

(12)

Patentschrift

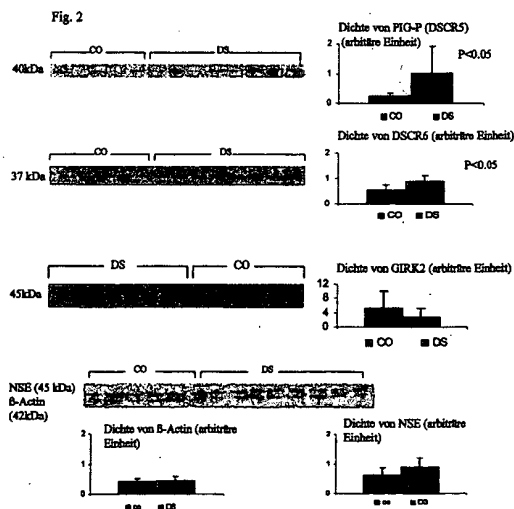
(21) Anmeldenummer: A 2103/2003 (51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/68**
(22) Anmeldetag: 2003-12-30 **G01N 33/68**
(43) Veröffentlicht am: 2006-02-15

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

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

(54) VERFAHREN ZUR DIAGNOSE DES DOWN-SYNDROMS

(57) Ein Verfahren zum Diagnostizieren von Down Syndrom ist beschrieben, bei welchem mindestens eines von Phosphoinositidglykan-Peptid FIG-P (DSCR5), Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region und einwärts-gleichrichtendem Kalium-Kanal-Protein KIR3.2 (GIRK2) als Marker-Proteine verwendet wird.



Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnostizierung von Down Syndrom in einer Körperflüssigkeits- oder Gewebeprobe.

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 Abnormitäten 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 sind. 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.

Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, geeignete Mittel für die Diagnose des Down Syndroms vorzusehen. Diese Mittel sollten vorzugsweise für eine frühe pränatale Diagnose

geeignet sein.

Daher sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Diagnostizieren von Down Syndrom vor, welches die folgenden Schritte umfasst:

5

- Vorsehen einer Amnionflüssigkeitsprobe, einer Blut- oder Serumprobe einer schwangeren Frau oder einer Gehirn-Gewebeprobe,
- Bestimmen der Menge mindestens eines der Proteine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5) (Swiss-Prot Nr. P57054), dem Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region (Down Syndrome Critical Region Protein) (Swiss-Prot Nr. P57055), und dem einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Protein (Potassium Inwardly-Rectifying Channel Protein) KIR3.2 (GIRK2) (Swiss-Prot Nr. P48051),
- Vergleichen der nachgewiesenen Menge mit einer Standard-Menge des (der) entsprechenden Proteins (Proteine) in einer nicht-Down-Syndrom-Probe, die der Probe einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe entspricht, und
- Diagnostizieren von Down Syndrom, wenn die nachgewiesene Menge unter der Standard-Menge liegt, wenn die Menge des einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Proteins KIR3.2 (GIRK2) bestimmt wird, oder
- Diagnostizieren von Down Syndrom, wenn die nachgewiesene Menge über der Standard-Menge liegt, wenn die Menge des (der) Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5)-Proteins (-Proteine) oder des Proteins DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region bestimmt wird.

10

15

20

Nur drei von sieben untersuchten Proteinen der Down Syndrom-kritischen Region (DSCR) zeigen eine aberrante Expression in einer DS-Probe im Vergleich zu einer nicht-DS-Probe. Dies ist ein unerwartetes Ergebnis, da es ein in weiten Kreisen angenommenes Konzept ist, dass der DS-Phänotyp eine Folge einer gesteigerten Expression als Ergebnis der Verdreifachung der Down Syndrom-kritischen Region ist (Mao et al., 2003). Der immunologische Nachweis der Expression der Proteine in dieser Region, einschließlich DSCR5, DSCR6 und KIR3.2, kann zur Diagnostizierung von DS verwendet werden. Die DS-Marker können auch mit anderen, bereits zum Stand der Technik gehörenden Markern kombiniert werden, was ein noch besseres Werkzeug für die Diagnostizierung von DS in vitro ergibt.

25

30

Diese Proteine und die Gene dazu sind bereits im Stand der Technik geoffenbart, z.B. als Gen-Bank-Eintragungen oder als von Fachleuten überprüfte Veröffentlichung oder beides. Ein Hinweis auf diese Proteine oder Gene wird immer als Hinweis auf diese Eintragungen oder Veröffentlichungen angesehen, insbesondere im Hinblick auf ihre Aminosäure/Nukleinsäure-Sequenzen (auch im Fall von mehr als einer Sequenz-Variation). Es ist klar, dass für den Nachweis oder die 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/ein spezifischer Nachweis möglich ist.

35

40

Die Standard-Menge eines Proteins in einer nicht-DS-Probe kann z.B. aus einer gepoolten Proben-Stammlösung von gesunden Individuen, einer von einem, zwei, drei oder fünf bis zehn nicht-DS-Individuen genommenen Probe bestimmt werden, wobei die Standard-Menge vorzugsweise mittels derselben Technik bestimmt wird wie die Proteinmenge in einer Probe gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren. Bei der Evaluierung, ob eine nachgewiesene Menge über oder unter einer Standard-Menge liegt, können übliche Durchschnittsbereiche sowie vernünftige Ausschluss-Werte in Betracht gezogen werden. Beispielsweise kann die DS-Diagnose erstellt werden, wenn die bestimmte Menge mindestens 20%, vorzugsweise mindestens 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 „darüber“ und „darunter“ können auch infolge zukünftiger Standardisierungs-Komitees bestimmt und verändert werden.

45

50

55

Fötale Zellen sind im Blut der Mutter vorhanden. Geeignete Proben können daher vom Blut oder Serum einer schwangeren Frau entnommen werden.

5 Natürlich ist das vorliegende Verfahren auch zum Analysieren von mittels Amniozentese entnommenen Proben geeignet. Fötal-Flüssigkeit, die Fötus-Zellen umfasst, sind daher auch bevorzugte gemäß der vorliegenden Erfindung zu untersuchende Proben.

10 Das Mittel zum Bestimmen der Menge des Proteins (der Proteine) ist nicht von wesentlicher Bedeutung. Vorzugsweise wird die Menge des Proteins (der Proteine) durch ein Verfahren bestimmt, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Protein-Massenspektrometrie, Antikörper-Bindung, eindimensionaler Gel-Elektrophorese, zweidimensionaler Gel-Elektrophorese oder Kombinationen davon.

15 Das vorliegende Verfahren ist besonders zur Bestimmung einer Vielzahl von Proteinen gemäß der vorliegenden Erfindung geeignet. Daher ist es bevorzugt, gleichzeitig die Menge von zwei oder mehr dieser Proteine in der Probe zu bestimmen. Das vorliegende Verfahren kann auch mit anderen Tests kombiniert werden, insbesondere anderen Tests, die zur pränatalen Diagnose verwendet werden, z.B. Tests auf Stoffwechsel-Enzyme oder andere Marker für potentielle genetische Schäden.

20 Vorzugsweise umfasst das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung die Bestimmung der Menge des Proteins unter Verwendung eines Antikörper-Chips.

25 Gemäß einem anderen Aspekt sieht die vorliegende Erfindung ein Set zum Bestimmen der Menge von mindestens zwei Proteinen in einer Probe vor, wobei die mindestens zwei Proteine ausgewählt sind aus Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5), dem Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region, und dem einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Protein KIR3.2 (GIRK2), wobei das Set

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

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

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

45 Das Set gemäß der vorliegenden Erfindung können gemäß Standard-Protokollen erzeugt und entworfen sein, die an die neuen DS-Marker, die durch die vorliegende Erfindung vorgesehen sind, angepasst sind.

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

50 Fig. 1. Giemsa-Banden-Färbung (G-Bande) des menschlichen Chromosoms 21. Die Pfeile zeigen die am Chromosom 21 codierten Gen-Produkte, den Gegenstand der vorliegenden Erfindung und das vorgesehene Beispiel.

55 Fig. 2. (A) Western-Blot-Analyse der vier Proteine, deren Gene am Chromosom 21 codiert sind, β -Actin und NSE in der Großhirnrinde aus fötalem Gehirn mit DS und Kontrollen. Denaturierte

Proteine (10 µg) wurden auf ein homogenes Gel geladen und getrennt und auf PVDF-Membran transferiert. Die Membranen wurden mit primären und sekundären Antikörpern inkubiert, und immunreaktive Banden (PIG-P(DSCR5), 40kDa; DSCR6, 37kDa; GIRK2, 45kDa; β-Actin, 42kDa; NSE, 45kDa) wurden unter Verwendung von Chemilumineszenz-Reagentien nachgewiesen. Die Dichte der nachgewiesenen Banden wurde gemessen und mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Test berechnet, und das Signifikanzniveau wurde als $P < 0,05$ angesehen.

Fig. 3. Expressionsmengen von DSCR5 (SwissProt Nr. P57054), DSCR6 (Nr. P57055) und GIRK2 (Nr. P48051), normalisiert mit jenen von β-Actin (A) oder NSE (B). Die Dichte der immunreaktiven Bande für jedes Protein wurde mit jener von β-Actin oder NSE, die als Referenz-Proteine verwendet wurden, normalisiert.

BEISPIEL:

Protein-Mengen von Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5), dem Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region und dem einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Protein KIR3.2 (GIRK2)

Manchmal resultiert DS aus einer Verdreifachung lediglich eines Teils von Chromosom 21 (partielle Trisomie 21). Diese Region wird Down Syndrom-kritische Region (DSCR) genannt und man vermutet, dass sie Gene codiert, die für die Hauptmerkmale von DS verantwortlich sind (Ohira et al., 1996; Delabar et al., 1993). Daher wurde die Expression von sieben Gen-Produkten dieser Chromosomen-Region analysiert: DSCR4, DSCR5, DSCR6, KIR4.2, GIRK2, KCNE1 und KCNE2 (Fig. 1).

Materialien und Methoden

Fötale Gehirnproben

Fötale Gehirnproben (Großhirnrinde) von DS (8 weiblich, Gestationsalter $19,4 \pm 1,1$ Wochen) und Kontrollen (6 weiblich, Gestationsalter $19,1 \pm 1,6$ Wochen) wurden bei dieser Untersuchung verwendet. Die Gehirnproben wurden von Dr. Mara Dierssen, Genes and Disease Program, Genomic Regulation Center, Passeig Marítim 37-49, E-08003 Barcelona, Spanien, und Dr. J.C. Farreres, Unidad de Patología, Corporació Sanitaria Parc Tauli, Sabadell, Barcelona, Spanien, erworben. Alle Proben hatten eine Autopsie-Zeit von weniger als 6 Stunden und wurden bei -70°C gelagert, wobei die Gefrierkette bis zur Verwendung niemals unterbrochen wurde.

Antikörper

Die Antikörper für DSCR4, DSCR5, DSCR6, KCNE1 und KCNE2 (polyklonaler Ziegen-Antikörper, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA), Kir4.2 und GIRK2 (polyklonale Kaninchen-Antikörper, Alomone Labs, Jerusalem, Israel), β-Aktin (monoklonaler Maus-Antikörper, IgG2a, Sigma, St.Louis, Missouri, USA) und Neuronen-spezifische Enolase (polyklonaler Kaninchen-Antikörper, Chemicon, Hampshire, UK) wurden käuflich erworben.

Western Blots

Unter flüssigem Stickstoff gemahlene fötale Hirngewebe 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 $8.000\times g$ 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 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 Membranen wurden in Blockierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20 und 2% fettfreie Trockenmilch) inkubiert. Die Membranen wurden 2 h lang bei Raumtemperatur mit verdünnten primären Antikörpern (1:500 für DSCR4, DSCR5, KCNE1, KCNE2 und GIRK2; 1:700 für DSCR6; 1:200 für KIR4.2; 1:5000 für β -Actin und 1:2000 für NSE) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten mit Blockierungspuffer wurden die Membranen mit sekundären Antikörpern (boviner anti-Ziegen für DSCR4 (1:1000), DSCR5 (1:1000), DSCR6 (1:1400), KCNE1 (1:1000), KCNE2 (1:1000); Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (H+L) für KIR4.2 (1:400), GIRK2 (1:1000) und NSE (1:4000) und Ziegen-anti-Maus-IgG2a für β -Actin (1:5000), gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, Alabama, USA) 1 Stunde lang untersucht. Die Membranen wurden dreimal 15 Minuten lang gewaschen und mit den Western Lightning™ Chemilumineszenz-Reagentien (PerkinElmer Life Sciences, Inc., Boston, Massachusetts, USA) entwickelt (Cheon et al., 2003).

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 sieben am Chromosom 21 codierten Proteinen, DSCR4, DSCR5, DSCR6, KIR4.2, GIRK2, KCNE1 und KCNE2 in fötalem Gehirn mit DS wurden im Vergleich zu Kontrollen mittels Western-Blot-Analyse evaluiert.

Zwei Proteine, β -Actin und NSE, wurden als Referenz-Proteine für die gesamte Zell- und Neuronen-Dichte verwendet, und ihre Expressionsmengen waren bei Kontrollen und DS vergleichbar (Fig. 2).

Eine einzige Bande bei 40 kDa mit dem Antikörper gegen PIG-P / DSCR5, welche bei DS signifikant etwa fünffach überexprimiert war ($P < 0,05$), wurde auch bei Normalisierung mit NSE und β -Actin beobachtet (Fig. 2, Fig. 3 A-B).

Eine einzige DSCR6-immunreaktive Bande bei 37 kDa wurde nachgewiesen, die auch bei DS signifikant überexprimiert war (Fig. 2, Fig. 3 A-B).

Unter Verwendung des im Handel erhältlichen DSCR4-Antikörpers wurde keine immunreaktive Bande nachgewiesen.

Der Antikörper gegen KIR4.2 erkannte eine Bande bei 35 kDa und eine hochmolekulare Bande um etwa 140 kDa im fötalen Gehirn, und die statistische Auswertung zeigte für beide Banden keinerlei Unterschied zwischen DS und den Kontrollen (Fig. 2, Fig. 3 A-B).

Eine einzige Bande wurde mit dem GIRK2 (KIR 3.2) -Antikörper bei 45 kDa beobachtet. Die Expressionsrate von GIRK2 im fötalen DS-Gehirn war im Vergleich zu den Kontrollen niedriger (Fig. 2, Fig. 3 A-B).

Unter Verwendung von im Handel erhältlichen Antikörpern gegen KCNE1 und KCNE2 wurde keine immunreaktive Bande nachgewiesen.

Diskussion

Die Hauptfeststellung der vorliegenden Beispiele war, zu zeigen, dass nicht alle Gen-Produkte aus der Down Syndrom-kritischen Region (DSCR) überexprimiert sind, wie von der Gen-Dosierungshypothese vorausgesagt, sowie die Beobachtung, dass die DSCR5- und DSCR6-Gen-Produkte PIG-P und DSCR6-Protein im fötalen DS-Gehirn überexprimiert sind. Eine gesteigerte Expression von PIG-P, einer integralen Komponente des Transferase GPI-Gnt, kann eine Schädigung dieses Transferase-Systems widerspiegeln oder zu dieser führen, indem N-Acetylglucosamin von UDP-N-Acetylglucosamin zu Phosphatidylinosit transferiert wird, was zur Produktion von Glycosylphosphatidylinosit (GPI) führt, indem andere Untereinheiten (wie z.B. PIG-A, GPI1) heraus titriert werden, wodurch die erforderliche Stöchiometrie verändert wird.

GPI, ein komplexes Glycolipid, vermittelt die Verankerung von mehr als 100 verschiedenen Proteinen, einschließlich Zelloberflächen-Enzyme, Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen etc., an der Plasma-Membran (Kinoshita et al., 1995) durch C-terminale Modifizierung von Proteinen mit einem GPI-Verankerungs-Signal-Peptid (Ikezawa, 2002). Dieser Glykolipidisierungsprozess ist eine übliche Posttranslations-Modifikation bei Eukaryonten (Ferguson, 1999; Herscovics und Orlean, 1993; Schultz et al., 1998, Udenfriend und Kodukula; 1995) und eine fehlerhafte GPI-Verankerung ist für die Embryogenese nachteilig (Nozaki et al., 1999) und könnte somit eine Rolle für die Entwicklung des Gehirn-Defizits bei DS spielen. Die Steigerung von PIG-P kann nicht möglichen Veränderungen der Neuronen-Dichte bei fötaler DS zugeschrieben werden, da die NSE-Mengen zwischen den Gruppen vergleichbar sind, und wenn PIG-P gegenüber NSE normalisiert war, blieben die PIG-P-Mengen noch immer fünffach erhöht. Die Normalisierung von PIG-P gegenüber dem Housekeeping-Protein β -Actin führte noch immer zu einer Erhöhung (Fig. 3A) von PIG-P im fötalen DS-Gehirn. Die DSCR6-Protein-Mengen waren bei fötaler DS signifikant erhöht, auch wenn die DSCR6-Protein-Mengen sowohl gegenüber NSE als auch gegenüber β -Actin normalisiert waren.

Über die Funktionen von DSCR6 ist nichts bekannt, und es wurden keine funktionellen Domänen beschrieben oder aus der Struktur berechnet, und lediglich die nukleare Lokalisierung wurde vorgeschlagen (Shibuya et al., 2000). Es wurde nie auf Protein-Niveau beschrieben (SWISSPROT P57055, DSR6_HUMAN) und ist daher ein vorausgesagtes Protein, welches nun als existentes Protein im menschlichen Gehirn identifiziert wurde. Erhöhte Mengen in der fötalen DS-Cortex könnten auf eine putative Funktion bei der Entwicklung des Gehirn-Defizits bei DS hinweisen.

DSCR4, KCNE1 und KCNE2 waren unter Verwendung des Immunoblots nicht nachweisbar. DSCR4 kann nicht nachgewiesen worden sein, da es unwahrscheinlich scheint, dass dieses Gen ein Protein-codierendes Transkript darstellt (Toyoda et al., 2002). KCNE1 wurde im vorliegenden System nicht beobachtet, da man auch keine KCNE1-mRNA-Mengen im menschlichen Gehirn fand (Tinel et al., 2000). Schließlich fand man KCNE2 auf mRNA-Ebene im adulten menschlichen Gehirn (Tinel et al., 2000), und es könnte im fötalen Zeitraum sehr wohl abwesend sein, und dies könnte unsere Erkenntnisse auf Protein-Ebene erklären.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine aberrante Expression von PIG-P, dem Gen-Produkt von DSCR5, DSCR6-Protein und GIRK2 aus der Down Syndrom-kritischen Region beobachtet wurde. Das aberrante PIG-P könnte eine fehlerhafte GPI-vermittelte Verankerung von Proteinen in der Plasma-Membran darstellen oder zu dieser führen, mit der möglichen Folge einer Modulierung der Gehirn-Entwicklung. Andererseits wurde die Existenz und die Steigerung eines vorausgesagten Proteins DSCR6 im menschlichen Gehirn und eine tentative Beteiligung an der DS-Pathogenese gezeigt. Die Tatsache, dass nicht alle in der DS-kritischen Region codierten Proteine erhöht sind, stellt die Gen-Dosierungs-Hypothese in Frage, doch kann dies darauf zurückzuführen sein, dass eine aberrante Expression einiger Proteine nicht lebensverträglich ist und diese sekundär auf normale Mengen nach unten reguliert wird, wie dies bei

h2-Calponin der Fall ist (Kuromitsu et al., 1997).

Literaturstellen:

- 5 Antonarakis SE (1998) *Genomics* 51, 1-16
 Becker, L. E., et al., 1991. In: Epstein, C., J., (Hrg.), *The morphogenesis of Down syndrome*, Wiley-Liss, New York, S. 133.
 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.
 10 (Hrg.), *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, Band 1. McGraw Hill, Inc., New York, S. 1223-1256.
 Ferguson MA (1999) *J Cell Sci* 112: 2799-2809
 Herscovics A, Orlean P (1993) *FASEB J* 7: 540-550
 Ikezawa H (2002) *Biol Pharm Bull* 25: 409-417
 15 Kinoshita T, Inoue N, Takeda J (1995) *Adv Immunol* 60: 57-103.
 Kuromitsu J, Yamashita H, Kataoka H, Takahara T, Muramatsu M, Sekine T, Okamoto N, Furuichi Y., Hayashizaki Y (1997) *Mol Cell Biol* 17: 707-712
 Mao R, Zielke CL, Zielke HR, Pevsner J (2003) *Genomics* 81: 457-467
 Mann, D. M. M. (1988) *Mech. Aging Dev.* 43, 99-136
 20 Nozaki M, Ohishi K, Yamada N, Kinoshita T, Nagy A, Takeda J (1999) *Lab Invest* 79: 293-299
 Schultz C, Gilson P, Oxley D, Youl J, Bacic A (1998) *Trends Plant Sci* 3: 426-431
 Shibuya K, Kudoh J, Minoshima S, Kawasaki K, Asakawa S, Shimizu N (2000) *Biochem Biophys Res Commun* 271: 693-698
 Takashima, S., et al., 1981. *Brain Res.* 225, 1-21
 25 Tinel N, Diochot S, Lauritzen I, Barhanin J, Lazdunski M, Borsotto M (2000) *FEBS Lett.* 480: 137-141
 Toyoda A, Noguchi H, Taylor TD, Ito T, Pletcher MT, Sakaki Y, Reeves RH, Hattori M (2002) *Genome Res* 12: 1323-1332
 Udenfriend S, Kodukula K (1995) *Annu Rev Biochem* 64: 563-591
 30 Wisniewski, K. E., et al., 1985. *Ann. Neurol.* 17, 278-282

Patentansprüche:

- 35 1. Verfahren zur Diagnostizierung von Down Syndrom, welches die folgenden Schritte umfasst:
- Vorsehen einer Amnionflüssigkeitsprobe, einer Blut- oder Serumprobe einer schwangeren Frau oder einer Gehirn-Gewebeprobe,
 - Bestimmen der Menge mindestens eines der Proteine ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus dem Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5), dem Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region (Down Syndrome Critical Region Protein), und dem einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Protein (Potassium Inwardly-Rectifying Channel Protein) KIR3.2 (GIRK2),
 - Vergleichen der nachgewiesenen Menge mit einer Standard-Menge des (der) entsprechenden Proteins (Proteine) in einer nicht-Down-Syndrom-Probe, die der Probe einer Körperflüssigkeit oder Gewebeprobe entspricht, und
 - Diagnostizieren von Down Syndrom, wenn die nachgewiesene Menge unter der Standard-Menge liegt, wenn die Menge des einwärts-gleichrichtenden Kalium-Kanal-Proteins KIR3.2 (GIRK2) bestimmt wird, oder
 - Diagnostizieren von Down Syndrom, wenn die nachgewiesene Menge über der Standard-Menge liegt, wenn die Menge des (der) Phosphoinositglykan-Peptid PIG-P (DSCR5)-Proteins (-Proteine) oder des Proteins DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region bestimmt wird.
- 50
- 55 2. Verfahren nach Anspruch 1, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Menge des Proteins (der

Proteine) durch ein Verfahren bestimmt wird, das ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Protein-Antikörper-Bindung, eindimensionaler Gel-Elektrophorese, zweidimensionaler Gel-Elektrophorese, Massenspektrometrie und Kombinationen davon.

- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Menge des Proteins (der Proteine) gleichzeitig in der Probe bestimmt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Menge des Proteins bestimmt wird, indem ein Antikörper-Chip verwendet wird.
- 10 5. Set zum Bestimmen der Menge von mindestens zwei Proteinen in einer Probe, wobei die mindestens zwei Proteine ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus dem Phosphoinositidglykan-Peptid PIG-P (DSCR5), dem Protein DSCR6 der Down Syndrom-kritischen Region, und dem einwärts-gerichteten Kalium-Kanal-Protein KIR3.2 (GIRK2), wobei das Set
- 15 - einen Probenbehälter,
- Mittel zum Nachweisen der mindestens zwei Proteine, insbesondere Antikörper, die die Proteine spezifisch erkennen, und
- Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine aufweist.
- 20 6. Set nach Anspruch 5, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Mittel zum Nachweisen der mindestens zwei Proteine und die Mittel zum Bestimmen der Menge der nachgewiesenen Proteine konjugierte, vorzugsweise markierte Antikörper, insbesondere radioaktiv oder Fluoreszenz-markierte Antikörper sind.
- 25 7. Set nach Anspruch 5 oder 6, *dadurch gekennzeichnet*, dass die Mittel zum Nachweisen der mindestens zwei Proteine an einer festen Oberfläche immobilisiert sind.

30 **Hiezu 3 Blatt Zeichnungen**

35

40

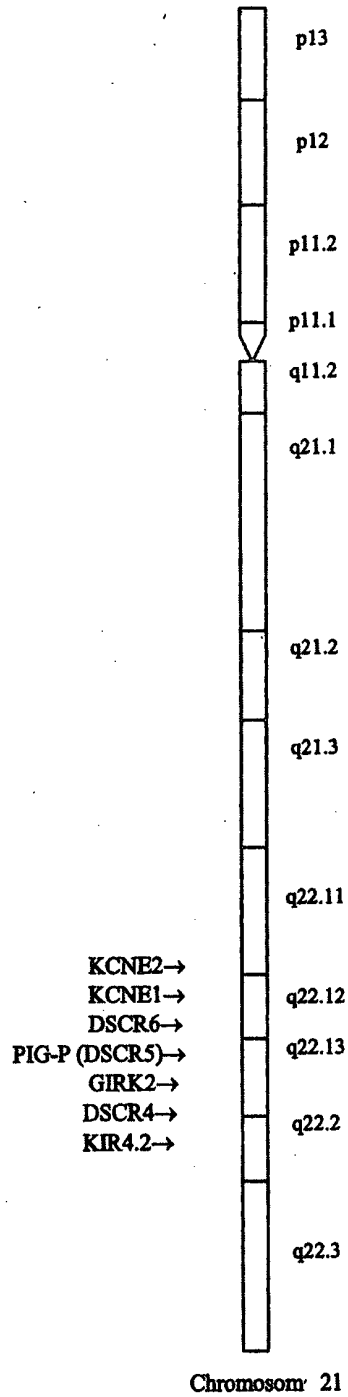
45

50

55



Fig. 1



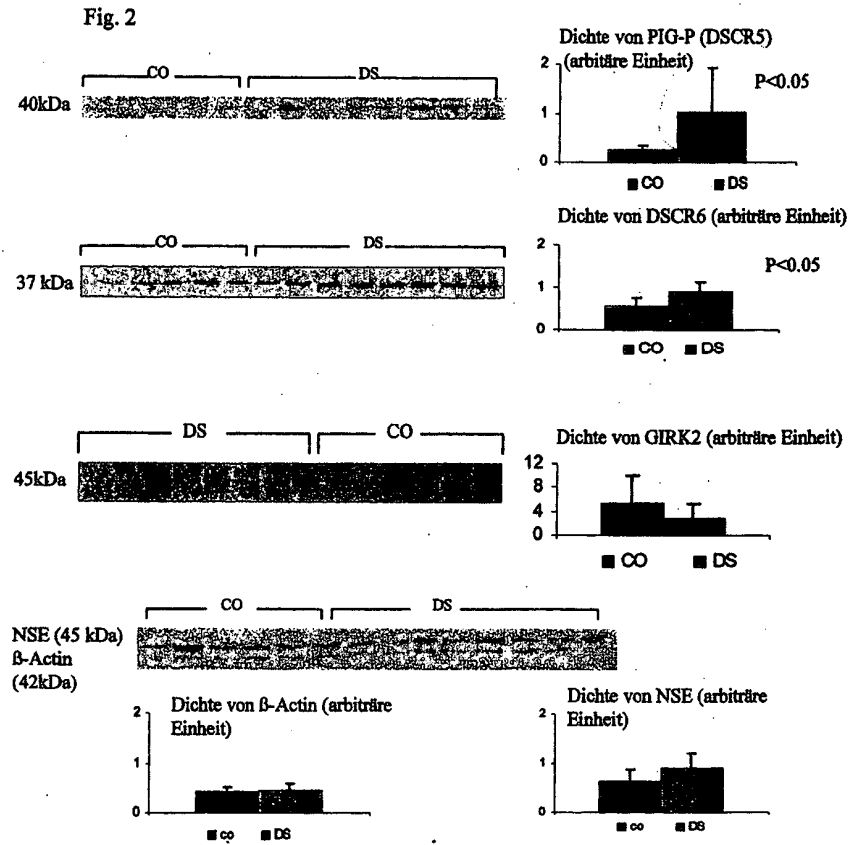
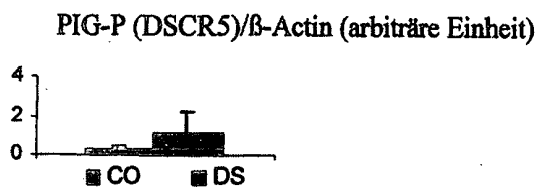


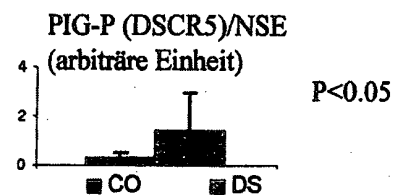


Fig. 3

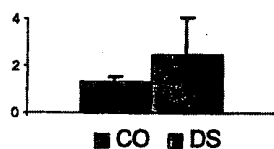
A)



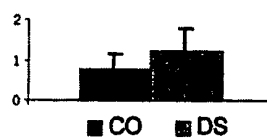
B)



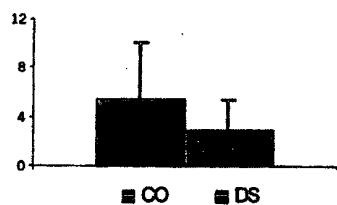
DSCR6/ β -Actin (arbiträre Einheit)



DSCR6/NSE (arbiträre Einheit)



GIRK2/ β -Actin (arbiträre Einheit)



GIRK2/ β -Actin arbiträre Einheit)

