

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
1. November 2007 (01.11.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/121721 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:

Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2007/000697

(22) Internationales Anmeldedatum:

19. April 2007 (19.04.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:

10 2006 018 392.4 20. April 2006 (20.04.2006) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **NEUROPROFILE GMBH** [DE/DE]; Josef-Engert-
Str. 9, 93053 Regensburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **ROHRMEIER,
Thomas** [DE/DE]; Keilsteiner Breiten 6, 93055 Regens-
burg (DE). **DAIG, Rosemarie** [DE/DE]; Keilsteiner
Breiten 6, 93055 Regensburg (DE).

(74) Anwälte: **BETTENHAUSEN, Berthold** usw.; Dehmel &
Bettenhausen, Herzogspitalstr. 11, 80331 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA,

CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG,
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Veröffentlicht:

- ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektro-
nischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom In-
ternationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: THERAPEUTIC TARGET MOLECULES FOR THE DEVELOPMENT OF NOVEL MEDICAMENTS FOR DEGEN-
ERATIVE DISEASES

(54) Bezeichnung: THERAPEUTISCHE ZIELMOLEKÜLE ZUR ENTWICKLUNG NEUARTIGER MEDIKAMENTE FÜR
DEGENERATIVE ERKRANKUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to therapy, prophylaxis and diagnosis of degenerative diseases, in particular, neurodegenerative diseases. The invention particularly relates to genes and proteins, regulated in cells as a function of chronic oxidative stress and which find application in therapy, prophylaxis and diagnosis of degenerative diseases, in particular, neurodegenerative diseases. The invention further relates to the use of genes and proteins, regulated as a function of chronic oxidative stress in cells, for the screening of candidate substances to identify prophylactic and/or therapeutic agents which modulate the biological activity of genes and/or proteins activated in cells as a function of chronic oxidative stress. The invention also relates to a method for diagnosis of degenerative diseases, in particular, neurodegenerative diseases and a method for identifying prophylactic and/or therapeutic agents which modulate the biological activity of genes and/or proteins activated in cells as a function of chronic oxidative stress. Kits for carrying out the diagnostic method are also disclosed.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Therapie, Prophylaxe und Diagnose degenerativer Erkrankungen, besonders neurodegenerativer Erkrankungen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Gene und Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden und die zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen, eingesetzt werden. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem die Verwendung von Genen und Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, für die Durchmusterung von Kandidatensubstanzen, um prophylaktische und/oder therapeutische Wirkstoffe zu identifizieren, welche die biologische Aktivität von Genen und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen aktiviert werden, modulieren. Weiter betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Diagnose degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen, und Verfahren zur Identifizierung von prophylaktischen und/oder therapeutischen Wirkstoffen, welche die biologische Aktivität von Genen und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen aktiviert werden, modulieren. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Kits zur Durchführung der Diagnoseverfahren.



WO 2007/121721 A2

Therapeutische Zielmoleküle zur Entwicklung neuartiger Medikamente für degenerative Erkrankungen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet der Therapie, Prophylaxe und Diagnose degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen. Im Speziellen betrifft die vorliegende Erfindung Gene und Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden und die zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen,
- 10 eingesetzt werden. Die vorliegende Erfindung betrifft zudem die Verwendung von Genen und Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, für die Durchmusterung von Kandidatensubstanzen, um prophylaktische und/oder therapeutische Wirkstoffe zu identifizieren, welche die biologische Aktivität von Genen und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen aktiviert werden, modulieren.
- 15 Weiter betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Diagnose degenerativer Erkrankungen, insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen, und Verfahren zur Identifizierung von prophylaktischen und/oder therapeutischen Wirkstoffen, welche die biologische Aktivität von Genen und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen aktiviert werden, modulieren. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Kits zur Durchführung
- 20 der Diagnoseverfahren.

Aerobe Organismen verwenden für die Aufrechterhaltung des gesamten katabolen und anabolen Stoffwechsels u.a. Oxidationsreaktionen, um Energie aus der Nahrung zu gewinnen und Stoffwechselmetaboliten zur Verfügung zu stellen. Dabei entstehen in den Zellen laufend

25 reaktive Sauerstoff- (= ROS; *reactive oxygen species*) und reaktive Stickstoff-Verbindungen (= RNS; *reactive nitrogen species*) wie Superoxidanionen, Hydroxylradikale, Wasserstoffperoxid, Peroxinitrite und Stickstoffmonoxid. Das Auftreten bzw. Entstehen dieser reaktiven Moleküle muss sehr genau reguliert werden, um eine unkontrollierte Oxidation bzw. Nitrierung von Biomolekülen wie Proteinen, DNA und Lipiden in den Zellen zu verhindern. Bei

30 einem Ungleichgewicht zu Gunsten von ROS und/oder RNS unterliegen die Zellen einem oxidativen Stress, der in unkontrollierter und unerwünschter Weise zur Modifikation von Biomolekülen und damit zum Absterben (Degeneration) der Zellen führen kann. Nervenzellen sind wegen ihres hohen Energieverbrauchs und ihrer hohen Stoffwechselaktivität besonders anfällig gegenüber oxidativem Stress.

Das Absterben von Nervenzellen kann für den betroffenen Menschen verheerende und irreversible Auswirkungen haben. Das Absterben von Nervenzellen kann zum Beispiel als Folge eines Schlaganfalls, Herzinfarkts, von traumatischen Hirn- und Rückenmarksverletzungen, Infektionen, Entzündungsreaktionen, Excitotoxizität, Ischemien, Hypoxien oder anderer

5 Mangelversorgungen des Gehirns bzw. Rückenmarks eintreten. Darüber hinaus tritt ein Absterben von Nervenzellen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie *Morbus (M.)* Alzheimer, Lewy Body Erkrankungen wie *M. Parkinson*, diffusen Lewy Body Erkrankungen, *M. Huntington*, Amyotropher Lateraler Sklerose (ALS), Prion-Erkrankungen (PrD), Creutzfeldt-Jakob Erkrankung, Down-Syndrom, frontotemporalen Demenzen (FTD), Corticobasalen

10 Degenerationen, Multiinfarkt-Demenzen, progressiver supranukleärer Lähmung, Multisystematrophie und Korsakoff's Syndrom auf. Ein Absterben von Nervenzellen kann ebenso die Folge von Medikamentenwirkungen sein. So kann bei einer längeren Verabreichung von Neuroleptika zur Behandlung psychotischer Zustände bei Patienten eine chronische tardive Dyskinesie auftreten, die durch den Anstieg der Konzentration freier Radikale in den betroffenen

15 Neuronen mit anschließender Degeneration der Neurone hervorgerufen wird.

Die Ursache des selektiven und progressiven Absterbens von Neuronen bei neurodegenerativen Erkrankungen ist nicht geklärt. Die Erkrankungen treten jeweils in einer Höhe von maximal 10% als autosomal vererbte Formen auf und betreffen die Patienten dann vor ihrem 65. Lebensjahr

20 ("*early onset*"). Für *M. Alzheimer* sind intrazelluläre, hauptsächlich aus hyperphosphoryliertem Tau-Protein bestehende, neurofibrilläre "*tangles*" (NFT) und extrazelluläre Ablagerungen von Amyloid β (A β) 40-42 in senilen Plaques (SP) charakteristisch. Die Folge ist ein selektiver Verlust cholinergischer Neurone. Es existieren jedoch auch Plaque-freie Formen der Alzheimer-Erkrankung. Die vererbten Formen werden überwiegend durch Mutationen in Genen, die das

25 A β -Vorläufer-Protein (APP) und das Presenilin (PS1 bzw. PS2) kodieren, hervorgerufen. Die auf diesem Befund beruhende Amyloid-Hypothese sieht eine veränderte A β -Homöostase mit der Folge fortschreitender A β -Ablagerungen und A β -Aggregationen als Ursache für das Absterben der cholinergen Neurone.

30 Die Parkinson-Symptomatik wird durch Dopaminmangel, auf Grund des Absterbens von Neuronen in der *Substantia nigra* des Gehirns hervorgerufen. Auf zellulärer Ebene ist das Auftreten von *Lewy Bodies* zu beobachten, die überwiegend aus aggregiertem α -Synuclein bestehen, aber auch weitere Proteine, wie Ubiquitin-C-terminale Hydrolase, enthalten. Eine familiäre Häufung von *M. Parkinson* wurde bisher mit mehr als 10 chromosomalen Regionen

35 assoziiert, wobei Mutationen in den Genen, die α -Synuclein (PARK1), Parkin (PARK2) und

DJ-1 (PARK7) kodieren, eindeutig krankheitsverursachend sind.

ALS wird durch einen progressiven Verlust an Motorneuronen verursacht. 20 % der familiären Formen der Erkrankung werden mit mehr als 90 Mutationen in der Cu-Zn-Superoxiddismutase (SOD) assoziiert.

M. Huntington wird durch die fatale Verlängerung einer CAG-Trinukleotid-Wiederholungssequenz in dem Gen, welches das Huntington-Protein kodiert, verursacht. Diese Verlängerung führt zur Bildung eines Glutamin-reichen anormalen Huntington-Proteins, das intrazellulär akkumuliert und Aggregate u.a. in striatalen Neuronen bildet.

Die überwiegende Anzahl neurodegenerativer Erkrankungen tritt jedoch ohne Beteiligung der jeweils bekannten Mutationen als sporadische Form nach dem 65. Lebensjahr ("*late onset*") auf. Sie werden durch multifaktorielles Zusammenwirken von Umwelteinflüssen und endogenen Faktoren hervorgerufen. Als Hauptrisikofaktor gilt das Alter.

Zellschädigender oxidativer Stress durch ROS und RNS wird in den letzten Jahren zunehmend als krankheitsauslösender oder -fördernder Faktor gesehen. So wurden bei *M. Alzheimer* und *M. Parkinson* vermehrt Protein-Nitrierung, Protein-Carbonylierung, Glykoxidierung und Lipidperoxide in Gehirnprouben nachgewiesen. Weitere Evidenzen sind ein kompensatorisches Hochregulieren antioxidativer Enzyme und die verstärkte Oxidation von RNA bzw. DNA sowie eine verringerte Fähigkeit, solche Schädigungen zu reparieren. Bei *M. Parkinson* ist darüber hinaus ein reduzierter Spiegel an mitochondrialem Atmungs-Komplex I und intrazellulären Thiolen sowie ein Anstieg von Eisen zu finden. Tiermodelle stützen die oxidative Stress-Hypothese bei der Entstehung von *M. Parkinson*. So induziert die Verabreichung von 6-OH-Dopamin oder 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) ebenso wie eine chronische Pestizid-Exposition die Degeneration dopaminerger Neurone. Das durch die PARK7-Region kodierte DJ-1-Protein übernimmt in der Zelle eine antioxidative Funktion. Ebenso ist bekannt, dass eine α -Synuclein-Aggregation durch oxidativen Stress hervorgerufen wird. Bei ALS werden im Rückenmark vermehrt Nitrotyrosine, bei *M. Huntington* im Striatum vermehrt 8-Hydroxy-Desoxyguanosin und Nitrotyrosin als oxidative Stressmarker beobachtet.

Oxidativer Stress ist daher in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen ein kritisches Bindeglied zwischen exogenen Faktoren wie Umweltgiften und endogenen Faktoren wie genetischer Prädisposition. Zudem ist bekannt, dass die Effektivität von Radikal-

Entgiftungssystemen, wie das Glutathion (GSH)-System, im Alter abnimmt. Eine Therapie, die direkt bei den zellulären Schutzmechanismen gegen diesen Stress eingreift und dadurch neuroprotektiv wirkt, wäre wünschenswert und könnte zukünftig die Krankheitsprogression verhindern.

5

Für neurodegenerative Erkrankungen gibt es derzeit keine effektiven Medikamente. Die eingesetzten Wirkstoffe bekämpfen nur Symptome. Sie können das Fortschreiten der Erkrankungen jedoch nicht stoppen. Zum Teil werden erhebliche Nebenwirkungen wie Dyskinesien, Verwirrheitszustände, etc. ausgelöst. Die Medikation zielt auf einen Ersatz des fehlenden Neurotransmitters bzw. auf eine Maximierung der Funktion der noch überlebenden Neurone ab, deren Anzahl zu Beginn der Symptome bereits drastisch, bei Alzheimer z.B. um mehr als 50 %, reduziert ist.

60-80 % der Alzheimer-Patienten sprechen auf die Gruppe der Acetylcholinesterase-Hemmer nicht an. Als einzige Alternative steht der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin zur Verfügung. In klinischer Entwicklung sind u. a. selektive Liganden für nikotinische Acetylcholinrezeptoren und NMDA-Rezeptoren, Hemmstoffe der β - bzw. der γ -Sekretase sowie der Tau-Aggregation, eine Vakzinierung gegen β -Amyloid, nicht-steroidale anti-inflammatorische Medikamente, Cholesterinspiegel senkende Medikamente (Statine) sowie unspezifische Antioxidanzien (u.a. *spin trapping* Agenzien).

Bei Parkinson hilft die Kombination von Levo-Dopa und Decarboxylase-Hemmern nur ca. 5 Jahre. Weiterhin werden Dopamin-Agonisten oder Hemmstoffe der Monoamino-Oxidase oder der Catechol-O-Methyltransferase verabreicht. In klinischer Entwicklung sind u. a. Nervenwachstumsfaktoren, Neuroimmunophilinen, unspezifische Antioxidanzien, Kinase-Hemmer (CEP 1347) sowie Zellersatz-Therapien (u.a. Spherramine®).

Bei ALS wird der NMDA-Rezeptorantagonist Riluzol zur symptomatischen Therapie eingesetzt. Dabei ist eine sehr geringe Verlängerung der Überlebenszeit von 2 Monaten zu beobachten, wobei die Erkrankung innerhalb von 2-5 Jahren nach Diagnose zum Tod führt.

Daher besteht für neurodegenerative Erkrankungen ein großer Bedarf nach neuen Medikamenten mit höherer Effizienz, Spezifität und Verträglichkeit. Insgesamt existiert eine Fülle von Therapie-Ansätzen, die anti-inflammatorische, anti-aggregatorische, anti-exzitatorische, anti-apoptotische, anti-oxidative, neurotroph-regenerative sowie Transkriptions-/Translations-

modifizierende Strategien verfolgen. Ein breit angelegtes therapeutisches Vorgehen, das nach Möglichkeit an mehreren Stellen der degenerativen Kaskade ansetzt, scheint bei der Komplexität der pathophysiologischen Prozesse derzeit am aussichtsreichsten zu sein.

- 5 Bisherige anti-oxidative Therapie-Strategien für neurodegenerative Erkrankungen verwenden nur unspezifische Antioxidanzien (wie Vitamin E, Idebenon). Diese brachten jedoch keine Verbesserung der Krankheitssymptomatik. All diesen Ansätzen fehlt die gezielte Modulation von zelleigenen Genen und Proteinen, die eine entscheidende Funktion bei der Bewältigung der Ursachen oder Folgen von oxidativem Stress ausüben und dadurch neuroprotektiv wirken. Die
- 10 aussichtsreichsten Möglichkeiten, diese Gene bzw. Proteine zu identifizieren, sind Bedingungen, bei denen Zellen gegen oxidativen Stress ankämpfen, aber noch überleben können, d.h. sie unterliegen chronischen und vor allem subletalen oxidativen Stressbedingungen.

- Im Licht des dargestellten Stands der Technik besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung
- 15 darin, Gene bzw. deren Produkte bereitzustellen, die im Zusammenhang mit chronisch oxidativem Stress in den Zellen reguliert werden. Weiter besteht die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, mittels dieser Gene bzw. deren Produkten Wirkstoffe zur Therapie und/oder Prophylaxe von degenerativen, insbesondere neurodegenerativen Erkrankungen zu identifizieren.

- 20 Diese Aufgabe wird von den in den Patentansprüchen definierten Gegenständen gelöst.

- Unter „oxidativem Stress“ versteht man die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies bzw.
reaktiven Stickstoffspezies in Zellen oder Geweben. Sauerstoffspezies können Superoxidanion, Hydroxylradikal und H_2O_2 sein. Stickstoffspezies können Peroxynitrite und Stickstoffmonoxid
- 25 sein. Diese Species entstehen zum Beispiel bei den Reaktionen der Atmungskette in den Mitochondrien jeder Zelle. Das Risiko einer Zellschädigung steigt, wenn z.B. im Gehirn eine hohe Stoffwechselaktivität vorherrscht. Die Sauerstoffspezies werden im Regelfall durch antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase oder Glutathionperoxidase eliminiert. Gelingt diese Elimination jedoch nicht vollständig, entstehen Hydroxylradikale
- 30 Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, welche schwere Zellschäden und Zelltod und schließlich z.B. neurologische degenerative Erkrankungen verursachen können.

- Der Begriff „chronischer oxidativer Stress“ oder „chronischer sublethaler oxidativer Stress“, wie er hierin verwendet wird, bezeichnet die durch eine Einwirkung von oxidativem(n) Stressor(en)
- 35 bewirkte Zunahme mindestens einer reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffverbindung in Zellen

verglichen mit einer Kontrollbedingung, wobei die Zunahme mindestens 4 Stunden dauert und bis zu 35 Tage oder länger anhalten kann.

Der Begriff „oxidativer Stressor“, wie er hierin verwendet wird, bezeichnet ein Molekül, das in
5 Zellen oxidativen Stress erzeugt.

Die Begriffe "Derivat" oder „Variante“ von Nukleinsäuren, wie sie hierin verwendet werden, bezeichnen Nukleinsäuresequenzen, die eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Additionen, Insertionen und/oder Inversionen, wie sie dem Fachmann bekannt sind, zu einer
10 Vergleichsnukleinsäure aufweisen.

Die Begriffe "Derivat" oder „Variante“ von Proteinen, wie sie hierin verwendet werden, bezeichnen Aminosäuresequenzen, die eine oder mehrere Deletionen, Substitutionen, Additionen, Insertionen und/oder natürliche bzw. unnatürliche Protein-Modifikationen, wie sie
15 dem Fachmann bekannt sind (z. B. Glykosylierung oder GPI-Anker), zu einem Vergleichsproteins aufweisen.

Die Begriffe „homologe Sequenz“ oder „Homologie“, wie sie hierin verwendet werden, bezeichnen eine Nukleinsäure- oder Proteinsequenz mit signifikanter Ähnlichkeit zu einer
20 Vergleichssequenz oder Fragmenten davon, wobei die diese homologen Sequenzen aufweisenden Nukleinsäuren bzw. Proteine eine Aktivität oder Teilaktivität vergleichbar der Aktivität der Nukleinsäuren bzw. Proteine mit der Vergleichssequenz aufweisen. Als homologe Sequenzen gelten Nukleinsäuresequenzen, die mit Vergleichssequenzen oder Fragmenten dieser Vergleichssequenzen unter stringenten oder wenig stringenten Bedingungen hybridisieren (zu
25 stringenten und wenig stringenten Bedingungen siehe Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory (1989), ISBN 0-87969-309-6). Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist: Hybridisierung in 4 x SSC bei 65° C (alternativ in 50% Formamid und 4 X SSC bei 42° C), gefolgt von mehreren Waschschritten in 0,1 x SSC bei 65°C für insgesamt eine Stunde. Ein Beispiel für wenig stringente Hybridisierungsbedingungen ist
30 Hybridisierung in 4 x SSC bei 37°C, gefolgt von mehreren Waschrissen in 1 x SSC bei Raumtemperatur. Als homologe Sequenzen sollen weiter Nukleinsäure- oder Proteinsequenzen oder Fragmente davon gelten, die unter Zuhilfenahme des Similaritätsalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul *et al.*, Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990) eine signifikante Ähnlichkeit mit den als Vergleichssequenzen verwendeten
35 Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen aufweisen. Als signifikant ähnlich werden, wie hier

verwendet, Sequenzen bezeichnet, die z.B. unter Verwendung von Standardparametern im Blast-Service des NCBI ein Signifikanzniveau (Probability) von $P < 10^{-5}$ aufweisen, wenn Sie mit den Vergleichssequenzen oder Fragmenten davon verglichen werden.

- 5 Der Begriff „Modulator“, wie er hierin verwendet wird, bezeichnet einen Wirkstoff, der in der Lage ist, die Expressionsrate eines Gens und/oder die biologische Aktivität eines Proteins zu verändern, insbesondere zu erhöhen oder zu erniedrigen. Die Änderung der Expressionsrate oder der biologischen Aktivität kann dabei direkt mit dem Fachmann bekannten Verfahren auf Nukleinsäureebene (z.B. erzeugte mRNA) und auf Proteinebene (z. B. Westernblot, 2D-
10 Gelelektrophorese oder FRET) ermittelt werden.

- Der Begriff „neurodegenerative Erkrankung“, wie er hierin verwendet wird, bezeichnet degenerative und neurologische Krankheiten wie Schlaganfall und Multiple Sklerose sowie neurodegenerative Erkrankungen mit absterbenden Nervenzellen wie Demenz, M. Alzheimer, M.
15 Parkinson, ALS oder M. Huntington. Der Begriff neurodegenerative Erkrankung betrifft auch solche Erkrankungen, bei denen neurodegenerative Prozesse eine Rolle spielen, z.B. durch Medikamentenwirkung verursachte Zelldegenerationen wie Tardive Dyskinesie, oder psychiatrische Erkrankungen wie Schizophrenie oder Depression.

- 20 Die Begriffe „therapeutisches Zielmolekül“ oder „*drug target*“, wie sie hierin verwendet werden, bezeichnen Gene oder Proteine, die durch gezielte Beeinflussung in ihrer Expressionsrate oder biologischen Aktivität durch ein bindendes Molekül oder eine Substanz zu Therapie, Diagnose, Heilung, Verzögerung und/oder Prophylaxe von Erkrankungen verwendet werden:

- 25 Die vorliegende Erfindung betrifft Gene bzw. Proteine, die während chronischen subletalen oxidativen Stressbedingungen reguliert werden und zum cytoprotektiven Arsenal von Zellen gehören. Die vorliegende Erfindung zielt darauf ab, diese Gene bzw. Proteine sowie davon abgeleitete Derivate, Varianten, Homologe und Fragmente sowie gegen diese gerichtete Antikörper für Verfahren zur Therapie, Prophylaxe und Diagnose degenerativer Erkrankungen,
30 insbesondere neurodegenerativer Erkrankungen, sowie für Verfahren zur Identifizierung von prophylaktischen und/oder therapeutischen Wirkstoffen, welche die biologische Aktivität dieser Gene und/oder Proteine modulieren, zu verwenden. Weiter stellt die vorliegende Erfindung diagnostische Kits und die Gene und Proteine bereit, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden. Die Kits, Gene und Proteine werden dazu
35 verwendet, um degenerative Erkrankungen und im Besonderen neurodegenerative Erkrankungen

frühzeitig durch geeignete Maßnahmen zu verhindern, zu therapieren oder zu diagnostizieren bzw. das Risiko einer solchen Erkrankung durch diese Diagnose zu erniedrigen.

In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung Nukleinsäuren bereit, die Gene repräsentieren, die in eukaryotischen Zellen im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress reguliert werden. Weiter stellt die vorliegende Erfindung die von diesen Genen kodierten Proteine bereit. Ferner stellt die vorliegende Erfindung auch solche Proteine bereit, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress reguliert werden, ohne dass die Regulation auf der Ebene der Nukleinsäuren einsetzt. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente der Nukleinsäuren sowie der von den Nukleinsäuren kodierten Proteine.

Vorzugsweise kodieren die Gene, die in eukaryotischen vorzugsweise humanen Zellen im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress reguliert werden, für MAC30 (Meningioma-associated protein), BRI3 (Synonym: I3, pRGR2), G1P3, LOC222171, CUE domain containing 1 (CUEDC1), Niemann-Pick disease type C2 (NPC2), Stearoyl-CoA Desaturase (SCD; Delta-9-Desaturase) und Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 Protein (IDI1; = Isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase 1). Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Transkriptvarianten der jeweiligen Gene.

20

Die Nukleinsäuresequenzen für MAC30 betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern NM 014573, BC045655, BC091504, CR613993, CR590967, CR612870, L19183, BC017362 (siehe Beispiel 1).

Die Nukleinsäuresequenzen für BRI3 betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern BC018737, BC071992, AF041430, AB055977, NM_015379, BC062370, AF106966 (siehe Beispiel 2).

Die Nukleinsäuresequenzen für G1P3 betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern NM_022872, NM_022873, NM_002038, X02492, AK024814, BN000257, BC011601, BC015603 und BT006850 (siehe Beispiel 3).

Die Nukleinsäuresequenzen für LOC222171 betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern BC029131, NM_175887,

35

CR619478, CR608739, CR610203, BC018144, CR604389 (siehe Beispiel 4).

Die Nukleinsäuresequenzen für CUEDC1 betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern NM_017949, AK000746,
5 BC056882, AK000977 (siehe Beispiel 5).

Die Nukleinsäuresequenzen für Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern NM_006432, BC002532, CR609490, CR608935, CR605546, CR622486, AK222474,
10 CR624497, CR601885, X67698, CR595914 (siehe Beispiel 6).

Die Nukleinsäuresequenzen für Stearoyl-CoA Desaturase (SCD; Delta-9-Desaturase) betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern S70284, Y13647, NM_005063, BC005807, AK222862, AB208982, BC062303,
15 AF097514, AB032261 (siehe Beispiel 7).

Die Nukleinsäuresequenzen für IDI1 (Isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase 1) betreffen vorzugsweise die cDNA Sequenzen entsprechend der NCBI Genbank/EMBL Accession-Nummern NM_004508, BC057827, BC019227, BC022418,
20 BC025375, BC006999, BC005247, AF271720 (siehe Beispiel 8).

Vorzugsweise betreffen die Proteine, die in eukaryotischen vorzugsweise humanen Zellen im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress reguliert werden, die Expressionsprodukte der vorstehend aufgeführten Gene und deren Transkriptvarianten.
25

Die Aminosäuresequenzen des Proteins MAC30 betreffen vorzugsweise die Accession-Nummern NP_055388, AAH91504, AAH45655, AAA16188.

Die Aminosäuresequenzen des Proteins Brain protein i3 (BRI3) betreffen vorzugsweise die
30 Accession Nummern AAH18737, AAH71992, AAD05167, BAB32785, NP_056194, AAH62370, AAF18565, O95415. Das Protein brain protein i3 darf nicht mit dem Protein mit der Accession Nummer Q9NQX7 verwechselt werden, das die gleiche Bezeichnung BRI3 trägt, aber keine Ähnlichkeit zu dem Protein dieser Erfindung hat.

35 Die Aminosäuresequenzen des Proteins Interferon induziertes 6-16 Protein betreffen

vorzugsweise die Accession Nummern NP_075010, NP_075011, NP_002029, AAH15603, CAE12275, AAH11601, AAP35496, CAA26322.

Die Aminosäuresequenzen des Proteins LOC222171 betreffen vorzugsweise die Accession-
5 Nummern AAH29131, NP_787083, EAL24204.

Die Aminosäuresequenzen des CUE domain-containing 1 Proteins betreffen vorzugsweise die Accession-Nummern NP_060419, BAA91357, AAH56882, BAA91452, Q9NWM3.

10 Die Aminosäuresequenzen des NPC2 Proteins betreffen vorzugsweise die Accession-Nummern NP_006423, AAH02532, BAD96194, CAA47928, P61916.

Die Aminosäuresequenzen des humanen SCD-Proteins betreffen vorzugsweise die Accession-Nummern BAA93510, BAD92219, AAH62303, AAD29870, NP_005054, AAH05807, O00767,
15 BAD96582, AAB30631, CAA73998.

Die Aminosäuresequenzen des humanen Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1 Proteins (IDI1; = Isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase 1) betreffen vorzugsweise die Accession-Nummern Q13907, NP_004499, AAH19227, AAK49435, AAK49434,
20 AAK29357, AAH06999.

Vorzugsweise betrifft die Erfindung Nukleinsäuren, die Sequenzen gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen sowie Proteine, die Sequenzen gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen und deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente. Wenn es sich um Homologe der
25 erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt, weisen die Homologen eine Homologie von mindestens 80%, bevorzugt eine Homologie von etwa 85%, 90%, 95% oder 99% mit Nukleinsäuren mit der Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1- 63 auf. Wenn es sich um Homologe der erfindungsgemäßen Proteine handelt, weisen die Homologen eine Identität von mindestens 70%, bevorzugt eine Identität von etwa 75%, 85%, 90%, 95% oder 99% zu Proteinen mit der
30 Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 auf. Weiter können die erfindungsgemäßen Proteine Modifikationen aufweisen. Beispielhafte Modifikationen sind chemisch modifizierte Aminosäuren wie in der Natur nicht vorkommende (unnatürliche) Aminosäuren, Deletionen, Mutationen und Additionen in der Aminosäuresequenz, Fusionen der Proteine mit heterologen Polypeptiden (Fusionsproteine) sowie chemische und biologische Modifikationen von
35 Aminosäuren durch in der Natur vorkommende und nicht vorkommende Strukturen wie

Glykosilierungen, GPI-Anker und/oder Lipidierungen.

Die Nukleinsäuremoleküle gemäß der vorliegenden Erfindung können natürlich oder nicht-natürlich vorkommende genomische DNA, RNA, cDNA, microRNA, siRNA sowie Homologe, Derivate, Fragmente und Varianten, insbesondere alternative Splicevarianten, davon sein oder modifizierte, insbesondere transkriptionell oder chemisch modifizierte, Nukleinsäuren oder *Peptide Nucleic Acids* (PNAs) und dergleichen sein.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung Oligonukleotide, die als Sonde oder Primer selektiv an die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren hybridisieren und zur Detektion und/oder Amplifikation dieser Nukleinsäure-Moleküle in biologischem Probenmaterial verwendet werden können. Die Oligonukleotide können DNA, RNA oder PNAs sein. Im Fall von DNA oder RNA bestehen die Oligonukleotide aus mindestens 6, vorzugsweise 6-50, 10-45, 12-40, 15-35, 15-30, 20-45, 25-40 aufeinander folgenden Nukleotiden oder können eine komplementäre Antisense-Nukleotidsequenz zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren aufweisen. Die Oligonukleotide können modifiziert sein, z. B. gekoppelt an ein Enzym, das mit einem chromophoren, fluoreszenten oder lumineszenten Substrat reagiert, oder verknüpft mit Farbstoff-, Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder radioaktiven Molekülen und/oder massenspektroskopisch wirksamen Verbindungen (Isotopentags). Weiter kann die Modifikation der Oligonukleotide eine oder mehr Modifikation(en) der Bindung zwischen den einzelnen Nukleotiden sein, beispielsweise Phosphorothioate oder Methylphosphonate. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide können mit Nukleinsäure-Biochips, im Besonderen elektronischen Biochips in den erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. die Verwendung der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteine, in der medizinischen Forschung, beispielsweise in der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteinen, als Zielmoleküle (*drug targets*) zur Identifizierung von Wirkstoffen, welche die biologische Aktivität von Genen und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, modulieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung dabei die Verwendung von Nukleinsäuren, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten

und Fragmente davon, und Proteine, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon. Die zu verwendenden Nukleinsäuren und Proteine können auch Modifikationen, wie sie hierin definiert sind, aufweisen.

5

Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht die Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, die gegen Erkrankungen und/oder (chronischen) krankheitsähnliche Zustände, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, insbesondere Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, entzündliche
10 Erkrankungen im Immunsystem, rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, vorzeitige Alterungsprozesse, degenerative und neurologische Krankheiten wie Schlaganfall und Multiple Sklerose sowie neurodegenerative Erkrankungen mit absterbenden Nervenzellen wie Demenz, M. Alzheimer, M. Parkinson, ALS oder M. Huntington, eingesetzt werden können bzw. diese Erkrankungen und/oder (chronischen) krankheitsähnliche Zustände verhindern.

15

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, zur Identifizierung, Überwachung, nosologischen Klassifizierung (Kategorisierung der Krankheitsstadien), Behandlung, Diagnose und/oder prognostischen Beurteilung von
20 Erkrankungen und krankheitsähnlichen Zuständen, die durch oxidativen Stress von Zellen verursacht werden. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung dabei die Verwendung von Nukleinsäuren, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon sowie die Verwendung von Proteinen, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten
25 und Fragmente davon.

In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Diagnoseverfahren zur Detektion und/oder Analyse von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden.

30

Das Verfahren umfasst dabei die folgenden Schritte:

- a) Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Probe,
- b) Herstellung von cDNA oder optional vorherige Synthese von cRNA zur linearen Amplifizierung,
- 35 c) Zugabe von Oligonukleotiden, die gegen ein Gen, das im Zusammenhang mit

chronischem oxidativem Stress reguliert ist, gerichtet sind und anschließende Amplifizierung der cDNA aus Schritt b),

d) Analyse der Amplifikationsprodukte aus Schritt c).

- 5 Falls für die Analyse eine Signalverstärkung nötig ist, können die amplifizierten Produkte aus Schritt c) mit chemisch modifizierten Oligonukleotiden oder mit komplementären Nukleinsäuresequenzen auf einem Biochip hybridisiert werden.

10 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Diagnoseverfahren zur Detektion und/oder Analyse von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, umfassend die folgenden Schritte:

- a) Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Probe, wobei gegebenenfalls RNA direkt markiert wird,
- 15 b) Zugabe von Oligonukleotiden, die gegen ein Gen, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativem Stress reguliert ist, gerichtet sind und anschließende Hybridisierung mit den isolierten Nukleinsäuren aus Schritt a),
- c) Analyse der Hybridisierungssignale.

20 Bei der isolierten Probe kann es sich um eine biologische Probe wie z.B. Gewebeproben wie des Gehirns, oder Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Serum oder cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) handeln. Die Probe kann auch zuvor aus biologischem Material gewonnene DNA oder RNA sein.

25 Bei den zu detektierenden Nukleinsäuren kann es sich um DNA oder RNA handeln, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, wobei DNA bevorzugt ist. Insbesondere bevorzugt kann hierbei die zu detektierende Nukleinsäure eine oder mehrere Nukleinsäuren sein, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon. Wenn es sich bei der Nukleinsäure um

30 RNA handelt, erfolgt vor der Nukleinsäureamplifikation eine reverse Transkription der RNA in cDNA. Wenn es sich bei der Nukleinsäure um RNA handelt, erfolgt die reverse Transkription und Nukleinsäureamplifikation vorzugsweise mittels einer RT-PCR.

Vorzugsweise erfolgt mit den erfindungsgemäßen Verfahren die Bestimmung der Höhe der

35 Expressionsrate einer oder mehrerer Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem

oxidativen Stress in Zellen reguliert werden. Dazu wird vorzugsweise Gesamt-RNA oder mRNA aus der Probe isoliert und die RNA revers in cDNA transkribiert. Zur linearen Amplifizierung wird nach einer ersten cDNA-Synthese eine in vitro Transkription mit einer DNA abhängigen RNA-Polymerase durchgeführt, an die sich eine weitere cDNA-Synthese mit der entstandenen cRNA anschließt. Zur direkten Markierung wird an die RNA z. B. alkalische Phosphatase gekoppelt und nachfolgend die Enzymaktivität detektiert. Vorzugsweise wird die cDNA dazu unter Verwendung der erfindungsgemäßen Verfahren amplifiziert, wobei eine quantitative PCR ausgeführt wird, wie sie im Stand der Technik bekannt ist. Ferner können die Expressionsraten der Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, über an sie hybridisierende Oligonukleotide nachgewiesen werden. Vorzugsweise ist dabei die Nukleinsäure, deren Expression zu quantifizieren ist, eine oder mehrere Nukleinsäure(n), die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon.

Die Bestimmung der Expressionsrate der Nukleinsäuren ermöglicht z.B. die Diagnose, ob in den Zellen, aus oder mit denen die getestete Probe gewonnen wurde, oxidativer Stress vorlag, was in Folge eine Aussage über Identifizierung, Überwachung, nosologischen Klassifizierung, Diagnose und/oder prognostischen Beurteilung von Erkrankungen und krankheitsähnlichen Zuständen, die durch oxidativen Stress von Zellen verursacht werden, ermöglicht. Die erfindungsgemäßen Verfahren ermöglichen die Diagnose von Erkrankungen und/oder (chronischen) krankheitsähnlichen Zuständen, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, insbesondere Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, entzündliche Erkrankungen im Immunsystem, rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, vorzeitige Alterungsprozesse, degenerative und neurologische Krankheiten wie Schlaganfall und Multiple Sklerose sowie neurodegenerative Erkrankungen mit absterbenden Nervenzellen wie Demenz, M. Alzheimer, M. Parkinson, ALS oder M. Huntington. Weiter erfolgt mit den erfindungsgemäßen Verfahren die Identifizierung, Beurteilung und/oder Überwachung von Medikamentennebenwirkungen, die infolge von oxidativem Stress auftreten, der von den entsprechenden Medikamenten verursacht wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung der erfindungsgemäßen Analyse- und Detektionsverfahren, wobei das Kit mindestens ein Primerpaar zur Durchführung der Nukleinsäureamplifikation gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren umfasst. Dabei umfassen die Primer der entsprechenden Primerpaare jeweils DNA-Sequenzen, die an Nukleinsäuren hybridisieren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in

Zellen reguliert werden. Vorzugsweise umfassen die Primer jeweils DNA-Sequenzen, die an eine oder mehr Nukleinsäure(n) hybridisieren, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon. Ferner kann das erfindungsgemäße Kit entsprechend des auszuführenden Verfahrens zur Nukleinsäureamplifikation geeignete Reagenzien wie Puffer, Nukleotide und Enzyme, z. B. DNA-Polymerasen, sowie mindestens eine geeignete Referenznukleinsäure(n) umfassen.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, zur Identifizierung, Überwachung, nosologischen Klassifizierung, Behandlung, Diagnose und/oder prognostischen Beurteilung von Erkrankungen und krankheitsähnlichen Zuständen, die durch oxidativen Stress von Zellen verursacht werden. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung dabei die Verwendung von Proteinen, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO: 64 bis 113 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon.

15

In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Analyse- und/oder Diagnoseverfahren zur Bestimmung der Mengen der Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden. Das Verfahren umfasst dabei die folgenden Schritte:

20

a) Durchführung einer Mengenbestimmung mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, in einer isolierten Probe, vorzugsweise aus biologischem Material wie Gehirn, CSF, Blut, Speichel.

25

b) Vergleich mit den in einer Referenzprobe bestimmten Mengen mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, wobei die Referenzprobe von einem nicht an einer degenerativen Erkrankung leidenden Subjekt stammt,

30

wobei eine erhöhte Menge des mindestens einen Proteins in der in Schritt a) getesteten Probe im Vergleich zu der Menge des entsprechenden Proteins in der Referenzprobe auf das Vorliegen einer degenerativen Erkrankung oder das Risiko, an einer degenerativen Erkrankung zu erkranken, hinweist.

35

Vorzugsweise erfolgt die Mengenbestimmung mindestens eines Proteins, das ausgewählt wird

aus der Gruppe der Proteine, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon.

Die Durchführung einer Mengenbestimmung erfolgt vorzugsweise immunologisch, beispielsweise mittels eines ELISA-Assays, Western-Blots, RIA, Immunhistochemie oder Immuncytochemie. Bevorzugt wird die erfindungsgemäße Proteinmengenbestimmung immunologisch unter Verwendung monoklonaler oder polyklonaler Antikörper oder anderer Moleküle durchgeführt, die spezifisch an ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, binden bzw. spezifisch an ein Protein binden, das ausgewählt wird aus der Gruppe der Proteine, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon. Die Moleküle können mit den nachstehend beschriebenen therapeutischen oder prophylaktischen Bindern identisch sein und können Biomoleküle oder Chemikalien, insbesondere kleine chemische Moleküle sein, wie für Modulatoren der Expression bzw. biologischen Aktivität nachstehend beschrieben wird. Die Mengenbestimmung kann bevorzugt auch nicht immunologisch mit NMR- oder PET-Sonden erfolgen. Ebenso bevorzugt ist die Quantifizierung mittels Massenspektroskopie-Methoden. Die zu bestimmenden Proteine können auch Modifikationen, wie oben definiert sind, aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Probe mit einem Antikörper oder Binder in Kontakt gebracht und die Menge des entstehenden Komplexes aus Antikörper und Protein bzw. Binder und Protein mittels des oben genannten Verfahrens bestimmt. Die Antikörper oder Binder können chemisch modifiziert sein. Die Antikörper oder Binder können beispielsweise kovalent mit einem Enzym gekoppelt sein, das mit einem (chromophoren) Substrat reagiert, wobei die Reaktion - und damit der entstandene Komplex aus Antikörper und Protein bzw. Binder und Protein - mittels der resultierenden Fluoreszenz, Lumineszenz oder Phosphoreszenz visualisiert und nachgewiesen werden kann. Weiter können die Antikörper oder Binder direkt mit Farbstoff-, Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder radioaktiven Molekülen verknüpft sein bzw. massenspektroskopisch wirksame Isotopen enthalten, so dass der Nachweis des entstandenen Komplexes aus Antikörper und Protein bzw. Binder und Protein direkt ohne zwischengeschalteten enzymatischen Reaktionsschritt visualisiert werden kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Proteinchips zur Detektion von Antikörpern gegen Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, in Patientenmaterial, wie Blut, Serum, CSF, Gehirn, Speichel verwendet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die Proteinchips Antikörper bzw. Binder zur Detektion der erfindungsgemäßen Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, in Patientenmaterial, wie Blut, Serum, CSF, Gehirn, Speichel.

Die Bestimmung der Proteinmenge eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, ermöglicht die Identifizierung, Überwachung, nosologische Klassifizierung, Diagnose und/oder prognostischen Beurteilung von Erkrankungen und krankheitsähnlichen Zuständen, die durch oxidativen Stress von Zellen verursacht werden, ermöglicht. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Diagnose von Erkrankungen und/oder (chronischen) krankheitsähnlichen Zuständen, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, insbesondere Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Arteriosklerose, Diabetes mellitus, entzündliche Erkrankungen im Immunsystem, rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen, vorzeitige Alterungsprozesse, degenerative und neurologische Krankheiten wie Schlaganfall und Multiple Sklerose sowie neurodegenerative Erkrankungen mit absterbenden Nervenzellen wie Demenz, M. Alzheimer, M. Parkinson, ALS oder M. Huntington. Weiter erfolgt mit dem erfindungsgemäßen Verfahren die Identifizierung, Beurteilung und/oder Überwachung von Medikamentennebenwirkungen, die infolge von oxidativem Stress auftreten, der von den entsprechenden Medikamenten verursacht wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Mengenbestimmung mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird. Das Kit umfasst dabei mindestens einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder anderen Binder, der für ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, spezifisch ist und vorzugsweise für ein Protein spezifisch ist, das ausgewählt wird aus der Gruppe der Proteine, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon. Ferner kann das erfindungsgemäße Kit entsprechend des auszuführenden Verfahrens zur Proteinmengenbestimmung geeignete Reagenzien wie Puffer sowie (ein) geeignete(s) Referenzprotein(e) umfassen. Der erfindungsgemäße Kit könnte ferner NMR-Tags, PET-Sonden, Isotopentags für Massenspektroskopie und/oder Aptamere enthalten.

In einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert

werden, zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, welche die Expression von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. die die biologische Aktivität der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteinen modulieren. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung dabei die
5 Verwendung von Nukleinsäuren, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen sowie Proteine, die Sequenzen gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 aufweisen und deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente.

In einer Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung
10 von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, welche die Expression von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Zelle, die eine Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit
15 chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, exprimiert
- b) in Kontakt bringen der Zelle mit einer Kandidatensubstanz und
- c) Vergleichen der Expression der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit
chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, mit der Expression einer
Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen
20 reguliert wird, wenn die Kandidatensubstanz nicht hinzugefügt wird,

wobei eine Veränderung der Expression der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit
chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, anzeigt, dass die Kandidatensubstanz ein
Modulator der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen
25 reguliert wird, ist.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur
Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, die die biologische
Aktivität von Proteinen modulieren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in
30 Zellen reguliert werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- a) Bereitstellen einer Zelle, die ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem
oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, enthält bzw. Immobilisieren mindestens
eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in
35 Zellen reguliert wird auf einem Trägermaterial

- b) in Kontakt bringen der Zelle bzw. des Proteins auf dem Trägermaterial mit einer Kandidatensubstanz und
- c) Detektion der Menge der gebundenen Kandidatensubstanz an ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird mittels biophysikalischer Methoden wie Plasmon-Surface-Resonanz, FRET, quantitative HPLC, BioAssays und Massenspektroskopie,

wobei eine Bindung anzeigt, dass es sich um einen potentiellen Modulator handelt.

- 10 Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Bestimmung der Expression der Nukleinsäure bzw. die Menge des von dieser Nukleinsäure exprimierten Proteins mittels einer RNA-Analyse, insbesondere durch einen Northern-Blot, eine RNA/cDNA Hybridisierung mit evtl. Signalverstärkung oder eine RT-PCR, oder mittels Proteinanalyseverfahren, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse oder ELISA durchgeführt werden.

15

Vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen unter Verwendung von Genbanken, Expressionsbanken, Naturstoffbanken, Banken mit kleinen chemischen Molekülen, rekombinatorisch chemisch hergestellten Leitstrukturen und dergleichen ausgeführt.

20

Die erfindungsgemäß verwendeten Kandidatensubstanzen können Biomoleküle oder Chemikalien sein, insbesondere kleine chemische Moleküle wie sie nachstehend definiert sind.

- 25 Beispiele für Biomoleküle, die als Modulatoren der Expression bzw. biologischen Aktivität wirken können, sind: Nukleinsäuren wie Poly- und Oligonukleotide, Purine, Pyrimidine, Polypeptide, Antikörper, Oligosaccharide, Polysaccharide, Lipide, Fettsäuren, Steroide oder strukturelle Analoga, Fragmente oder Derivate davon und/oder Kombinationen daraus.

- 30 Beispiele für Modulatoren der Expression sind: micro-RNA, siRNA oder weitere dem Fachmann bekannte Moleküle der RNA-Interferenz (RNAi); Oligonukleotide, Polynukleotide, Antisense-Nukleinsäuren, PNA, Aptamere oder Ribozyme, die z.B. als Transkriptionsaktivatoren oder -inhibitoren bzw. Translationsaktivatoren oder -inhibitoren spezifische Auswirkungen auf die Transkription und/oder Translation von Nukleinsäuren haben, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden. Modulatoren der Expression können
- 35 Modifizierungen aufweisen.

Beispiele für Modulatoren der biologischen Aktivität sind: polymere Formen von Aminosäuren beliebiger Länge (z.B. Polypeptide, Proteine), die beispielsweise natürlich vorkommende oder unnatürliche Aminosäuren beinhalten und als einzelne Aminosäurekette oder als multimeres Molekül vorkommen; Polypeptide umfassend Aminosäure-Analoga, modifizierte oder derivatisierte Aminosäuren; Polypeptide mit zyklischem oder bizyklischem Peptid-Rückgrat; Fusionsproteine, Depsipeptide, PNAs oder Peptidomimetika. Modulatoren der biologischen Aktivität können Modifizierungen aufweisen.

- 10 Modulatoren der biologischen Aktivität können weiter eine Wirkung auf die Bindungseigenschaften der Proteine haben.

Bevorzugte Modulatoren der biologischen Aktivität sind Antikörper, beispielsweise polyklonale oder monoklonale Antikörper, die agonistisch, antagonistisch oder neutralisierend auf die biologische Aktivität von Proteinen wirken, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress in Zellen reguliert sind und an die die Antikörper binden. Vorzugsweise sind die Antikörper humanen Ursprungs oder humanisiert. Vorzugsweise umfassen die erfindungsgemäß als Modulatoren wirkenden Antikörper mindestens eine der folgenden Domänen: variable Region eines Immunglobulins, konstante Region eines Immunglobulins, schwere Kette eines Immunglobulins, leichte Kette eines Immunglobulins und antigenbindene Region eines Immunglobulins.

Weiter beinhalten Modulatoren der biologischen Aktivität auch aktive Fragmente eines Antikörpers, die spezifisch an ein Antigen oder ein Epitop eines Proteins binden, das im Zusammenhang mit oxidativen Stress in Zellen reguliert wird. Ein aktives Fragment kann ein Fab-Fragment, ein Fc-Fragment, ein Fragment des variablen Bereichs der schweren Kette oder der leichten Kette sein.

Weiter beinhalten Modulatoren der biologischen Aktivität auch Antikörper oder aktive Fragmente davon, die spezifisch an Liganden eines Proteins binden, das im Zusammenhang mit oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, und somit die Aktivität des Liganden modulieren.

Die Modulatoren der biologischen Aktivität von Proteinen, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, können mit einem therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoff verbunden sein. Diese Bindung kann kovalent sein. Geeignete

Wirkstoffe sind beispielsweise: radioaktive Isotope, unspezifische Antioxidanzien, Nervenwachstumsfaktoren sowie Aggregationshemmer.

Beispiele für Chemikalien als Modulatoren der Expression von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. als Modulatoren der biologischen Aktivität der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteine sind: Chemikalien aus allen chemischen Klassen, synthetische, halb-synthetische oder natürlich vorkommende, anorganische oder organische Moleküle, kleine Moleküle oder makromolekulare Komplexe oder metallische Elemente, wie Lithium, oder Gase. Beispiele für oben genannte kleine chemische Moleküle sind: kleine organische Verbindungen mit einem Molekulargewicht von mindestens etwa 30 und weniger als etwa 5000 Dalton.

Für die Interaktion mit Nukleinsäuren oder Proteinen, insbesondere über Wasserstoffbrückenbindungen, können die als Modulatoren wirkenden Chemikalien und kleinen chemischen Moleküle mindestens eine der folgenden funktionellen Gruppen aufweisen: Hydroxyl-, Amino-, Imino-, Carboxyl- oder Carbonyl-Gruppe. Ferner können die als Modulatoren wirkenden Chemikalien und kleinen chemischen Moleküle eine monozyklische oder polyzyklische Kohlenstoffstruktur oder eine heterozyklische Struktur sein oder aufweisen, und/oder eine aromatische oder polyaromatische Struktur sein oder aufweisen, die mit mindestens einer der oben genannten funktionellen Gruppen substituiert ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind Wirkstoffe, die die biologische Aktivität von Proteinen modulieren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, Wirkstoffe, die an Proteine binden, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden (so genannte „Binder“). Um solche Binder zu identifizieren, werden bevorzugt Proteinchips verwendet, die Proteine umfassen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, insbesondere Proteine, die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:64 bis 113 umfassen sowie Derivate, Varianten, Homologe und Fragmente davon.

30

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Kit zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, welche die Expression von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. die die biologische Aktivität der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteinen modulieren, wobei das Kit mindestens eine

35

Zelle umfasst, die eine Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, exprimiert. Vorzugsweise umfasst die Zelle eine oder mehr Nukleinsäure(n), die eine Sequenz gemäß der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon.

5

Die für die Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendeten Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. Nukleinsäuren die für Proteine kodieren, die im Zusammenhang mit oxidativen Stress reguliert werden, und die vorzugsweise die Sequenzen der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie
10 Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon, können funktional mit regulatorischen Kontrollelementen verbunden sein, die eine effektive Expression, d.h. Transkription und/oder Translation in Wirtszellen und oder Wirtsorganismen erlauben. Regulatorische Kontrollelemente sind beispielsweise konstitutive, induzierbare, zell- oder gewebespezifische Promotoren, wie sie dem Fachmann als Stand der Technik bekannt sind. Weitere regulatorische Kontrollelemente
15 sind Terminatorsequenzen und Polyadenylierungssignalsequenzen. Die mit den regulatorischen Kontrollelementen funktional verbundenen Nukleinsäuren können in einem Vektor, beispielsweise in einem Plasmid, Cosmid, Phagmid, Viroid, Virus, vorzugsweise Adenovirus und Baculovirus, vorliegen. Weiter können die mit den regulatorischen Kontrollelementen funktional verbundenen Nukleinsäuren in den Wirtszellen und/oder Wirtsorganismen zusammen
20 mit einem Markergen vorliegen, wobei das Markergen zusammen mit den mit den regulatorischen Kontrollelementen funktional verbundenen Nukleinsäuren auf einem Vektor oder auf einem von diesem Vektor unterschiedlichen zweiten Vektor vorliegen kann. Im zweiten Fall wird der Markergen-umfassende Vektor zusammen mit dem Vektor, der die mit den regulatorischen Kontrollelementen funktional verbundene Nukleinsäure umfasst, in die
25 Wirtszelle oder den Wirtsorganismus eingebracht.

Weiter betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert sind, bzw. Nukleinsäuren, die ein im Zusammenhang mit oxidativem Stress reguliertes Protein kodieren, und die
30 vorzugsweise die Sequenzen der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweisen, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon, zur Herstellung transgener Zellen und nicht-humaner Organismen, vorzugsweise eines transgenen nicht-humanen Säugertiers.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist eine Zelle, umfassend mindestens eine
35 rekombinante Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen

reguliert wird, bzw. mindestens 1 rekombinante Nukleinsäure, die ein im Zusammenhang mit oxidativem Stress reguliertes Protein kodiert, und die vorzugsweise die Sequenzen der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweist, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon, wobei die rekombinante Nukleinsäure mit regulatorischen Kontrollelementen funktional verbunden ist.

5

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein nicht-humaner Organismus, vorzugsweise ein Säugetier, umfassend mindestens eine rekombinante Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, bzw. mindestens 1 rekombinante Nukleinsäure, die ein im Zusammenhang mit oxidativem Stress regulierte Protein kodiert, und die vorzugsweise die Sequenzen der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweist, sowie Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente davon, wobei die rekombinanten Nukleinsäure mit regulatorischen Kontrollelementen funktional verbunden ist.

10

Ein weiterer Aspekt ist die therapeutische Verwendung von Nukleinsäuren und Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, in der Medizin. Vorzugsweise werden dabei Nukleinsäuren und Proteine verwendet, welche die Sequenzen gemäß SEQ ID NO:1 bis 113 aufweisen sowie deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente.

15

20 Beispiele

Beispiel 1:

Die Zunahme der MAC30-mRNA in NT2-N Nervenzellen (Andrews P. W., Dev. Biol., 103, pp 285 – 293, 1984; Pleasure S. J., Page C., Lee V.M.-Y., J. Neurosci., 12, pp 1802 - 1815, 1992) wurde in Micro-Array-Analysen unter Verwendung fluoreszenzmarkierter cDNA nach Behandlung der Zellen unter serumfreien Bedingungen mit chronisch subletalen Konzentrationen des oxidativen Stressors Haloperidol (Fa Sigma; Katalog-Nr. H-1512) nachgewiesen. Geeignete Bedingungen für eine optimale Überlebensrate der Zellen wurden mit dem Live/Dead-Viabilitäts/Cytotoxizitäts Test (Firma Molecular Probes) gemäß der Anleitung des Herstellers ermittelt. Bei einer Konzentration des oxidativen Stressors im Bereich von 1,0 - 25 µM waren mehr als 75% der Nervenzellen mehr als 3 Tage nach dem Zeitpunkt der Probennahme für Expressionprofiling Experimente mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese bzw. DNA-Microarrays lebend. Zur weiteren Charakterisierung der Auswirkung auf die Zellen wurde der Gehalt an ROS und RNS sowie der Redoxstatus der Zellen ermittelt. Zur Bestimmung von Gesamtzell-ROS wurde 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (Fa. Sigma, Katalog-Nr.

30

35

D6883) eingesetzt. Zellen einer 10 cm Schale wurden in PBS abgekratzt, ein Aliquot mit 5 μ M DCFDA versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen per Ultraschall homogenisiert, zentrifugiert (20 Minuten, 4°C, 20.000 x g) und die Fluoreszenz des Überstandes vermessen. Als Standard diente DCF. Alle Daten wurden mit der Proteinkonzentration normalisiert. Die relative Zunahme an ROS wurde im Verhältnis zur Kontrolle berechnet. Weiterhin wurden ROS mit Hilfe von Dihydroethidium (DHE; Fa. Sigma Kat.-Nr. D7008)) bestimmt. Ein Aliquot der abgeschabten Zellen wurden mit 5 μ M DHE versetzt, 1 Stunde bei 37°C inkubiert, analog der DCFDA-Prozedur aufgearbeitet und die Fluoreszenz des Überstandes bestimmt. Die proteinbereinigte Veränderung an mitochondrialen ROS wurde in Relation zur unbehandelten Kontrolle berechnet.

Die in die verschiedenen Experimente eingesetzten Konzentrationen an Haloperidol lagen zwischen 1,0 - 25 μ M. Die Konzentrationen des Stressors können aber auch höher oder niedriger als der angegebene Bereich sein.

Die MAC30-mRNA Zunahme kann durch eine quantitative Real-time RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert werden. Nach 8-tägiger Behandlung der Zellen beträgt die Zunahme 50 % oder mehr und kann bei längerer Behandlung bis zu 200 % oder mehr erreichen. Für die Analyse der MAC30 mRNA durch qRTRTPCR wurde das PCR-Primer Paar MAC30-For1 (5'- AAGCCATCTTCCTTAGCCTCCCAAGTA-3') (SEQ ID NO: 114) und MAC-30-Rev2 (5'-AAAACCCTGTCTCCACACACACAAAAA-3') (SEQ ID NO: 115) eingesetzt. Mit diesem Primer-Paar wurde ein cDNA-Fragment amplifiziert, das eine kodierende Sequenz für ein Polypeptid der Länge 69 Aminosäuren aufweist (Accession-Nummern NP_055388 und AAH45655). Mit diesem Primerpaar wurde auch ein cDNA-Fragment amplifiziert, das eine kodierende Sequenz für ein Polypeptid der Länge 176 Aminosäuren aufweist (Accession-Nummer AAH91504). Darüber hinaus wurde mit diesem Primerpaar ein cDNA-Fragment amplifiziert, das eine kodierende Sequenz für ein Polypeptid der Länge 189 Aminosäuren aufweist (Accession-Nummer AAA16188). Bei diesen Fragmenten handelt es sich um unterschiedlich lange Teilstücke desselben Proteins, die bis auf einen Aminosäureaustausch identisch sind. Die unterschiedlichen Längen beruhen auf der unterschiedlichen Position des ersten ATG-Startcodons, das in NP_055388 und AAH45655 auf Grund einer Sequenzvariation später auftritt. Im Falle von AAA16188 beginnt der offene Leserahmen (ORF) mit dem ersten Codon in der Sequenz, das kein ATG darstellt. AAH91504 nutzt hingegen das erste ATG dieser Sequenz. Darüber hinaus können mit diesem Primerpaar weitere mRNAs nachgewiesen werden, die weitere unterschiedlich lange MAC30-Proteine kodieren und eine Ähnlichkeit von mindestens 50 % aufweisen.

Beispiel 2:

Die Zunahme der BRI3-mRNA in NT2-N Nervenzellen wurde in Micro-Array-Analysen unter Verwendung von fluoreszenzmarkierter cDNA nach Behandlung mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) nachgewiesen. Diese Zunahme kann durch eine quantitative Real-time
5 RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert werden. Die Zunahme ist 3 Tage nach Behandlung festzustellen. Nach 8-tägiger Behandlung der Zellen beträgt die Zunahme bereits 40 % oder mehr und kann bei längerer Behandlung bis zu 200 % oder mehr erreichen. Für die Analyse der BRI3 mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das
10 PCR-Primer Paar BRI3-For1 (5'-CTTTGGGTTCATTTGCTGTTTTG-3') (SEQ ID NO: 116) und BRI3-Rev2 (5'-CATTAGAAAAAGAGAGCTGGGTGTA-3') (SEQ ID NO: 117). Mit diesem Primer-Paar wurden cDNA-BRI3-Fragmente amplifiziert, die kodierende Bereiche für Polypeptide der Länge 125 Aminosäuren aufweisen.

Beispiel 3:

15 Die Zunahme der G1P3-mRNA in NT2-N Nervenzellen kann in Micro-Array-Analysen mit fluoreszenzmarkierter cDNA nach Behandlung mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) nachgewiesen werden. Diese Zunahme wurde durch eine quantitative Real-time RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert. Bereits nach 3 Tagen ist eine deutliche Zunahme nachzuweisen, die nach 8-tägiger Behandlung 50 %
20 oder mehr und bei weiterer Behandlung bis zu 400 % betragen kann. Für die Analyse der G1P3 mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das PCR-Primer Paar G1P3-For1 (5'-GCTATTCACAGATGCGAACATAGTA-3') (SEQ ID NO: 118) und G1P3-Rev2 (5'-GGAGAGTGATAGACAAAGTTCTGGA-3') (SEQ ID NO: 119). Mit diesem Primer-Paar kann ein cDNA-Fragment amplifiziert werden, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid
25 der Länge 134 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primerpaar wurde auch ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid einer Länge 138 Aminosäuren aufweist. Darüber hinaus wurde mit diesem Primerpaar auch ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid einer Länge 130 Aminosäuren aufweist. Die Unterschiede lassen sich durch geringe Variationen in der Transkriptlänge im kodierenden
30 Bereich erklären.

Beispiel 4:

Die Zunahme der LOC222171-mRNA in NT2-N Nervenzellen kann in Micro-Array-Analysen mit fluoreszenzmarkierter cDNA nach Behandlung mit Haloperidol (wie in Beispiel 1
35 beschrieben) nachgewiesen werden. Diese Zunahme wurde durch eine quantitative Real-time

RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert. Nach 15 Tagen Haloperidol-Behandlung ist eine deutliche Zunahme nachzuweisen, die 50 % oder mehr beträgt und bei längerer Behandlung weiter ansteigen kann. Für die Analyse der LOC222171 mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das PCR-Primer Paar LOC222171-For1 (5'-
 5 TGGCTGTTATTTAGGACTCTGTGGAAA-3') (SEQ ID NO: 120) und LOC222171-Rev2 (5'-
 TCCCCCACTCCTTCACTTAAGGTATAA-3') (SEQ ID NO: 121). Mit diesem Primer-Paar kann ein cDNA-Fragment amplifiziert werden, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 129 Aminosäuren aufweist.

10 Beispiel 5:

Die Zunahme der CUEDC1-mRNA in NT2-N Nervenzellen kann in Micro-Array-Analysen mit fluoreszenzmarkierter cDNA nach Behandlung der Zellen mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) nachgewiesen werden. Diese Zunahme wurde mit einer quantitativen Real-time RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 näher
 15 quantifiziert. Nach 15 Tagen chronischen oxidativen Stresses ist eine mehr als 30 % ige Zunahme nachzuweisen, die bei längerer Behandlung weiter ansteigen kann. Für die Analyse der CUEDC1 mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das PCR-Primerpaar CUEDC1-For1 (5'-
 CTTATTCAGGGACAAGCTGAAACACAT-3') (SEQ ID NO: 122) und CUEDC1-Rev2 (5'-
 AGTGTTTCCTCTTTGACTTCCTCATTTT-3') (SEQ ID NO: 123). Mit diesem Primer-Paar
 20 kann ein cDNA-Fragment amplifiziert werden, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 386 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primerpaar kann auch ein cDNA-Fragment amplifiziert werden, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 358 Aminosäuren aufweist. Die Möglichkeit zwei Polypeptide nachzuweisen, liegt daran, dass AK000977 eine Deletion im kodierenden Bereich aufweist, wodurch ein um 28 Aminosäuren
 25 kürzeres Polypeptid entsteht, das sich ansonsten nur durch einen konservativen Aminosäureaustausch bei Aminosäure 47 des reifen Proteins von den anderen Primärstrukturen unterscheidet.

Beispiel 6:

30 Die Zunahme der NPC2-mRNA in NT2-N Nervenzellen nach Behandlung mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) wurde in Micro-Array-Analysen mit fluoreszenzmarkierter cDNA nachgewiesen. Diese Zunahme wurde durch eine quantitative Real-time RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert. Bereits nach 3 Tagen Behandlung ist eine signifikante Zunahme der NPC2-mRNA im Vergleich zu unbehandelten
 35 Nervenzellen nachzuweisen. Nach 15 Tagen chronischen subletalen oxidativen Stresses liegt die

Zunahme bei 50 % oder mehr und kann bei längerer Behandlung weiter ansteigen. Für die Analyse der NPC2-mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das PCR-Primer Paar NPC2-For1 (5'-AATTAAGTGGCCTATCCAAAAAGAC-3') (SEQ ID NO: 124) und NPC2-Rev2 (5'-CAGAAGAGACTTTGGTTTTTGTTCAT-3') (SEQ ID NO: 125). Mit diesem Primer-Paar wurde ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 151 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primerpaar wurde auch ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 151 Aminosäuren aufweist, welches sich durch zwei konservative Aminosäureaustausche vom erstgenannten Polypeptid unterscheidet.

Beispiel 7:

Die Zunahme der SCD-mRNA nach Behandlung von NT2-N Nervenzellen mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) wurde in Micro-Array-Analysen mit fluoreszenzmarkierter cDNA nachgewiesen. Diese Zunahme wurde durch eine quantitative Real-time RT-PCR (qRTRTPCR) Analyse mit Fluoreszenzmarkierung durch SYBR-Green 1 quantifiziert. Nach 15-tägiger Behandlung ist eine Zunahme der SCD-mRNA um 50 % oder mehr im Vergleich zu unbehandelten Nervenzellen nachzuweisen. Für die Analyse der SCD-mRNA durch qRTRTPCR eignet sich das PCR-Primer Paar SCD-For1 (5'-AAAGATGATATATATGACCCACCT-3') (SEQ ID NO: 126) und SCD-Rev2 (5'-CCAAGTGTAGCAGAGACATAAGGAT-3') (SEQ ID NO: 127). Mit diesem Primer-Paar wurde ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 359 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primer-Paar wurde auch ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 366 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primer-Paar wurde darüber hinaus ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 355 Aminosäuren aufweist. Mit diesem Primer-Paar wird ferner ein cDNA-Fragment amplifiziert, das einen kodierenden Bereich für ein Polypeptid der Länge 237 Aminosäuren aufweist.

Beispiel 8:

Die Zunahme des IDI1 Proteins (IDI1 = Isopentenyl-diphosphate delta isomerase 1; = Isopentenyl diphosphate dimethylallyl diphosphate isomerase 1) nach Behandlung von NT2-N Nervenzellen mit Haloperidol (wie in Beispiel 1 beschrieben) wurde mit einer 2 dimensional Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender massenspektroskopischer Identifizierung des Proteinspots nachgewiesen. Während einer 15 tägigen Behandlung mit Haloperidol nimmt IDI1-Protein um 30 % oder mehr in seiner Menge zu.

Patentansprüche

1. Verwendung von Nukleinsäuren oder der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteine, wobei die Nukleinsäuren und/oder die Proteine im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen zur Behandlung und/oder Prophylaxe von degenerativen Erkrankungen, Identifizierung, Überwachung, nosologischen Klassifizierung, Diagnose, prognostischen Beurteilung und Therapie von degenerativen Erkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Nukleinsäuren eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:1-63 und die Proteine eine Sequenz gemäß SEQ ID NO:64-113 aufweisen, sowie deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente.
3. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die degenerative Erkrankung eine neurodegenerative Erkrankung ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei die neurodegenerative Erkrankung *M. Alzheimer*, eine Lewy Body Erkrankungen wie *M. Parkinson*, eine diffuse Lewy Body Erkrankung, *M. Huntington*, Amyotrophe Laterale Sklerose (ALS), Prion-Erkrankung (PrD), Creutzfeldt-Jakob Erkrankung, Down-Syndrom, frontotemporale Demenz (FTD), Corticobasale Degeneration, Multiinfarkt-Demenz, progressive supranukleäre Lähmung, Multisystematrophie und Korsakoff's Syndrom ist.
5. Verfahren zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, welche die Expression von Nukleinsäuren und/oder Proteinen, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, modulieren, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
 - a) Bereitstellen einer Zelle, die eine Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, exprimiert
 - b) in Kontakt bringen der Zelle mit einer Kandidatensubstanz und
 - c) Vergleichen der Expression der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, mit der Expression einer Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, wenn die Kandidatensubstanz nicht hinzugefügt wird,wobei eine Veränderung der Expression der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit

chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, anzeigt, dass die Kandidatensubstanz ein Modulator der Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, ist.

- 5 6. Verfahren zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, die die biologische Aktivität von Proteinen modulieren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:
- 10 a) Bereitstellen einer Zelle, die ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, enthält bzw. Immobilisieren mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird auf einem Trägermaterial
- b) in Kontakt bringen der Zelle bzw. des Proteins auf dem Trägermaterial mit einer Kandidatensubstanz und
- 15 c) Detektion der Menge der gebundenen Kandidatensubstanz an ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird mittels biophysikalischer Methoden wie Plasmon-Surface-Resonanz, FRET, quantitative HPLC, BioAssays und Massenspektroskopie,
- wobei eine Bindung anzeigt, dass es sich um einen potentiellen Modulator handelt.
- 20 7. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 5 oder 6 zur Identifizierung von therapeutischen und/oder prophylaktischen Wirkstoffen, welche die Expression von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, bzw. die die biologische Aktivität der von diesen Nukleinsäuren kodierten Proteinen
- 25 modulieren, umfassend mindestens eine Zelle, die eine Nukleinsäure, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, exprimiert.
8. Verfahren zur Detektion und/oder Analyse von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, umfassend die folgenden Schritte:
- 30 a) Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Probe,
- b) Herstellung von cDNA oder optional vorherige Synthese von cRNA zur linearen Amplifizierung,
- c) Zugabe von Oligonukleotiden, die gegen ein Gen, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativem Stress reguliert ist, gerichtet sind und anschließende Amplifizierung
- 35 der cDNA aus Schritt b),

d) Analyse der Amplifikationsprodukte aus Schritt c).

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Analyse mittels einer Hybridisierung von chemisch modifizierten Oligonukleotiden oder mit komplementären Nukleinsäuresequenzen auf einem Biochip durchgeführt wird.

10. Verfahren zur Detektion und/oder Analyse von Nukleinsäuren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, umfassend die folgenden Schritte:

a) Isolierung von Nukleinsäuren aus einer Probe, wobei gegebenenfalls RNA direkt markiert wird,

b) Zugabe von Oligonukleotiden, die gegen ein Gen, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativem Stress reguliert ist, gerichtet sind und anschließende Hybridisierung mit den isolierten Nukleinsäuren aus Schritt a),

c) Analyse der Hybridisierungssignale.

11. Analyse- und/oder Diagnoseverfahren zur Bestimmung der Mengen der Proteine, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden, umfassend die folgenden Schritte:

a) Durchführung einer Mengenbestimmung mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, in einer isolierten Probe,

b) Vergleich mit den in einer Referenzprobe bestimmten Mengen mindestens eines Proteins, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, wobei die Referenzprobe von einem nicht an einer degenerativen Erkrankung leidenden Subjekt stammt,

wobei eine erhöhte Menge des mindestens einen Proteins in der in Schritt a) getesteten Probe im Vergleich zu der Menge des entsprechenden Proteins in der Referenzprobe auf das Vorliegen einer degenerativen Erkrankung oder das Risiko, an einer degenerativen Erkrankung zu erkranken, hinweist.

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Probe eine biologische Probe z.B. Gewebeprobe wie des Gehirns, oder Körperflüssigkeit wie Blut, Speichel, Serum oder cerebrospinaler Flüssigkeit (CSF) ist.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 und 8 bis 12, wobei die Nukleinsäuren

ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Nukleinsäuren mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 bis 63, und deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente, und/oder wobei die Proteine ausgewählt werden aus der Gruppe bestehend aus Proteinen mit einer Sequenz gemäß SEQ ID NO:64 bis 113, und deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente.

5

14. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 8-10 und 13, umfassend mindestens einen Primerpaar, wobei die Primer des mindestens einen Primerpaares an Nukleinsäuren hybridisieren, die im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert werden.

10

15. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 11 bis 13, umfassend mindestens einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper oder anderen Binder, der für ein Protein, das im Zusammenhang mit chronischem oxidativen Stress in Zellen reguliert wird, spezifisch ist und gegebenenfalls ein geeignetes Referenzprotein sowie ferner NMR-Tags, PET-

15 Sonden, Isotopentags für Massenspektroskopie und/oder Aptamere.

16. Zelle, umfassend mindestens eine rekombinante Nukleinsäure, die eine der SEQ ID NO:1 bis 63 aufweist, sowie deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente, wobei die rekombinante Nukleinsäure mit regulatorischen Kontrollelementen funktional verbunden ist.

20

17. Nicht-humaner transgener Organismus, umfassend mindestens eine rekombinante Nukleinsäure, die eine der SEQ ID NRs:1 bis 63 aufweist, sowie deren Homologe, Derivate, Varianten und Fragmente, wobei die rekombinante Nukleinsäure mit regulatorischen Kontrollelementen funktional verbunden ist.