiet geoffenbart, z.B. als GenBank-Eintragungen oder als durch Fachleute überprüfte Veröffentlichung oder beides. Hinweise auf diese Proteine oder Gene werden immer als Hinweise auf diese Eintragungen oder Veröffentlichungen angesehen, insbesondere in Bezug auf ihre Aminosäure/Nukleinsäure-Sequenzen (auch im Falle mehr als einer Sequenz-Variation). Es ist klar, dass zur Detektion oder Bestimmung jedes dieser Proteine/Gene nicht nur die Proteine oder Gene (mRNA; cDNA) als ganzes für die vorliegende Erfindung geeignet sind, sondern auch charakteristische Fragmente dieser Proteine oder Gene, solange eine spezifische Bestimmung/Detektion möglich ist.

Die Standardmenge eines Proteins in einer nicht von ND betroffenen Probe kann jede geeignete, z.B. eine gepoolte, Proben-Stammlösung aus gesunden Individuen sein, ein Standard-Wert, der vorzugsweise mit denselben Techniken wie das Detektions-Verfahren für den vorliegenden Test bestimmt wurde, eine Probe, die nur von einem, zwei, drei oder fünf bis zehn nicht von ND betroffenen Individuen entnommen wurde. Bei der Evaluierung, ob eine nachgewiesene Menge über oder unter einer Standardmenge liegt, können übliche Durchschnittsbereiche sowie vernünftige Ausschluss-Werte in Betracht gezogen werden. Beispielsweise kann die ND-Diagnose gegeben sein, wenn die festgestellte Menge mindestens um 20%, vorzugsweise mindestens um 50%, insbesondere 70% unter oder über dem Standard-Wert oder dem Standard-Wert-Bereich liegt. Standard-Werte, Standard-Wert-Bereiche und geeignete Ausschluss-Werte zur Diagnostizierung des „über“ und „unter“ können auch bestimmt und auf Grund zukünftiger Standardisierungs-Komitees verändert werden.

Diese Marker zeigen ihre Marker-Funktion in allen Geweben, da die entsprechenden Proteine ubiquitär exprimiert werden. Geeignete Proben können daher vom Blut oder Serum eines Individuums, aber natürlich auch von jedem beliebigen Gewebe, entnommen werden.

Das Mittel zum Bestimmen der Menge des (der) Proteins (Proteine) ist nicht von entscheidender Bedeutung. Vorzugsweise wird die Menge des (der) Proteins (Proteine) mit einem Verfahren aus-

gewählt aus der Gruppe bestehend aus Protein-Massenspektrometrie, Antikörperbindung, eindimensionaler Gel-Elektrophorese, zweidimensionaler Gel-Elektrophorese oder Kombinationen davon bestimmt werden.

Andererseits kann die Menge der Proteine auch bestimmt werden durch Bestimmen der Menge der mRNA des jeweiligen Proteins. Dies kann vorzugsweise durch Hybridisierungs-Technologie, insbesondere unter Verwendung von DNA-Chips, oder Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden, insbesondere kompetitive PCR, erreicht werden. Für die vorliegende Erfindung soll die cDNA auch als eine mRNA angesehen werden, die mit dem vorliegenden Verfahren bestimmt werden soll.

Das vorliegende Verfahren ist speziell zum Bestimmen einer Mehrzahl der Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet. Daher ist es bevorzugt, gleichzeitig die Menge beider dieser Proteine in der Probe nachzuweisen. Das vorliegende Verfahren kann auch mit anderen Tests kombiniert werden, insbesondere mit anderen Tests, die bei der Diagnose von ND's verwendet werden, z.B. Tests auf metabolische Enzyme oder andere Marker für potentielle genetische und/oder neurodegenerative Defekte.

Vorzugsweise umfasst das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung das Bestimmen der Menge des Proteins unter Verwendung eines Chips, vorzugsweise eines mRNA-Chips oder eines Antikörper-Chips.

Gemäß einem anderen Aspekt sieht die vorliegende Erfindung ein Set zum Bestimmen der Menge von zwei Proteinen in einer Probe vor, wobei die zwei Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5 sind, welches Set umfasst:

- einen Probenbehälter,
- Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine, insbesondere Antikörper, die die Proteine spezifisch erkennen, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine.

Das vorliegende Set enthält vorzugsweise als Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine und als Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte Antikörper.

Vorzugsweise sind die Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert.

Die vorliegende Erfindung umfasst auch ein Set zum Bestimmen

NACHGEREICHT

der Menge der mRNAs von zwei Proteinen in einer Probe, wobei die zwei Proteine ausgewählt sind aus ADAMTS-1 und ADAMTS-5, wobei das Set:

- einen Probenbehälter,
- Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine, insbesondere komplementäre Nukleinsäuren oder Primer, die die mRNAs amplifizieren, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs.

Vorzugsweise enthält das Set gemäß der vorliegenden Erfindung als Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine und als Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs konjugierte, vorzugsweise markierte Nukleinsäuren, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte Nukleinsäuren.

Vorzugsweise sind die Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert.

Die Sets gemäß der vorliegenden Erfindung können gemäß Standard-Protokollen, die an die neuen, von der vorliegenden Erfindung vorgesehen ND-Marker adaptiert sind, hergestellt und entworfen werden.

Die vorliegende Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und Figuren weiter veranschaulicht, ohne jedoch auf diese eingeschränkt zu sein.

Fig. 1. Western-Blot-Analyse für ADAMTS-1 und ADAMTS-5 in der Großhirnrinde vom Gehirn von Individuen, die an DS, AD und PD leiden, und von gesunden Individuen als Kontrollen. Denaturierte Proteine (10 µg) wurden geladen, auf einem homogenen Gel getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Wie in 'Materialien und Methoden' beschrieben, wurden die Membranen mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert, und immunreaktive Banden (ADAMTS-1, 50kDa und 37kDa, ADAMTS-5, 50kDa und 37kDa) wurden unter Verwendung von Chemilumineszenz-Reagentien nachgewiesen.

Fig. 2. Expressionsmengen von ADAMTS-1- und ADAMTS-5-Proteinen. Die Dichte der detektierten Banden wurde gemessen und mittels des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests berechnet, und das Signifikanz-Niveau wurde als $P < 0,05$ festgelegt.

BEISPIEL:

Protein-Mengen von ADAMTS-1 und ADAMTS-5 in Gehirn-Proben von an einer ND leidenden Individuen

Materialien und Methoden

NACHGEREICHT

Gehirnproben

Die Stirnhirnrinde von Patienten mit AD (n=6; sechs, männlich; 59,3 ± 6,4 Jahre alt), DS (n=6; sechs, männlich; 57,8 ± 8,2 Jahre alt), PD (n=4; vier, männlich; 64,25 ± 5,50) und Kontrollen (n= 6; sechs, männlich; 60,2 ± 9,3 Jahre alt) wurde in dieser Studie verwendet. Gehirnproben nach der Autopsie wurden von der MRC London Brain Bank for Neurodegenerative Diseases, Institute of Psychiatry, King's College, UK, Dr. N. Cairns (Krapfenbauer et al., 2003) erhalten. Alle Proben wurden bei -70°C gelagert, und die Gefrierkette wurde niemals unterbrochen.

Antikörper und immunogenes Kontroll-Peptid

ADAMTS-1-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, USA), immunogenes Kontroll-ADAMTS-1-Peptid (Santa Cruz Biotechnology, USA) und ADAMTS-5-Antikörper (Serotec, UK) wurden käuflich erworben. Der Antikörper gegen ADAMTS-1 ist ein Affinitäts-gereinigter polyklonaler Ziegen-Antikörper, erzeugt gegen ein Peptid, das der Nähe des Amino-Terminus von Maus-ADAMTS-1 zugeordnet ist (Santa Cruz Biotechnology, USA). Die Informationen über die Struktur des für die Immunisierung verwendeten Immunogens war vom Anbieter nicht erhältlich. Der Antikörper gegen ADAMTS-5 ist ein Affinitäts-gereinigter polyklonaler Kaninchen-Antikörper, gezogen gegen ein synthetisches Peptid, das dem C-terminalen Bereich von ADAMTS-5 entspricht (Serotec, UK).

Western Blots

Unter flüssigem Stickstoff gemahlene Gewebe der Stirnhirnrinde wurden in Lyse-Puffer 1%SDS, welcher Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) enthielt, homogenisiert, 10 min lang bei 37°C inkubiert, 10 min lang bei 95°C gekocht und 10 min lang bei 8.000xg zentrifugiert. Das BCA-Protein-Test-Set (Pierce, Rockford, Illinois, USA) wurde angewendet, um die Konzentration des Proteins im Überstand zu bestimmen. Die Proben (10 µg) wurden mit dem Proben-Puffer (100 mM Tris-HCl, 2% SDS, 1% 2-Mercaptoethanol, 2% Glycerin, 0,01% Bromphenol-Blau, pH 7,6) gemischt, bei 95°C 15 min lang inkubiert und auf ein homogenes SDS-Gel 12,5% ExcelGel (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) geladen. Die Elektrophorese wurde mit dem Multiphor II Electrophoresis System (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die auf dem Gel separierten Proteine wurden auf eine PVDF-Membran (Millipore, Billerica Massachusetts, USA) transferiert, und die Membra-

nen wurden in Blockierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 und 5% fettfreie Trockenmilch) inkubiert. Die Membranen wurden 2 h lang bei Raumtemperatur mit verdünnten primären Antikörpern: 0,04µg/ml für ADAMTS-1 und 1µg/ml für ADM-TS5, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten mit Blockierungspuffer wurden die Membranen mit sekundären Antikörpern, die mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA), 1 Stunde lang inkubiert. Die Membranen wurden dreimal 10 Minuten lang gewaschen und mit den Western Lightning™ Chemilumineszenz-Reagenzien (PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, Massachusetts, USA) entwickelt (Cheon et al., 2003). Die Spezifität der Immunreaktion beim Immunoblotten wurde durch Blockieren des Antikörpers (0,04µg/ml) mit dem Immunogen (2µg/ml) über Nacht bei 4°C in 500µl TBS getestet.

Statistik

Die Dichte der immunreaktiven Banden wurde mit dem RFLPscan Version 2.1 Software-Programm (Scanalytics, Fairfax, Virginia, USA) gemessen. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test unter Verwendung des GraphPad InStat2-Programms berechnet, und das Signifikanzniveau wurde als $P < 0,05$ angesehen.

Ergebnisse

Die Expressionsmengen von zwei am Chromosom 21 codierten Metalloproteinasen, ADAMTS-1 und ADAMTS-5 bei Gehirnen mit Pick-Krankheit (PD), Alzheimer-Krankheit (AD), Down-Syndrom (DS) und Kontrollen (CO) wurden analysiert.

Ein Komplex aus mehreren immunreaktiven Banden zwischen 50 und 37kDa wurde mit ADAMTS-1-Antikörper erhalten. Die gesamte immunreaktive Dichte der Banden war bei PD zehnfach erhöht ($P=0,0048$), bei AD etwa siebenfach erhöht ($P=0,013$) und bei DS fünffach erhöht ($P=0,0206$), wogegen keine signifikanten Unterschiede zwischen der PD-, AD- und der DS-Gruppe erhalten wurden (Fig. 1 und 2).

Anti-ADMTS-5-Antikörper detektierte zwei Banden bei 50kDa und 37kDa, deren Dichte statistisch zwischen den Gruppen vergleichbar war, deren Dichte jedoch bei DS und AD im Vergleich zur Kontroll-Gruppe verringert war (Fig. 1 und Fig. 2).

Die mehreren Banden könnten einzelne Spleiß-Varianten oder post-translationalen Modifikationen, einschließlich Oxidation,

Glykosylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Nitrosylierung usw., darstellen.

Diskussion

Bei fötalem DS wurden beide Gen-Produkte untersucht, und während ADAMTS-1 höchstwahrscheinlich auf Grund der Entwicklungsstufe nicht nachweisbar war (Thai und Iruela, Arispe, 2002), waren die ADAMTS-5-Mengen Kontrollen vergleichbar (Fernando-Miguel et al., 2004). Daher wurden die ADAMTS-1- und ADAMTS-5-Mengen im adulten Gehirn bestimmt, und in adulten Kontroll-Gehirnen wurden schwache ADAMTS-1-immunreaktive Banden beobachtet. Das wesentliche Ergebnis war, dass die ADAMTS-1-Expression in der DS-Stirnhirnrinde vielfach (etwa fünffach) überexprimiert war. Da adulte DS mit neuropathologischen AD-Kennzeichen aus der vierten Dekade vorlagen, könnten die beobachteten Daten nicht nur DS reflektieren, sondern auch eine AD-bezogene, aberrante Protein-Expression, und daher wurden Gehirne von Patienten mit AD getestet, um diesen Effekt ausschließen zu können. Es zeigte sich, dass AD-Individuen eine vielfache, etwa siebenfache, Überexpression im Vergleich zu Kontrollen aufwiesen. Auch bei einer anderen, zur Demenz führenden neurodegenerativen Erkrankung, PD, fand man erhöhte ADAMTS-1-Mengen. Bei PD-Stirnhirnrinde wurde nachgewiesen, dass die ADAMTS-1-Überexpression etwa zehnfach erhöht war.

Erhöhtes ADAMTS-1 bei neurodegenerativen Erkrankungen kann daher als spezifisch angesehen werden. Die Expressionsmengen dürfen nicht durch Unterschiede in der postmortalen Zeit oder im Alter durcheinander gebracht werden, da die lineare Regressionsanalyse keine signifikanten Korrelationen offenbarte. Die Spezifität des verwendeten ADAMTS-1-Antikörpers wurde durch das Ergebnis einer verringerten Intensität von Banden, die nach einer Peptid-Neutralisations-Kontrolle erhalten wurden, aufgezeigt.

Es wurde angenommen, dass ADAMTS-1 und ADAMTS-5 identische Funktionen ausüben, d.h. Spaltung mehrerer Proteoglykane einschließlich Agrecan, Versican und Brevican, und daher ergibt sich die Frage, warum nur ADAMTS-1 bei Neurodegeneration erhöht war. Eine Erklärung ist die Substrat-Spezifität im Gehirn, die bisher noch unbekannt ist, obwohl der Abbau von Agrecan durch beide ADAMTS-Formen beschrieben wurde (Rodríguez-Manzanares et al., 2002; Tortorella et al., 2002). Es sind jedoch keine Informationen über eine Kompartimentalisierung oder eine Zellen-spe-

zifische Verteilung im Gehirn verfügbar, die bei der Interpretation der Ergebnisse behilflich sein könnten. Die Lokalisierung in motorischen Neuronen und die Stimulierung von ADAMTS-1 durch Interleukin IL-1 alpha wurde jedoch berichtet, und dies weist auf einen tentativen Mechanismus hin (Sasaki et al., 2001): Grimaldi und Mitarbeiter zeigten die starke Verbindung zwischen IL-1-alpha und Amyloid-beta-Ablagerung bei AD (Grimaldi et al., 2000). Dies würde auf eine Beteiligung einer Nervenentzündungsreaktion hindeuten, die bereits beschrieben wurde und ein in weitem Umfang angenommenes Konzept bei der Neurodegeneration ist (Floyd, 1999).

Die abnorme Ansammlung potentieller Substrate (Chondroitinsulfat-proteoglykane) für ADAMTS-1 und ADAMTS-5 wurde in senilen Plaques von AD gezeigt: De Witt und Mitarbeiter (1993) berichteten, dass Chondroitin-4-Sulfat sowohl in senilen Plaques als auch in neurofibrillären Tangles bei AD, und Chondroitin-6-Sulfat bei neurofibrillären Tangles und im Bereich um senile Plaques herum gefunden wurde (Witt et al., 1993). Díaz-Nido et al. (2002) machten eine Überprüfung und den Vorschlag, dass mehrere Glycosaminoglykane, einschließlich Chondroitinsulfat, für eine Begünstigung der β -Amyloid-Polymerisation in vitro und in vivo eine Rolle spielen, und tatsächlich wurde berichtet, dass Chondroitin und Heparan-Sulfat-Proteoglykane an Stellen einer β -Amyloid-Ablagerung im Gehirn von Patienten mit AD lokalisierbar sind (Castillo et al., 1999; Snow et al., 1988) und dass die Steigerung der Proteoglycan-abbauenden Enzyme ein Mechanismus sein könnte, um der überschüssigen β -Amyloid-Polymerisation und Ablagerung bei AD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen entgegenzuwirken (Díaz-Nido et al. 2002).

Insgesamt wurde die vielfache Steigerung der Metalloproteinase ADAMTS-1 im Gehirn von Patienten mit Neurodegeneration aufgezeigt. Dagegen zeigte es sich, dass ADAMTS-5, das zusammen mit ADAMTS-1 auf dem Chromosom 21 codiert ist, bei ND-Gehirnen verringert ist. Somit konnten neue Marker-Proteine zur Identifizierung der Neurodegeneration identifiziert werden, die auch als potentielle pharmazeutische Ziele dienen könnten.

Literaturstellen:

- Antonarakis SE (1998) *Genomics* 51, 1-16
- Apte S.S., (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36:981-985.
- Becker, L. E., et al., 1991. In: Epstein, C., J., (Ed.), *The morphogenesis of Down syndrome*, Wiley-Liss, New York, S. 133
- Castillo G.M., Lukito W., Wight T.N. und Snow A.D., (1999) *J. Neurochem.* 72:1681-1687.
- Cheon M.S., Kim S.H., Yaspo M.L., Blasi F., Aoki Y., Melen K. und Lubec G., (2003) *Amino Acids* 24:111-117.
- Cork, LC (1990) *Am. J. Genetics* 7 [Suppl], 282-286
- Epstein CJ (2001). Down syndrome. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (Hrg.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Bd 1. McGraw Hill, Inc., New York, S. 1223-1256.
- De Witt D.A., Silver J., Canning D.R. und Perry G., (1993) *Exp. Neurol.* 121:149-152.
- Díaz-Nido J., Wandosell F. und Avila J., (2002) *Peptides* 23:1323-1332.
- Ferrando-Miguel R., Shim K.S., Cheon M.S., Gimona M., Furuse M. and Lubec G., (2004) *Neuroembryol.* In Druck befindlich
- Floyd R.A., (1999) *Free Radic. Biol. Med.* 26:1346-55.
- Grimaldi L.M., Casadei V.M., Ferri C., Veglia F., Licastro F., Annoni G., Biunno I., De Bellis G., Sorbi S., Mariani C., Canal N., Griffin W.S. und Franceschi M., (2000) *Ann Neurol.* 47:361-365.
- Hurskainen T.L., Hirohata S., Seldin M.F. und Apte S.S., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:25555-25563.
- Krapfenbauer K., Engidawork E., Cairns N., Fountoulakis M. und Lubec G., (2003) *Brain Res.* 967:152-160.
- Kuno K., Kanada N., Nakashima E., Fujiki F., Ichimura F. und Matsushima K., (1997) *J. Biol. Chem.* 272:556-562.
- Kuno K., Okada Y., Kawashima H., Nakamura H., Miyasaka M., Ohno H. und Matsushima K., (2000) *FEBS Lett.* 478:241-245.
- Luque A., Carpizo D.R. und Iruela-Arispe M.L., (2003) *J. Biol. Chem.* 278:23656-23665.
- Mann, D. M. M. (1988) *Mech. Aging Dev.* 43, 99-136
- Rodríguez-Manzaneque J.C., Milchanowski A.B., Dufour E.K., Leduc R. und Iruela-Arispe M.L., (2000) *J. Biol. Chem.* 275:33471-33479.

- Rodríguez-Manzaneeque J.C., Westling J., Thai S.N.M., Luque A., Knauper V., Murphy G., Sandy J.D. und Iruela-Arispe M.L., (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 293:501-508.
- Sandy J.D., Westling J., Kenagy R.D., Iruela-Arispe M.L., Verscharen C., Rodríguez-Manzaneeque J.C., Zimmermann D.R., Lemire J.M., Fischer J.W., Wight T.N. und Clowes A., (2001) *J. Biol. Chem.* 276:13372-13378.
- Sasaki M., Seo-Kiryu S., Kato R., Kita S. und Kiyama H., (2001) *Mol. Brain Res.* 89:158-163.
- Shindo T., Kurihara H., Kuno K., Yokoyama H., Wada T., Kurihara Y., Imai T., Wang Y., Ogata M., Nishimarsu H., Moriyama N., Ohashi Y., Morita H., Ishikawa T., Nagai R., Yazaki Y. und Matsushima K., (2000) *J. Clin. Invest.* 105:1345-1352.
- Snow A.D., Mar H., Noehlin D., Kimta K., Kato M., Suzuki S., Hassell J. und Wight T.N., (1988) *Am J. Pathol* 133:456-463.
- Thai S.N.M. und Iruela-Arispe M.L., (2002) *Mech. Dev.* 115:181-185.
- Takashima, S., et al., 1981. *Brain Res.* 225, 1-21
- Tortorella M.D., Liu R.Q., Burn T., Newton R.C. und Amer E., (2002) *Matrix Biol.* 21:499-511.
- Vázquez F., Hastings G., Ortega M.A., Lane T.F., Oikemus S., Lombardo M. und Iruela-Arispe M.L., (1999) *J. Biol. Chem.* 274:23349-23357.
- Wei P., Zhao Y., Zhuang L., Hurst D.R., Ruben S. und Sang Q.A., (2002) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 293:478-488.
- Wisniewski, K. E., et al., (1985) *Ann. Neurol.* 17: 278-282
- Yuan W., Matthews R.T., Sandy J.D. und Gottschall P.E., (2002) *Neuroscience* 114:1091-1101.

Patentansprüche:

1. Verfahren zum Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, umfassend die folgenden Schritte:

- Vorsehen einer Probe einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe,
- Bestimmen der Menge an ADAMTS-1 und/oder ADAMTS-5,
- Vergleichen der nachgewiesenen Menge mit einer Standard-Menge des (der) entsprechenden Proteins (Proteine) in einer nicht von einer neurodegenerativen Erkrankung betroffenen Probe, die der Probe einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe entspricht, und
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge unter der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-5 bestimmt wird, oder
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge über der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-1 bestimmt wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe Blut oder Serum eines Individuums ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des (der) Proteins (Proteine) mit einem Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Protein-Antikörperbindung, eindimensionaler Gel-Elektrophorese, zweidimensionaler Gel-Elektrophorese, Massenspektrometrie oder Kombinationen davon bestimmt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der für ADAMTS-1 oder ADAMTS-5 codierenden RNA bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des (der) Proteins (Proteine) gleichzeitig in der Probe bestimmt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des Proteins unter Verwendung eines

NACHGEREICHT

Chips, vorzugsweise eines mRNA-Chips oder eines Antikörper-Chips, bestimmt wird.

7. Set zum Bestimmen der Menge von zwei Proteinen in einer Probe, wobei die zwei Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5 sind, welches Set umfasst:

- einen Probenbehälter,
- Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine, insbesondere Antikörper, die die Proteine spezifisch erkennen, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine.

8. Set nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte Antikörper, sind.

9. Set nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Nachweisen der zwei Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

10. Set zum Bestimmen der Menge der mRNAs von zwei Proteinen in einer Probe, wobei die zwei Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5 sind, welches Set umfasst:

- einen Probenbehälter,
- Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine, insbesondere komplementäre Nukleinsäure oder Primer, die die mRNAs amplifizieren, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs.

11. Set nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs konjugierte, vorzugsweise markierte Nukleinsäuren, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte Nukleinsäuren, sind.

12. Set nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Mittel zum Nachweisen der mRNAs der beiden Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

Fig. 1

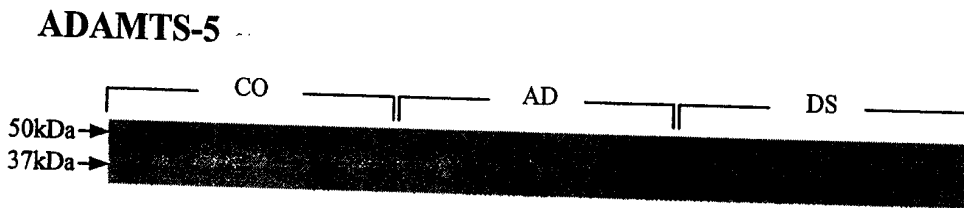
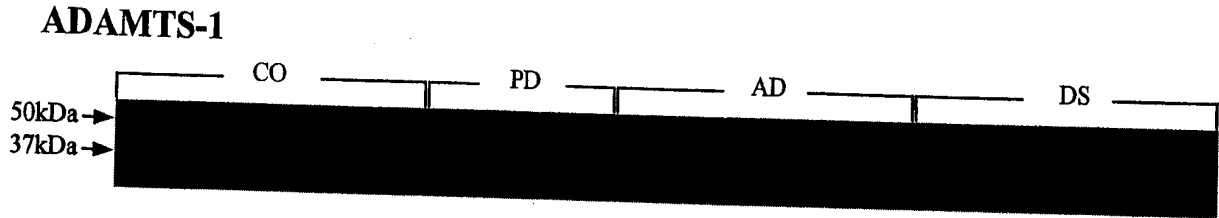
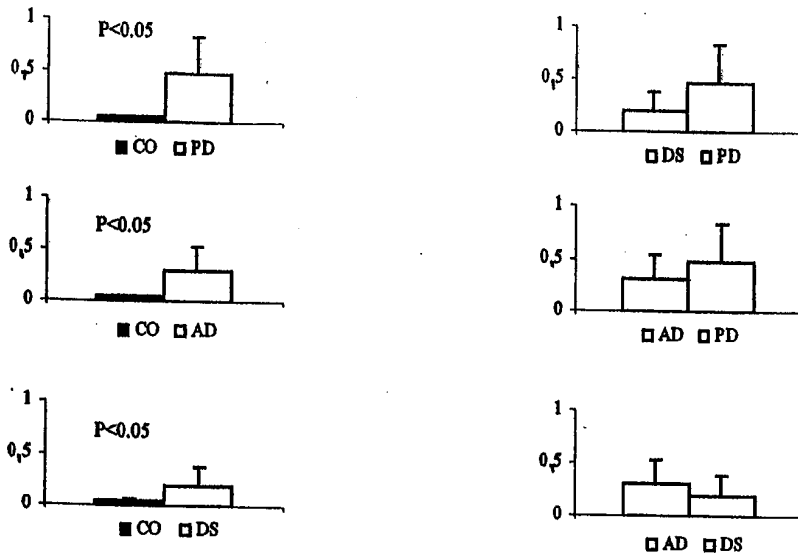


Fig. 2

Dichte von ADAMTS-1, Gesamt-Immunreaktivität (willkürliche Einheit)

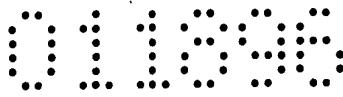


Dichte von ADAMTS-5, 37kDa-Bande (willkürliche Einheit)



Dichte von ADAMTS-5, 50kDa-Bande (willkürliche Einheit)





(Neue) Patentansprüche:

1. Verfahren zum Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, umfassend die folgenden Schritte:

- Vorsehen einer Probe einer Körperflüssigkeit oder einer Gewebeprobe,
- Bestimmen der Menge an ADAMTS-1 und/oder ADAMTS-5,
- Vergleichen der nachgewiesenen Menge mit einer Standard-Menge des (der) entsprechenden Proteins (Proteine) in einer nicht von einer neurodegenerativen Erkrankung betroffenen Probe, die der Probe einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe entspricht, und
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge unter der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-5 bestimmt wird, oder
- Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, wenn die nachgewiesene Menge über der Standard-Menge liegt, wenn die Menge an ADAMTS-1 bestimmt wird.

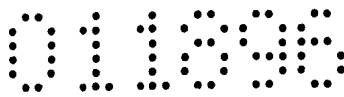
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe Blut oder Serum eines Individuums ist.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des (der) Proteins (Proteine) mit einem Verfahren ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Protein-Antikörperbindung, eindimensionaler Gel-Elektrophorese, zweidimensionaler Gel-Elektrophorese, Massenspektrometrie oder Kombinationen davon bestimmt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge der für ADAMTS-1 oder ADAMTS-5 codierenden RNA bestimmt wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des (der) Proteins (Proteine) gleichzeitig in der Probe bestimmt wird.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Menge des Proteins unter Verwendung eines



Chips, vorzugsweise eines mRNA-Chips oder eines Antikörper-Chips, bestimmt wird.

7. Set zum Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit umfassend:

- einen Probenbehälter,
- Biomolekül zum Nachweisen der Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5, insbesondere Antikörper, die diese Proteine spezifisch erkennen, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine.

8. Set nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül zum Nachweisen der Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenzmarkierte Antikörper, sind.

9. Set nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül an einer festen Oberfläche immobilisiert ist.

10. Set zum Diagnostizieren einer neurodegenerativen Erkrankung, vorzugsweise Down-Syndrom, Alzheimer- und Pick-Krankheit, umfassend:

- einen Probenbehälter,
- Biomolekül zum Nachweisen der mRNAs der Proteine ADAMTS-1 und ADAMTS-5, insbesondere komplementäre Nukleinsäure oder Primer, die die mRNAs zu amplifizieren vermögen, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs.

11. Set nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül zum Nachweisen der mRNAs der Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen mRNAs konjugierte, vorzugsweise markierte Nukleinsäuren, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenzmarkierte Nukleinsäuren, sind.

12. Set nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Biomolekül an einer festen Oberfläche immobilisiert ist.