

(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
16. August 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/58948 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07K 14/475, (74) Anwalt: WEICKMANN & WEICKMANN; Postfach
G01N 33/58, 33/68, 33/84 860 820, 81635 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/01424 (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,

(22) Internationales Anmeldedatum: 9. Februar 2001 (09.02.2001)
(25) Einreichungssprache: Deutsch
(81) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
(30) Angaben zur Priorität:
100 06 174.5 11. Februar 2000 (11.02.2000) DE
100 06 175.3 11. Februar 2000 (11.02.2000) DE
60/248,224 15. November 2000 (15.11.2000) US

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): PROTEOSYS GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE SYSTEMANALYSE MBH [DE/DE]; Kupferbergterrasse 17 -19, 55116 Mainz (DE).
Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHRATTENHOLZ, André [DE/DE]; Hinter der Kirche 49, 55129 Mainz (DE).
Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF NEUREGULIN- β AS AN INDICATOR AND/OR TARGET

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON NEUREGULIN- β ALS INDIKATOR UND/ODER TARGET

(57) Abstract: The invention relates inter alia to the use of neuregulin- β in a screening method for substances as the target, especially to the use of neuregulin- β in a screening method for substances as the target for influencing glutamate-receptor mediated calcium concentration changes. The invention further relates to the use of neuregulins, preferably of a neuregulin isoform with an isoelectric point in the range of from pH 4.3 to 5.0 as the target for detecting or influencing neuronal processes, especially for influencing long-term memory. Neuregulins, especially neuregulin- β and the substances that influence the status, that is the expression and/or posttranslational modification of neuregulin- β can therefore be used as agents for controlling the progression of neuronal diseases, for treating and/or mitigating such diseases, for example morbus Alzheimer.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft u.a. die Verwendung von Neuregulin- β in einem Screening-Verfahren für Wirkstoffe als Target, insbesondere die Verwendung von Neuregulin- β in einem Screening-Verfahren für Wirkstoffe als Target zur Beeinflussung von von Glutamatrezeptoren vermittelten Calcium-Konzentrationsänderungen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Neuregulinen, vorzugsweise einer Neuregulin-Isoform mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von pH 4,3 bis 5,0, als Target für den Nachweis bzw. die Beeinflussung neuronaler Prozesse, insbesondere für die Beeinflussung des Langzeitgedächtnisses. Neureguline, insbesondere Neuregulin- β und auch Substanzen, die den Status, d.h. die Expression oder/und posttranslationale Modifikation von Neuregulin- β beeinflussen, können daher als Mittel zur Verlaufskontrolle, Behandlung oder/und Linderung von neuronalen Erkrankungen, z.B. von Morbus Alzheimer eingesetzt werden.

WO 01/58948 A2

Verwendung von Neuregulin- β als Indikator und/oder Target

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Neuregulin- β als Indikator und/oder Target in einem Screening-Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Neuregulinen, vorzugsweise einer Neuregulin-Isoform mit einem isoelektrischen Punkt im Bereich von $\text{pH} \leq 7$, insbesondere $\text{pH} 4,3$ bis $5,0$, als Target für den Nachweis bzw. die Beeinflussung neuronaler Prozesse, insbesondere für die Beeinflussung des Langzeitgedächtnisses. Neureguline, insbesondere Neuregulin- β und auch Substanzen, die den Status, d.h. die Expression oder/und posttranslationale Modifikation von Neuregulin- β beeinflussen, können daher als Mittel zur Verlaufskontrolle, Behandlung oder/und Linderung von neuronalen Erkrankungen, z.B. von Morbus Alzheimer eingesetzt werden.

15

Neureguline (auch ARIA, neurogenic differentiation factors, Hereguline und DDF) gehören zu einer Familie weitverbreiteter und bekannter Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Beispielsweise ist in der Publikation von Ozaka M. et al., Nature 1997, Dec 10-25, 390(6661): 691-4 der induzierende Einfluss des Neuregulin- β auf die Expression der NR2C-Untereinheit des NMDA-Rezeptors beschrieben.

25

WO99/18976 beschreibt Verfahren zur Behandlung und/oder Prophylaxe von neurologischen Erkrankungen, umfassend die Verabreichung eines Neuregulins, oder eines Fragments oder Derivats eines Neuregulins, oder einer Nukleinsäure codierend ein Neuregulin oder ein Neuregulinfragment oder -derivat an einen Patienten. In WO99/18976 werden lediglich Untersuchungen auf Genebene durchgeführt. Da aus einem einzigen Gen durch Modifikationen auf Transkript- oder/und Proteinebene bis zu mehr als

30

- 2 -

100 unterschiedliche molekulare Proteinspezies entstehen können, sind die Angaben in WO99/18976 nicht ausreichend, um diejenigen Proteinspezies identifizieren zu können, die tatsächlich für neurologische Prozesse relevant sind.

5

WO98/55611 beschreibt die Verwendung eines 15 bp-langen Neuregulin-Response-Elements in therapeutischen Verfahren und Screening-Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen.

10 Seit einiger Zeit sind die Techniken der Proteom-Analyse eingeführt. Unter dem Begriff „Proteom“ ist die Gesamtheit aller exprimierten Proteine einer Zelle, eines Gewebes oder eines Organismus zu verstehen (siehe: „From Genome to Proteome“ von Michael J. Dunn, 2000, Wiley/VCH, Weinheim; „Proteome Research, Two-Dimensional Gel-Elektrophoresis and
15 Identification Methods“ von Thierry Rabilloud, 2000, Springer-Verlag, Berlin; siehe auch: „Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics“ von Marc R. Wilkins, u.a., 1997, Springer-Verlag, Berlin). Die Techniken der Proteom-Analyse sind die 2-D-PAGE (zweidimensionale Gelelektrophorese) zur Auftrennung der einzelnen Proteine aus einer
20 komplexen biologischen Probe und Methoden der Massenspektrometrie, insbesondere MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometry) und ESI-MS (electro spray ionisation mass spectrometry) (siehe: „Mass Spectrometry: Principles and Applications“, Edmond De Hoffmann, Jean Charette, Vincent Stroobant,
25 Jul Trottier (August 1996), John Wiley & Sons, ISBN: 0471966975).

Verfahren und Vorrichtungen zur Identifizierung biologisch aktiver Substanzen und ihre Wirkung auf lebende Zellen sind in US-Patent 5,721,135 beschrieben. US-Patent 5,089,385 beschreibt ein Verfahren zur
30 Kultivierung von Zellen in einem Durchfluss-Zellkultivierungssystem. US-Patent 5,134,062 beschreibt ein Verfahren zur Diagnose neuronaler Abnormitäten und zur Identifizierung potenzieller therapeutischer Wirkstoffe

- 3 -

zu deren Behandlung. DE-OS 19735926 beschreibt eine Anordnung zur Messung der NADH-Eigenfluoreszenz von Zellkulturen. WO90/05179 offenbart eine perfundierbare Zellkultur-Vorrichtung zur Expandierung und Kultivierung biologischer Zellen.

5

Während auf dem Gebiet der Genome die entsprechenden Analyse-Techniken wohl als ausgereift gelten können, fehlen auf dem Gebiet der

10 Proteome nach wie vor Techniken, die es einem erlauben, neben der eigentlichen Analyse von Proteinen und deren Bruchstücken auch die im Zusammenhang mit physiologischen Vorgängen stattfindenden komplexen zeitlichen Abläufe der verschiedensten Aktionen und Wechselwirkungen auch zeitlich aufgelöst zu erfassen und somit Rückschlüsse auf die eigentlichen physiologischen Vorgänge und die zugrundeliegenden
15 Interaktionen und deren Partner zu ziehen. Auf diesem Wege wäre es möglich, gezielt pharmazeutische Wirkstoffe zu testen.

In diesem Zusammenhang wird erfindungsgemäß unter dem Begriff „Effektraum-/Effektorraum-Analyse“ Folgendes verstanden:

20

Ein Effektraum ist definiert durch ein Koordinatensystem, bei dem jede Koordinate die möglichen Größen oder Amplituden eines Effekts repräsentieren, z.B. die möglichen Konzentrationen des intrazellulären Calciums, die unter physiologischen und pathophysiologischen Umständen
25 in einer Nervenzelle erreicht werden können. Alle in Betracht zu ziehenden Effekte bilden dann den Effektraum, bei drei möglichen Effekten ist ein solcher Effektraum dreidimensional, bei n Effekten n-dimensional.

Gleiches gilt für die Betrachtung der Konzentrationen von Effektoren, z.B. Neurotransmittern etc. Die „Effektraum-/Effektorraum-Analyse“ integriert
30 experimentelle Bestimmungen/Messungen zu den Konditionen von Effekten und Effektoren in einem gegebenen System im Hinblick auf den medizinisch/physiologisch interessanten Übergang zwischen Effektraum

- 4 -

und Effektorraum, der durch Affinitäten, Reaktions- und Transport- und andere kinetische Parameter definiert wird.

5 Beim Screening von Wirkstoffen ist mindestens ein Parameter, also ein Indikator oder ein Target, für den betrachteten Effektraum eines Zellsystems notwendig, um das Screening als solches zu ermöglichen. Daneben können jedoch unabhängig hiervon bzw. als quasi Vorstufe zum Screening durch genaue Beobachtung und Auswertung der einzelnen Ergebnisse mittels Korrelationsanalyse auch Indikatoren und/oder Targets 10 ermittelt werden. Unter Indikatoren im erfindungsgemäßen Sinne werden Stoffe bezeichnet, die in einem Effektraum einen Parameter darstellen, da sie bei zu untersuchenden physiologischen Vorgängen aktiv in Erscheinung treten, beispielsweise durch Konzentrationsänderung und somit quasi sichtbar und effektraumgebunden bzw. systemgebunden eben einen 15 Indikator darstellen. Im Allgemeinen werden die zu untersuchenden Zellsysteme mit einer bestimmten Substanz stimuliert, beispielsweise mit Glutamat, die Ergebnisse aufgezeichnet, miteinander korreliert und ggfs. neue Indikatoren herausgefunden. Die Indikatoren stehen dabei in der Regel nicht direkt, sondern über mehrere Schritte indirekt kausal mit den 20 Stimulierungen in Verbindung. Unter dem Begriff Target werden erfindungsgemäß Stoffe bezeichnet, die in einem Effektraum einen Parameter darstellen, da sie bei zu untersuchenden physiologischen Vorgängen aktiv in Erscheinung treten, beispielsweise durch Konzentrationsänderung und somit quasi sichtbar und effektraumgebunden 25 bzw. systemgebunden eben einen speziellen Typ von Indikator darstellen. Im Allgemeinen werden die zu untersuchenden Zellsysteme mit einer bestimmten Substanz stimuliert, beispielsweise mit Glutamat, die Ergebnisse aufgezeichnet, miteinander korreliert und ggfs. diese neuen speziellen Indikatoren herausgefunden. Diese speziellen Indikatoren, 30 nämlich die Targets, stehen dabei in der Regel nicht über mehrere Schritte indirekt – wie bei den eigentlichen Indikatoren - sondern direkt kausal mit den Stimulierungen in Verbindung. Somit ist jeder Indikator potentiell ein

- 5 -

Target und umgekehrt; dies hängt selbstverständlich vom zu untersuchenden Zellsystem und dem Effektraum ab.

Ein Problem der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine solche Zielstruktur in einem Screening-Verfahren für Wirkstoffe bereitzustellen. Ein weiteres Problem der vorliegenden Erfindung ist es, neue Targets zur Beeinflussung neuronaler Prozesse aufzufinden.

Diese Probleme werden durch den Gegenstand der Anmeldung gelöst.

Zunächst geht es erfindungsgemäß um die Verwendung von Neuregulin- β als Indikator und/oder Target in einem Screening-Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen, insbesondere von Wirkstoffen zur Beeinflussung neuronaler Prozesse. Es konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass Neuregulin- β als Indikator und/oder Target in einem solchen Screening-Verfahren eingesetzt werden kann. Das Screening-Verfahren kann für Wirkstoffe zur Beeinflussung von von Glutamatrezeptoren vermittelten Calcium-Konzentrationsänderungen (unter Calcium ist hier Ca^{2+} zu verstehen) eingesetzt werden und zur Erfassung von multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen dienen.

Weiterhin geht es erfindungsgemäß um die Verwendung von Neuregulin- β als Indikator bzw. Target in Verfahren zum Nachweis bzw. zur Beeinflussung neuronaler Prozesse. Die Verwendung als Target beinhaltet dabei eine Modulation der Aktivität, Menge und/oder des molekularen Status hinsichtlich posttranslationaler Modifikationen (PTM) von Neuregulin- β in einer Zielzelle, z.B. einem Zielgewebe oder Zielorgan. Vorzugsweise sind die Zielzellen neuronale Zellen.

Schließlich betrifft die Erfindung auch neue Neuregulin- β Isoformen, z.B. PTM-Varianten, die isoelektrische Punkte von $\text{pH} \leq 7$ und besonders bevorzugt isoelektrische Punkte im pH-Bereich zwischen 4,3 und 5,0,

- 6 -

insbesondere zwischen pH 4,5 und 4,7, aufweisen. Diese neuen Neuregulin- β Isoformen und PTM-Varianten sind von besonderer Bedeutung für neuronale Prozesse.

5 Bei dem Verfahren zur Erfassung von multidimensionalen Funktionsdaten für die Effekt-/Effektraum-Analyse von Wirkstoffen werden zunächst in eine Fließzell-Vorrichtung eingebrachte und auf Substraten aufgebrachte Zellkultursysteme mit jeweils geeigneten Markierungssubstanzen, z.B. Fluoreszenzfarbstoffen und/oder mit Isotopengemischen verschiedener
10 Elemente inkubiert. Anschließend werden die Zellkultursysteme stimuliert und zeitlich synchron die in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen resultierenden Fluoreszenzsignale direkt am Zellkultursystem zeitlich aufgelöst erfasst und/oder die Isotopengemische im Perfusat zeitlich aufgelöst erfasst und/oder die Isotopengemische direkt an den
15 Zellkultursystemen zeitlich integral erfasst, wobei eine synchronisierte Fraktionierung und weitergehende Analyse des Perfusates, eine Charakterisierung und Identifizierung von sich unter den gewählten Bedingungen verändernden und/oder spezifisch verhaltenden Proteinen der Zellkultursysteme und schließlich eine Integration der gewonnenen
20 multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen vorgenommen wird.

Dieses oben beschriebene Verfahren für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse und zur Durchführung des Verfahrens geeignete Vorrichtungen
25 sind auch in allgemeiner Form, d.h. nicht in Zusammenhang mit Neuregulin, eine selbständige Erfindung und somit Gegenstand der vorliegenden Anmeldung.

Erfindungsgemäß sind unter den Begriffen „LTP“ und „LTD“ „Langzeit-Potenzierung“ und „Langzeit-Depression“ zu verstehen. Es konnte
30 überraschenderweise die direkte Beteiligung von Neuregulin- β an neuronalen Langzeit-Prozessen gezeigt werden, die durch glutamat-

- 7 -

induzierte Änderungen der intrazellulären Calcium-Konzentrationen über die NMDA-Rezeptoren vermittelt wird (allgemeine Literaturhinweise: Anwyl R., „The role of amino acid receptors in synaptic plasticity“, in: Cortical plasticity, LTP and LTD (Fazeli M.S. & Collingridge G.L. eds.) Bios. Scientific Publishers, Oxford, 9-28 (1996); Cormier, R.J., Mauk, M.D. & Kelly, P. „Glutamate iontophoresis induces long-term potentiation in the absence of evoked presynaptic activity“, Neuron 10, 907-919 (1993); Malgaroli, A. & Tsien, R.W. „Glutamate-induced long-term potentiation of the frequency of miniature synaptic currents in cultured hippocampal neurons“, Nature 357, 134-139 (1992); Soskic-V, Gorlach M., Poznanovic S., Boehmer F.D., Godovac-Zimmermann J., „Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the platelet-derived growth factor beta receptor“, Biochemistry 38, 1757-64 (1999); Wong et al., „The anticonvulsant MK-801 is a potent NMDA antagonist“, Proc. Natl Acad Sci USA 83, 7104-7106 (1986)).

Erfindungswesentlich ist die Tatsache, dass lediglich und auf überraschende Art und Weise nur mit Hilfe der speziellen und synchronen Zusammenschaltung der oben genannten Arbeitsschritte es erstmals möglich ist, die hohen Anforderungen an die Reproduzierbarkeit der einzusetzenden Analysetechniken für solch zu untersuchende Zellsysteme zu gewährleisten (es handelt sich um chaotische Systeme). Eine sukzessive Anwendung der einzelnen Analyseschritte würde nicht zu den gewünschten auswertbaren Ergebnissen führen.

Zunächst ist es vorteilhaft, wenn das Neuregulin- β als Indikator und/oder Target zur Beeinflussung von LTP, LTD, epileptiformen und/oder epileptogenen Ereignissen und/oder erregungs-toxischen Phänomenen eingesetzt wird, da aus den unten gezeigten Ergebnissen hervorgeht, dass Neuregulin- β ein charakteristischer Schlüsselfaktor bei den gedächtnis-relevanten physiologischen Phänomenen LTP/LTD ist.

- 8 -

Es ist vorteilhaft, wenn die Zellkultursysteme auf in die Fließzell-Vorrichtung zu applizierende Objektträger kultiviert werden, da nur so gewährleistet ist, dass die Zellen auf schnellstmöglichem Weg intakt und ohne Ablösungen den Funktionstests zugeführt wird.

5

Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die in die Fließzell-Vorrichtung eingebrachte Zellkultursysteme zunächst mikroskopisch charakterisiert werden, um die basalen Voraussetzungen für weitere funktionelle Anwendungen zu überprüfen.

10

Die mikroskopische Charakterisierung ist vorteilhafterweise eine morphologische Charakterisierung im Phasenkontrast oder eine videomikroskopische Erfassung vom Zellverhalten unter Einfluss verschiedener physikalischer Parameter und/oder in Abhängigkeit von den Substraten, da die genannten Parameter am besten eine schnelle Einschätzung der Intaktheit und Lebensfähigkeit der Zellen erlauben.

15

Bei Verwendung von Fluoreszenzmarkierungen wird die Inkubation in vorteilhafter Weise, da in der Praxis bewährt, mittels Fura-2, Indo-1, Bis-Fura-2, Quin-2 und Derivate, Mag-Fura-2, Mag-Fura-5 und/oder Mag-Indo-1 als Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt. Darüber hinaus sind noch weitere Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise Anthracen-9,10-dipropionsäure einsetzbar. Bei den zuerst genannten Namen handelt es sich um Trivialnamen allgemein bekannter Fluoreszenzfarbstoffe, die auch im Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th edition, R.P. Haugland, 1996, Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA aufgeführt sind.

20

Bei Verwendung von Isotopenmarkierungen wird die Inkubation vorteilhafterweise mittels eines Isotopengemisches in Form von Ionen oder Verbindungen mindestens eines der Elemente Wasserstoff, Calcium, Magnesium, Zink, Mangan, Selen, Kupfer, Cadmium, Cobalt, Kohlenstoff, Stickstoff, Eisen, Sauerstoff, Schwefel und Phosphor durchgeführt, da

25

30

- 9 -

diese Elemente die wichtigsten Elemente sind, die in lebenden Systemen vorkommen.

Es ist von Vorteil, wenn die Stimulation mittels Liganden von glutamatergen, GABA-ergen, cholinergen Liganden durchgeführt wird, da sich diese in der Praxis bewährt haben. Weiterhin sind Liganden für Serotonin-, Catecholamin-, Opioid-, Melatonin-, Peptid-Rezeptoren, spannungsgesteuerte Ionen-Kanäle, Transportsysteme für Neurotransmitter, Ionen und Metabolite denkbar. Als Agonisten sind insbesondere Acetylcholin und Nicotin zu nennen.

Weiterhin ist es von Vorteil, wenn die zeitlich aufgelöste Erfassung der Isotopengemische im Perfusat mittels ICP-MS und/oder die zeitlich integrale Erfassung der Isotopengemische mittels ICP-MS durchgeführt wird, da es zum einen möglich ist, zeitgleiche extrem empfindliche Konzentrationsmessungen beliebiger Elemente durchzuführen und zum anderen bei Verwendung geeigneter stabiler Isotopenmarker kompartiment-spezifische Verteilungen bestimmter Elemente/Ionen zu analysieren.

Außerdem wird in vorteilhafter Weise die weitergehende Analyse des Perfusates mittels Fluoreszenz-HPLC und/oder mit Hilfe von enzymgekoppelten Säulen und/oder elektrochemisch oder fluorometrisch (siehe hierzu: Klapproth H., Reinheimer T., Metzen J., Munch M., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., Hohle K.D., Schemann M., Racke K., Wessler I., 1997, Non-neuronal acetylcholine, a signalling molecule synthesized by surface cells of rat and man, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol., 355(4): 515-23; oder Rieny J., Tucek S., Vins I., 1992, Sensitive method for HPLC determination of acetylcholine, choline and their analogues using fluorometric detection, J. Neurosci Methods, 41(1): 11 – 17) und/oder massenspektrometrisch, beispielsweise mittels EI-MS (Elektronenstoß-Ionisations-Massenspektrometrie; Proben werden durch einen Elektronenstrahl ionisiert), FAB-MS (fast atom bombardement mass

- 10 -

spectrometry: Proben werden durch Beschuß mit Edelgas-Atomen ionisiert), FD-MS (Feld-Desorptions-Massenspektrometrie; unter dem Einfluss hoher elektrischer Felder werden von einem Draht, auf den eine feste Probe aufgetragen ist, positive Ionen desorbiert und analysiert),
5 MALDI-TOF-MS und ESI-MS durchgeführt, da sich diese Methoden in der Praxis bewährt haben.

Es ist von Vorteil, wenn bei der Analyse das Perfusat mit Fluoreszenzmarkierungen derivatisiert wird, und die Markierungen
10 anschließend über HPLC mit einem Fluoreszenzdetektor identifiziert und quantifiziert werden, da auf diese Weise die erforderlichen hohen Empfindlichkeiten erreicht werden, um in den relativ kleinen Volumina der Fließzell-Vorrichtung die in Frage kommenden Stoffe in einem Arbeitsgang nachweisen (1- 50 Femto-Mole).

15 Folgende Ausführungsformen haben sich in vorteilhafter Weise in der Praxis bewährt:

Bei der Analyse von Aminosäuren werden diese mit o-Phthaldialdehyd und
20 2-Mercaptoethanol unter alkalischen Bedingungen derivatisiert und anschließend identifiziert. Alternativ können Aminosäuren auch durch Derivatisierung mit anderen Reagenzien, wie etwa 6-Aminochinoly-N-hydroxysuccinimidylcarbamate oder anderen Carbamaten oder Phenylisothiocyanaten derivatisiert werden (vgl. z.B. Bidlingmeyer et al., J.
25 Chromatogr. 336 (1984), 93 - 104; Iwaki et al., J. Chromatogr. 407 (1987), 273 - 279; Cohen und Strydom, Anal. Biochem. 174 (1988), 1 - 16; Cohen et al.: "Compositional Protein Analysis Using 6-Aminoquinoly-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, a Novel Derivatization Reagent", in: Techniques in Protein Chemistry IV, R.H. Angeletti, Hrsg. (1993),
30 Academic Press, San Diego, CA.; Strydom und Cohen: "Sensitive Analysis of Cystine/Cysteine using 6-Aminoquinoly-N-Hydroxysuccinimidyl

- 11 -

Carbamate (AQC) Derivatives", in: Techniques in Protein Chemistry IV, R.H. Angeletti, Hrsg. (1993), Academic Press, San Diego, CA).

Bei der Analyse von Catecholaminen werden diese vorzugsweise mit
5 Benzylamin unter Einfluss von Kaliumhexacyanoferrat zu fluoreszierenden
Verbindungen derivatisiert und anschließend identifiziert. Bei der Analyse
von Acetylcholin und Cholin werden diese vorzugsweise elektrochemisch
mit Hilfe einer enzymgekoppelten Säule detektiert. Bei der Analyse von
10 Nukleotiden, insbesondere Adenin-Nukleotiden, werden diese vorzugsweise
durch Reaktion mit Chloracetaldehyd derivatisiert und als Etheno-
Verbindungen detektiert.

Die Charakterisierung und Identifizierung von sich unter den gewählten
Bedingungen verändernden und/oder spezifisch verhaltenden Proteinen der
15 Zellkultursysteme wird mittels 2-D-PAGE und MALDI-TOF-MS und/oder ESI-
MS durchgeführt, da sich diese Methoden in der Praxis bewährt haben.

Es ist von Vorteil, wenn alle Messungen temperaturkontrolliert durchgeführt
werden, da Änderungen der Temperatur um 0,5 – 1 °C, insbesondere im
20 Zentralnervensystem, eine wichtige physiologische Rolle spielen (siehe:
Kavanau, J.L., „Memory, sleep and the evolution of mechanisms of
synaptic efficacy maintenance“, 1997, Neuroscience, 79, 7 – 44).

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren kann das Zellwachstum und
25 Zellverhalten auf und bezüglich für die Zellkultursysteme verwendeten
Trägern analysiert werden, so dass in vorteilhafter Weise alle
interessierenden Eigenschaften der Trägermaterialien, insbesondere in
Bezug auf künstliche Ersatzstoffe in der Implantationsmedizin aber auch in
Bezug auf die Authentizität von Zellkultursystemen für ihren jeweiligen
30 Krankheits- oder Gewebe-Modellcharakter, analysiert werden können und
folglich eine Validierung der verwendeten Modellsysteme möglich ist.

Aus dem Stand der Technik bekannt sind Fließzell-Vorrichtungen (Firma GlycoTech Corporation; siehe www.Glycotech.com), die insbesondere eine Kammerhöhe von ca. 150 μm aufweisen, die aber für die erfindungsgemäßen Zwecke nicht geeignet sind.

5

Eine erfindungsgemäße Fließzell-Vorrichtung, insbesondere für den Einsatz in Verfahren zur Erfassung von multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen, mit Grundplatte mit Strömungskanal, Oberplatte und Verschlußring, ist dadurch gekennzeichnet, dass die von der Grundplatte mit Strömungskanal und der aufliegenden Deckplatte gebildeten Kammer eine Kammerhöhe von 30 bis 100 μm aufweist. Die individuell einstellbare Kammerhöhe ist in vorteilhafter Weise mittels in mindestens einer der beiden Platten (Ober- und Grundplatte) einzulassenden Stiften, insbesondere aus Metall oder Teflon, zu realisieren.

15

Mit einer solchen Fließzell-Vorrichtung ist es erstmals möglich durch die spezifische Ausgestaltung, insbesondere niedermolekulare Transmitterfreisetzungen durch neuronale Zellen nachzuweisen. Durch ein besonders günstiges Zellen-/Volumen-Verhältnis ist eine physiologische Scherrate der Flüssigkeit auf den Zellen überraschenderweise überhaupt erst realisierbar. Physiologische Scherraten sind diejenigen Scherraten, wie sie beispielsweise in Blutgefäßen oder anderen biologischen Hohlräumen, in denen sich bewegte Flüssigkeiten befinden, auftreten können (0,1 – 5 Pa).

Durch die sehr hoch ausgeprägte Strömungslaminarität sind gleichmäßige Verteilungen von Wirkstoffen und gleichmäßige Bedingungen an nahezu allen Punkten der Durchfließ-Vorrichtung vorhanden. Darüber hinaus ist eine unmittelbare Lyse von Präparaten möglich.

20

25

Mit dieser Fließzell-Vorrichtung ist es erstmals möglich, die sehr hohen Anforderungen bezüglich der Empfindlichkeit der abgegebenen Stoffe so zu erfüllen, dass zuverlässige Konzentrationsaussagen bezüglich dieser Stoffe

30

möglich sind (bei zu großen Volumina wären die Konzentrationen der einzelnen Stoffe zu gering).

Zunächst ist es vorteilhaft, wenn die Kammerhöhe der Fließzell-Vorrichtung
5 30 bis 50 μm beträgt, da so ein für die Mikroskopie optimaler
Objektstand im Hinblick auf hohe Vergrößerungen und große
Lichtausbeuten gewährleistet wird. Außerdem wird durch das kleine
Volumen der Fließzell-Vorrichtung eine zu große Verdünnung der durch die
Zellen abgegebenen Stoffe verhindert; desweiteren ergibt sich durch diese
10 Geometrie eine sehr günstige Reynold-Zahl für laminare Strömung.

In vorteilhafter Weise sind die Zu- und Ableitungen nahezu in der
Strömungskanal-Ebene angeordnet, um Turbulenzen zu vermeiden.

15 In vorteilhafter Weise sind die Innenoberflächen der Kammer nahezu planar
ausgebildet, da auf diese Art und Weise gleichmäßige Bedingungen in
Bezug auf Druck, Scherraten und die Mikroskopie (Justierung der Ebenen)
zu gewährleisten sind.

20 Weiterhin weist die Fließzell-Vorrichtung zusätzlich ein Objektträger-
Aufnahmerahmen zwischen Grund- und Oberplatte auf, um Norm-
Objektträger aufnehmen zu können. Dies stellt eine Kompatibilität mit
Laborautomaten für die Histologie und/oder Immuncytochemie sicher.

25 Der Objektträger-Aufnahmerahmen ist metallisch, um in vorteilhafter Weise
hohe mechanische Festigkeit und Verbindungssteifigkeit zu erreichen und
eine Sterilisation bei $T \geq + 100 \text{ }^\circ\text{C}$ zu ermöglichen.

30 Die Fließzell-Vorrichtung weist vorteilhafterweise eine elastische Dichtung
zwischen Grund- und Oberplatte auf, da so ein definierter Abstand und die
Dichtigkeit der Kammer gewährleistet sind.

- 14 -

Es ist von Vorteil, wenn die elastische Dichtung aus Silikon besteht, weil dieses Material unter Standardbedingungen autoklavierbar ist und im Hinblick auf die Zellverträglichkeit neutrale Eigenschaften aufweist.

5 Die Grund- und/oder Oberplatte besteht vorteilhafterweise aus Polycarbonat, da dieses Material Transparenz (UV/Vis) für alle in Frage kommenden mikroskopischen Techniken gewährleistet.

10 Die Fließzell-Vorrichtung weist in bewährter Weise mehrere nahezu parallel angeordnete Kammern auf, um mehrere Wirkstoffe unter exakt gleichen Bedingungen im Hinblick auf die Zell-Populationen zu testen.

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich in besonderer Weise zum Screening für Wirkstoffe, insbesondere zur Ermittlung von Targets. Unter dem Begriff "Targets" werden Zielstrukturen verstanden. Hierbei handelt es sich um Proteine oder Metabolite, denen eine entscheidende Schlüsselfunktion bei einem krankheitsrelevanten physiologischen Prozeß zukommt und die sich deswegen besonders als Angriffsziel von Wirkstoffen qualifizieren. Die Identifizierung eines Targets erlaubt die Durchführung weiterer Screening-Verfahren, um Wirkstoffe zu identifizieren, bei denen es sich um Modulatoren, d.h. Aktivatoren oder Inhibitoren des Targets handelt.

25 Darüber hinaus eignen sich die verschiedenen Träger für Zellkultursysteme im erfindungsgemäßen Verfahren zur Analyse des Zellwachstums und Zellverhaltens.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Erfassung von multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen, insbesondere zur Durchführung eines oben beschriebenen Verfahrens enthält:

- eine Fließzell-Vorrichtung,

- 15 -

- eine Einrichtung zur Stimulation der Zellkultursysteme,
- eine Einrichtung zur synchronen und zeitlich aufgelösten direkten Erfassung von in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen resultierenden Fluoreszenzsignalen an den Zellkultursystemen und/oder eine Einrichtung zur zeitlich aufgelösten Erfassung von Isotopengemischen im Perfusat und/oder eine Einrichtung zur zeitlich integralen Erfassung von Isotopengemischen direkt an den Zellkultursystemen,
- eine Einrichtung zur synchronisierten Fraktionierung und weitergehenden Analyse des Perfusates,
- eine Einrichtung zur Charakterisierung und Identifizierung von sich unter den gewählten Bedingungen verändernden und/oder spezifisch verhaltenden Proteinen der Zellkultursysteme und
- eine Einrichtung zur Integration der gewonnenen multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen.

Es ist auf Grund der oben beschriebenen vorteilhaften Eigenschaften von Vorteil, wenn die erfindungsgemäße Vorrichtung eine Fließzell-Vorrichtung der oben beschriebenen Art aufweist.

Die folgenden Ausgestaltungen haben sich in der Praxis bewährt und sind aus den zum erfindungsgemäßen Verfahren genannten Gründen als vorteilhaft anzusehen:

Die Einrichtung zur Stimulation der Zellkultursysteme ist ein computergesteuertes Applikationssystem.

Die Einrichtung zur synchronen und zeitlich aufgelösten direkten Erfassung von in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen resultierenden Fluoreszenzsignalen an den Zellkultursystemen ist eine Fluoreszenzspektroskopie-Einrichtung.

- 16 -

Die Einrichtung zur zeitlich aufgelösten Erfassung von Isotopengemischen im Perfusat ist eine ICP-MS-Einrichtung (siehe hierzu: ICP Spectrometry and Its Applications von Steve J. Hill (Herausgeber), 2000, CRC Press, ISBN: 0849397391).

5

Die Einrichtung zur zeitlich integralen Erfassung von Isotopengemischen direkt an den Zellkultursystemen ist eine ICP-MS-Einrichtung.

Die Einrichtung zur synchronisierten Fraktionierung und weitergehenden Analyse des Perfusates weist einen computergesteuerten Fraktionssammler und eine HPLC-Einrichtung mit Fluoreszenzdetektor und/oder eine Einrichtung mit enzymgekoppelten Säulen und/oder eine Einrichtung mit elektrochemischer oder fluorometrischer Detektion und/oder ein Massenspektrometer auf.

15

Die Einrichtung zur Charakterisierung und Identifizierung von sich unter den gewählten Bedingungen verändernden und/oder spezifisch verhaltenden Proteinen der Zellkultursysteme umfaßt eine 2-D-PAGE-Einrichtung und eine MALDI-TOF-MS-Einrichtung und/oder ESI-MS-Einrichtung.

20

Die Einrichtung zur Integration der gewonnenen multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen ist eine datenbankgestützte Computer-Einrichtung.

25

Die Einrichtung zur Analyse des Zellwachstums und des Zellverhaltens auf und bezüglich für die Zellkultursysteme verwendeten Trägern ist eine computergestützte Bildanalyse-Einrichtung mit einem Videomikroskop.

30

Die Ergebnisse der erfindungsgemäßen Verwendungen können selbstverständlich auch als Zwischenergebnisse für Diagnoseverfahren verwendet werden. Die Ergebnisse dienen somit quasi als

- 17 -

Entscheidungsgrundlage für das weitere Vorgehen bzw. bestimmen den weiteren Verlauf innerhalb eines bestimmten Diagnoseverfahrens.

5 Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Neuregulin- β als Indikator in einem Verfahren zum Nachweis neuronaler Prozesse. Dieses Verfahren ist vorzugsweise ein diagnostisches Verfahren, umfassend die Bestimmung des Vorhandenseins, der Konzentration und/oder der Aktivität von Neuregulin- β in einer zu untersuchenden Probe (in vitro Diagnose) oder einem zu untersuchenden Organismus (in vivo
10 Diagnose). Ein derartiges Diagnoseverfahren kann beispielsweise einen Nachweis auf Proteinebene, z.B. unter Verwendung von Antikörpern, oder einen Nachweis auf Transkriptebene, z.B. durch Northern Blots, reverse Transkription und/oder Amplifikationsprozesse umfassen. Die Durchführung derartiger Diagnoseverfahren ist dem Fachmann grundsätzlich bekannt.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Neuregulin- β als Target in einem Verfahren zur Beeinflussung neuronaler Prozesse. Dieses Verfahren kann eine Veränderung, z.B. eine Verringerung oder Erhöhung, der Konzentration und/oder Aktivität von Neuregulin- β , vorzugsweise im
20 Bereich des Gehirns, des Rückenmarks und/oder der Nervenzellen umfassen. Dieses Verfahren kann die Verabreichung von Neuregulin- β Inhibitoren, z.B. Antikörper oder niedermolekulare Substanzen und/oder die Verabreichung von Neuregulin- β Antisense Nukleinsäuren umfassen, falls eine Verringerung der Neuregulin- β Konzentration und/oder Aktivität
25 gewünscht wird. Andererseits kann eine Verabreichung von Neuregulin- β oder einer dafür kodierenden Nukleinsäure an einen Zielort im Organismus erfolgen, falls eine Erhöhung der Neuregulin- β Menge und/oder Aktivität gewünscht wird. Die Verabreichung von Neuregulin- β kann in freier Form oder assoziiert an einen geeigneten Träger, z.B. an Vehikel wie Mizellen,
30 Liposomen etc. erfolgen. Verabreichung von Neuregulin- β kodierenden Nukleinsäuren kann in Form von so genannter "nackter" DNA oder in Form

- 18 -

von Vehikeln wie zuvor angegeben oder alternativ in Form von viralen Vektoren, z.B. Adenoviren, Retroviren etc. erfolgen.

Alternativ oder zusätzlich kann auch eine Verabreichung von Substanzen erfolgen, die die Expression und/oder den Status von Neuregulin- β beeinflussen. Derartige Substanzen, z.B. Inhibitoren oder Aktivatoren, können auf einfache Weise durch das erfindungsgemäße Effektraum/Effektorraum-Analyseverfahren oder durch andere Screening-Verfahren identifiziert werden. Die Erfindung umfasst daher auch solche Substanzen, zB. niedermolekulare Wirkstoffe und/oder biologische Substanzen, z.B. Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäuren etc., und daraus durch Modifikationen abgeleitete Substanzen sowie deren Anwendung in diagnostischen und therapeutischen Verfahren.

In einer bevorzugten Ausführungsform der diagnostischen und therapeutischen Verfahren erfolgt ein Nachweis bzw. eine Beeinflussung von neuronalen Erkrankungen, insbesondere neuronalen degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer. So ist beispielsweise eine Verwendung bei der Verlaufskontrolle von neurodegenerativen Erkrankungen denkbar. Überraschenderweise wurde nämlich festgestellt, dass die Nervenzellen von Patienten mit Morbus Alzheimer eine insgesamt schwächer positive Reaktion mit Anti-Neuregulin- β -Antikörpern als Normalpersonen aufweisen.

Schließlich betrifft die Erfindung neue Neuregulin- β Isoformen, z.B. PTM-Modifikationen, mit einem sauren isoelektrischen Punkt, vorzugsweise im pH-Bereich von 4,3 bis 5,0. Die erfindungsgemäße Neuregulin-Isoform hat eine apparente Molekularmasse (SDS-PAGE) von etwa 32 kD und tritt nach Stimulation im erfindungsgemäßen Effekt/Effektraum-Analyseverfahren in erheblich höheren Mengen als ohne Stimulation oder bei Kontrollen auf. Das Protein enthält - wie durch massenspektroskopische Analyse nachgewiesen - Peptidteilfragmente entsprechend den Peptiden 81 bis 87

und 88 bis 94 von Neuregulin- β . Neben dem Protein mit vollständiger Sequenz erfasst die Erfindung auch physiologisch aktive Derivate und Fragmente davon. Derartige Derivate und Fragmente können durch rekombinante Expression entsprechender mutagenisierter Nukleinsäuresequenzen bzw. durch proteolytische Spaltung erhalten werden.

Die erfindungsgemäßen Neuregulin- β Isoformen können aus neuronalen Säugerzellen, z.B. Rattenzellen oder menschlichen Zellen, durch bekannte Methoden, z.B. Immunadsorption unter Verwendung geeigneter Antikörper gegebenenfalls in Kombination mit einer isoelektrischen Fraktionierung gewonnen werden.

Die nachfolgenden Beispiele und Figuren dienen zur Erläuterung der Erfindung.

Es zeigen:

- Figur 1** eine Aufsicht einer erfindungsgemäßen Fließzell-Vorrichtung,
- Figur 2** ein Querschnitt einer in Figur 1 gezeigten Fließzell-Vorrichtung,
- Figur 3** eine Aufsicht einer weiteren Fließzell-Vorrichtung.
- Figur 4** ein 2-D-PAGE von glutamat-induzierten Änderungen hippocampaler Proteine,
- Figur 5** eine Identifikation von Neuregulin- β durch MS/MS-Analyse mittels ESI-MS.

30

Figur 1 ist eine Aufsicht einer erfindungsgemäßen Fließzell-Vorrichtung. Eine Grundplatte (1) weist einen Strömungskanal (2) auf. Auf

- 20 -

der Grundplatte (1) liegt zentrosymmetrisch ein Verschlußring (4). Weiterhin ist ein auf der Grundplatte (1) liegender Objektträger-Aufnahmerahmen (7) zu erkennen.

5 **Figur 2** ist ein Querschnitt einer in Figur 1 gezeigten Fließzell-Vorrichtung. Dort sind neben den oben erwähnten Merkmalen weiterhin die folgenden zu erkennen: Der Verschlußring (4) klemmt die Grundplatte (1) mit einer Oberplatte (3) mit Hilfe einer Silikondichtung (8) abdichtend zusammen. (Nicht näher eingezeichnete) in beide Platten (1, 3)
10 eingelassene Stifte sorgen für eine gewisse Beabstandung und somit Festlegung einer Kammerhöhe. Der nunmehr mittels der Oberplatte (3) von oben geschlossene Strömungskanal (2) bildet eine Kammer, die eigentliche Kammer, in der die Wechselwirkungen zwischen Zellkulturen und über Zu- und Ableitungen (5, 6) ein- und abfließenden Strömungsmedien stattfinden.

15

Figur 3 ist eine Aufsicht einer weiteren Fließzell-Vorrichtung. Dort sind schematisch insgesamt drei Strömungskanäle (2) zu erkennen.

In **Figur 4** ist ein 2-D-PAGE von glutamat-induzierten Änderungen
20 hippocampaler Proteine zu erkennen. Hippocampale Zellen wurden mit Stimulationspuffer stimuliert (in mM): NaCl (125), KCL (5), CaCl₂ (2-6), MgCl₂ (0,8), Glucose (5-10), HEPES (20), L-Glutamat (0,01-0,1), Glycin (0,01), Bicucullin (0,01), pH 7,2; (A = Kontrolle, B = Glutamat, C = Glutamat + MK-801; MK-801 ist ein spezifischer Glutamatrezeptor-
25 Antagonist). Funktionelle Meß- bzw. Kontrollgröße war dabei ein mit Fura-2 gemessenes Fluoreszenz-Signal, welches proportional zur Calciumkonzentration ist (alle Stoffe sind in Chemikalienkatalogen von Torris oder Sigma nachlesbar).

30 Die auffälligste und konsistenteste Änderung ist mit einem Pfeil markiert: Neu- β (32 kDa, pI = 4,5 bis 4,7 (isoelektrischer Punkt)) ist in erheblich

- 21 -

größerer Menge in der stimulierten Kondition zu beobachten und in den Kontrollen nur schwach oder gar nicht zu finden.

In **Figur 5** ist eine Identifikation von Neuregulin- β durch MS/MS-Analyse
5 mittels ESI-MS zu erkennen.

Ausgewählte Peptide der MALDI-MS wurden zur Aminosäure-
Sequenzierung mit ESI-MS fragmentiert. (MALDI, ESI-Sequenzierung wie in
Soskic V., Görlach M, Poznanovic S., Boehmer FD, Godovac-Zimmermann
10 J., „Functional proteomics analysis of signal transduction pathways of the
platelet-derived growth factor beta receptor“ (1999), Biochemistry 38,
1757-1764; oder „Proteome Research, Two-Dimensional Gel
Electrophoresis and Identification Methods“ von Thierry Rabilloud, 2000,
Springer-Verlag, Berlin). Die erhaltenen Sequenzen identifizieren eindeutig
15 ein Neuregulin- β (Details, siehe Tabelle 2).

Beispiel 1 Identifizierung von Neuregulin- β als Indikator bzw. Target für neuronale Prozesse

1.1 Neuronale Zellkultur (aus Ratten-Hippocampus), LTP/LTD:

5

Geeignete Zellkultursysteme, im Falle des Neuregulin- β , hippocampale Primärkulturen aus prä- oder neonatalen Ratten (beschrieben in z.B. „Rat hippocampal neurons in low-density culture“, K. Goslin, H. Asmussen, G. Banker; in „Culturing Nerve Cells, 2nd edition 1998, S. 339 ff; K. Goslin and G. Banker, eds. MIT Press, Cambridge, Massachusetts, USA) werden auf den oben beschriebenen Objektträgern kultiviert, in die Flußzelle eingebracht und zunächst mikroskopisch charakterisiert (morphologische Aufnahmen etc. im Phasenkontrast).

10

15

Anschließend erfolgt die Inkubation der Zellen mit jeweils geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen (für die gedächtnisrelevanten Versuche an Neuronen, die zur Entdeckung der besonderen Funktion des Neuregulin- β geführt haben: Fura-2, ein calciumsensitiver Fluoreszenzfarbstoff).

20

1.2 Effektraum/Effektorraum-Analyse

Danach werden die Zellen über das computer-gesteuerte Applikationssystem (für die gedächtnisrelevanten Versuche an Neuronen, die zur Entdeckung des Neuregulin- β geführt haben: 100 μ M Glutamat für 30 Sekunden) stimuliert.

25

Es erfolgt eine zeitlich aufgelöste Erfassung der Fluoreszenzsignale in einer großen Zahl von Zellen in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen (Temperatur, Wirkstoff). Im Zusammenhang mit Neuregulin- β löst Glutamat einen Einstrom von Calcium-Ionen aus, der sich über die Wechselwirkung mit Fura-2 sehr empfindlich quantifizieren läßt.

30

- 23 -

Es findet quasi parallel dazu eine synchronisierte Fraktionierung und Analyse des Perfusates statt; im Falle von hippocampalen Neuronen von Neurotransmittern mittels HPLC mit Fluoreszenz-Detektion, im Falle von anderen niedermolekularen extrazellulären Komponenten mittels EI-MS und
5 im Falle von stabilen Isotopen-Tracern und Metallionen mittels ICP-MS.

Darüber hinaus ist eine Immunfärbung der Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Oberflächenmarker zur weitergehenden Charakterisierung möglich.

10 Weiterhin findet eine Charakterisierung und Identifizierung von Proteinen statt, die sich unter den gewählten experimentellen Bedingungen verändern oder sonst auffällig verhalten, mit den Techniken der Proteom-Forschung, nämlich mittels zwei-dimensionaler Gelelektrophorese, MALDI-TOF-MS und
15 ESI-MS.

Schließlich findet eine Integration, d.h. eine Zusammenfassung, der gewonnenen multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen statt. Die Effektraum-/Effektorraum-
20 Analyse ist eine Korrelationsanalyse bezüglich der einzelnen Vorgänge und den damit einhergehenden Konzentrationsänderungen bestimmter Stoffe.

Die folgenden Parameter wurden in dem beschriebenen Aufbau simultan bzw. eindeutig korrelierend bestimmt. Die Steigerung des Calcium-
25 Einstroms in Neuronen hippocampalen Ursprungs (Beweis der neuronalen Identität durch die tau-Protein-Färbung derselben Zellen nach dem funktionellen Teil des Experiments) bei gleichbleibender Temperatur identifizieren den physiologischen Kontext (LTP-(Gedächtnis)-relevant). Damit einhergehend sind die gleichzeitigen Änderungen der
30 Neurotransmitter-Freisetzung (GABA), des durch den stabilen Isotopen-Tracer ²⁶Mg nachgewiesenen Mg-Einstroms in die Zellen. Insbesondere das Auftreten von Neuregulin- β in der stimulierten Kondition ist ein neues und

- 24 -

unerwartetes Ergebnis. Dieser Satz von Informationen ist dadurch erstmalig in einem gedächtnis-relevanten Zusammenhang erkannt worden. Neuregulin- β ist somit auch als potentielles Target für Wirkstoffe identifiziert, die in bezug auf Gedächtniskrankheiten getestet werden sollen.

5 Mit dem vorgestellten Aufbau wird eine wesentlich höhere Informationsdichte erreicht als in herkömmlichen Screening-Verfahren, wo meist nur einzelne Parameter in Verbindung mit Wirkstoffen untersucht werden.

10 Der stabile Isotopen-Tracer ist im Anwendungsbeispiel ^{26}Mg . Zur Immunfärbung wurde ein anti-tau-Antikörper (beispielsweise durch SIGMA zu erhalten) verwendet.

Die Identifizierung von Neuregulin- β erfolgte durch zweidimensionale PAGE unter Verwendung isoelektrischer Fokussierung mit immobilisierten
15 nichtlinearen pH-Gradienten von 3 bis 10 und linearen Gradienten von 4 bis 7 als erste Dimension und SDS-PAGE (12 % Acrylamid) als zweite Dimension. Eine Silberanfärbung der Gele zeigte ein reproduzierbares Muster von mehreren tausend Proteinen, wobei die meisten unter allen
20 Bedingungen unverändert blieben. Der auffälligste Unterschied war ein Protein mit einer apparenten Molekularmasse von etwa 32 kD und einem pI-Wert von 4,5 bis 4,7, das nach Stimulation in erheblich höheren Mengen als ohne Stimulation oder bei den Kontrollen (Zusatz von 10 μM MK-801, einem spezifischen Inhibitor von NMDA-Rezeptoren) (Wong et al, Proc.
25 Natl. Acad. USA 83 (1986), zu, 7104-7106).

Das Protein wurde aus den Gelen herausgeschnitten, einer Trypsinspaltung innerhalb des Gels unterzogen und anschließend massenspektroskopisch durch MALDI-TOF-Massenfingerprint und ESI-Peptidsequenzierung
30 (Corthals et al., Identification of Proteins by Mass-Spectrometry, in: Proteome Research, Two-Dimensional Gel-Electrophoresis and Identification Methods, Thierry Rabilloud, Hrsg., Springer, Berlin (2000), 197-232).

- 25 -

Die Identität des Proteins wurde durch Untersuchung ausgewählter Peptide mit MS/MS-Analyse unter Verwendung von Ionenfallen, Elektrospray, Massenspektroskopie des nicht aufgetrennten, zuvor durch MALDI-TOF-analysierten Peptidgemisches bestätigt. Die MS/MS-Analyse von m/z 798.4 war ausreichend, um u.a. das Peptid 88-94 von Neuregulin- β zu identifizieren. Die MS/MS-Analyse von m/z = 842,7 bestätigte die Sequenz des Peptids um Position 81 - 87. Diese Peptidsequenzen sind den den Neuregulinen α und β konserviert, im zentralen Nervensystem sind jedoch Neuregulin- β prädominant (Meyer et al., Development 124 (1997), 3575-3586). Die experimentellen Bedingungen und die Resultate sind in den Tabellen 1 und 2 dargestellt.

Der aus der Aminosäuresequenz von Neuregulinen berechnete pI beträgt etwa 9,0, während das im vorliegenden Experiment identifizierte Neuregulin- β Isoform einen pI im Bereich von 4,3 bis 5,0 aufweist, was auf umfangreiche posttranslationale Modifikationen hinweist.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Neuregulin- β durch physiologische Aktivität reguliert wird und eine wichtige Rolle bei der neuronalen Plastizität spielt. Weiterhin ist anzunehmen, dass die NDF-Rezeptor-Tyrosinkinasen ErbB-3 und ErbB4 über Neuregulin- β an der Induzierung von LTP beteiligt sind.

Beispiel 2 Identifizierung von Neuregulin- β als Target bei Morbus Alzheimer

Schnittpräparate (3 von Patienten mit normalem Hirnbefund und 3 von Patienten mit Morbus Alzheimer) wurden immunhistochemisch mit Hilfe der ABC-Methode untersucht, wobei das Aminobenzidin als Substrat diente. Der Anti-Neuregulin-Primärantikörper (Santa Cruz Biotech) wurde in zwei Verdünnungen vorher ausgetestet (1:10 und 1:100). Als Negativkontrolle

- 26 -

wurde ein unspezifisches Ziegen Serum anstelle des Primärantikörpers eingesetzt.

Bei den Präparaten aus Normalgehirn wurden hippocampale Strukturen mit
5 Nervenzellen gefunden, die eine schwache Anfärbung mit dem Antikörper
im Cytoplasma aufweisen. Zellen des Plexus Choriodeus zeigten eine
deutlich positive Reaktion im Cytoplasma.

Im Hirngewebe von Patienten mit Morbus Alzheimer wurden hippocampale
10 Strukturen mit Nervenzellen gefunden, die eine deutlich schwächere
Reaktion mit dem Antikörper im Cytoplasma aufweisen. Zellen des Plexus
Choriodeus weisen eine positivere Reaktion im Cytoplasma auf.

Insgesamt scheinen die Nervenzellen von Patienten mit Morbus Alzheimer
15 eine schwächer positive Reaktion mit Anti-Neuregulin- β -Antikörpern als
Normalpersonen aufzuweisen.

Tabelle 1:

Parameter	Konzentration/Ex- pression/Meßgröße (vorstimuliert)	Konzentration/Ex- pression/Meßgröße der Kontrolle	Methode
GABA	74 pMol	87 pMol	Fluoreszenz-HPLC
5 Neuregulin- β	stark exprimiert	nicht exprimiert	2-D PAGE, ESI-MS, MALDI-TOF-MS
^{26}Mg (intrazellulär)	45 nM/mg Protein	25 nM/mg Protein	ICP-MS
Calcium (intrazellulär)	850 nM	350 nM	Fura-2; Fluoreszenz- Imaging
10 tau-Protein (neuronaler Marker)	positiv	positiv	Immunfärbung mit anti-tau-Antikörper
Temperatur	+22°C	+22°C	intrinsisch

Tabelle 2:

MALDI - Massenspektrometrische Analyse von Neu- β **Neu- β (Rattus norvegicus): 11** Peptide enthalten 35% (106/304 AS)

Start	Ende	Erwartete Masse	Gemessene Masse	Sequenz
1	5	650.3	650.8	MSERK
11	16	645.4	644.9	GKGKKK
269	274	796.4	796.0	OKLHDR
88	94	798.5	798.4	IQKKPGK
81	87	842.4	842.7	NKPENIK
232	239	1036.5	1036.9	AEELYQKR
94	103	1085.2	1085.0	YGVSGYPTLK
102	117	1790.1	1790.7	ASLADSGEYMCKVISK*
17	38	2214.1	2214.6	DRGSRGKPGPAEGDPSALPPR
70	87	2229.1	2230.6	WFKNGNELNRKKNKPENIK
16	38	2342.2	2343.1	KDRGSRGKPGPAEGDPSALPPR

5

10

15

20

Ansprüche

- 5 1. Neuregulin- β Isoform mit einem isoelektrischen Punkt (pI) im Bereich von \leq pH 7.
2. Neuregulin- β Isoform nach Anspruch 1 mit einem pI im Bereich von pH 4,3 bis 5,0.
- 10 3. Neuregulin- β Isoform nach Anspruch 1 oder 2 mit einem pI im Bereich von pH 4,5 bis 4,7.
4. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2 oder 3 als Indikator und/oder Target in einem Screening-Verfahren zur
15 Identifizierung von Wirkstoffen.
5. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2, oder 3 als Indikator und/oder Target in einem Screening-Verfahren zur Identifizierung von Wirkstoffen zur Beeinflussung von
20 Glutamatrezeptor-vermittelten Calcium-Konzentrationsänderungen.
6. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2, oder 3 als Indikator und/oder Target in einem Screening-Verfahren zur
25 Identifizierung von Wirkstoffen, wobei das Screening-Verfahren ein Verfahren zur Erfassung von multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektoraum-Analyse von Wirkstoffen ist,
 - bei dem in eine Fließzell-Vorrichtung eingebrachte und auf Substraten aufgebraute Zellkultursysteme mit jeweils geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen und/oder mit
30 Isotopengemischen verschiedener Elemente inkubiert,
 - die Zellkultursysteme stimuliert und

- 30 -

- zeitlich synchron die in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen resultierenden Fluoreszenzsignale direkt am Zellkultursystem zeitlich aufgelöst erfasst und/oder die Isotopengemische im Perfusat zeitlich aufgelöst erfasst und/oder die Isotopengemische direkt an den Zellkultursystemen zeitlich integral erfasst werden,
- wobei eine synchronisierte Fraktionierung und weitergehende Analyse des Perfusates,
- eine Charakterisierung und Identifizierung von sich unter den gewählten Bedingungen verändernden und/oder spezifisch verhaltenden Proteinen der Zellkultursysteme und
- schließlich eine Integration der gewonnenen multidimensionalen Funktionsdaten für die Effektraum-/Effektorraum-Analyse von Wirkstoffen vorgenommen wird.

15

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Neuregulin- β als Indikator und/oder Target zur Beeinflussung von neuronalen Prozessen wie etwa Langzeit-Verstärkung (LTP), Langzeit-Depression (LTD) epileptoformen und/oder epileptogenen Ereignissen und/oder erregungs-toxischen Phänomenen eingesetzt wird.

20

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 6,

dadurch gekennzeichnet,

dass das Neuregulin- β als Indikator und/oder Target zur Beeinflussung von neuronalen Erkrankungen, insbesondere neuronalen degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer eingesetzt wird.

25

30

9. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Neuregulin- β als Indikator und/oder Target zur
Beeinflussung von von Glutamatrezeptoren vermittelten Calcium-
Konzentrationsänderungen eingesetzt wird.
10. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2 oder 3 zum
Testen von Biomaterialien im Zellkontakt, insbesondere
Implantationsmaterialien als nicht-aktive Medizinprodukte.
11. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2, oder 3 zum
Screening für Wirkstoffe und/oder zur Ermittlung von Indikatoren
und/oder Targets.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 4 bis 11 zur Ermittlung von
Zwischenergebnissen für Diagnoseverfahren.
13. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2, oder 3 als
Indikator in einem Verfahren zum Nachweis neuronaler Prozesse.
14. Verwendung von Neuregulin- β nach Anspruch 1, 2 oder 3 als Target
in einem Verfahren zur Beeinflussung neuronaler Prozesse.
15. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14 zum Nachweis bzw. zur
Beeinflussung von neuronalen Erkrankungen, insbesondere
neuronalen degenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer.
16. Verwendung nach Anspruch 13 oder 14 bei der Verlaufskontrolle
von neuronalen degenerativen Erkrankungen.

Fig. 1

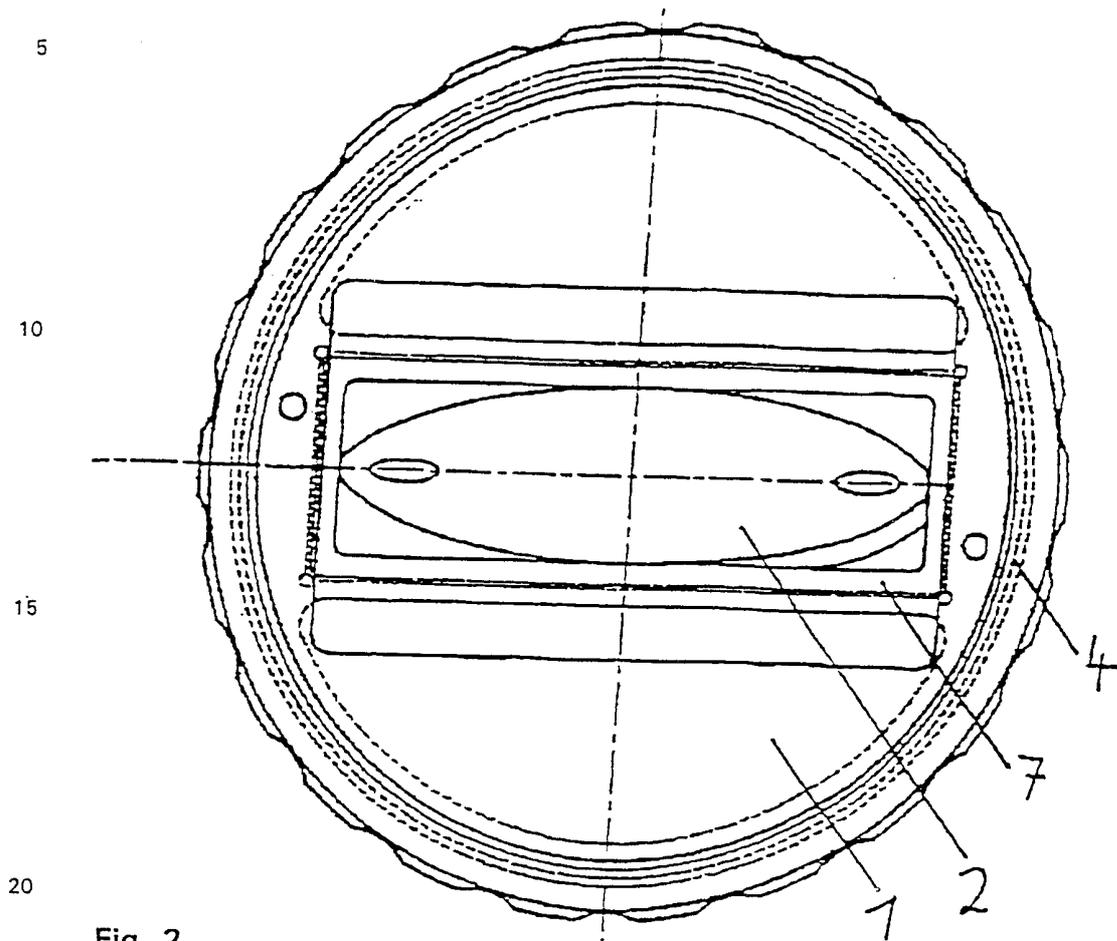


Fig. 2

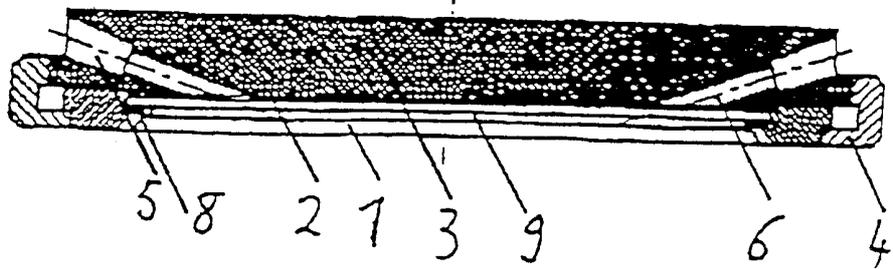


Fig. 3

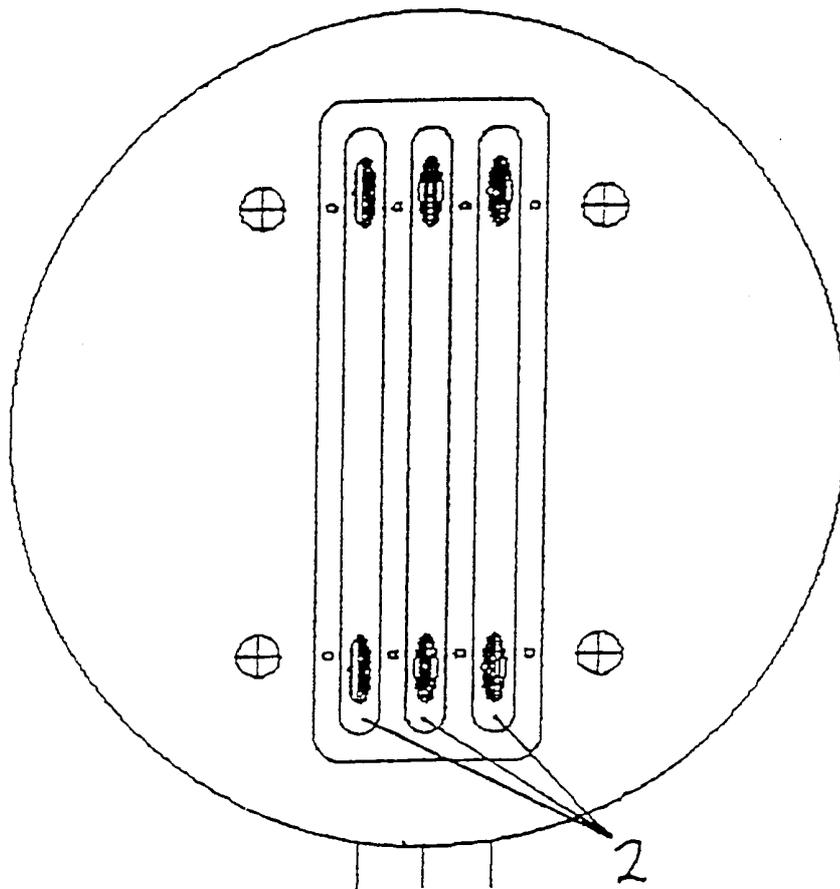


Fig. 4

