



(19)
 Bundesrepublik Deutschland
 Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 048 249 A1** 2008.02.14

(12)

Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 048 249.2**

(22) Anmeldetag: **12.10.2006**

(43) Offenlegungstag: **14.02.2008**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/68 (2006.01)**

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

A61K 50/00 (2006.01)

(66) Innere Priorität:
10 2006 037 613.7 10.08.2006

(71) Anmelder:

Schmiegel, Wolff, Prof. Dr., 44797 Bochum, DE;
Mölleken, Christian, Dr., 44795 Bochum, DE;
Ruhr-Universität Bochum, 44801 Bochum, DE;
Klöppel, Günter, Prof.Dr., 24105 Kiel, DE; Sipos,
Bence, Dr., 24105 Kiel, DE

(74) Vertreter:

Simandi, C., Dipl.-Chem., Pat.-Anw., 53773 Hennef

(72) Erfinder:

Mölleken, Christian, Dr., 44795 Bochum, DE; Sitek,
Barbara, 44809 Bochum, DE; Sipos, Bence,
Priv.-Doz. Dr., 24105 Kiel, DE; Klöppel, Günter,
Prof. Dr., 24105 Kiel, DE; Schmiegel, Wolff, Prof.
Dr., 44797 Bochum, DE; Meyer, Helmut E., Prof.
Dr., 45661 Recklinghausen, DE; Stühler, Kai, Dr.,
44787 Bochum, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Biomarker für Leberentzündung**

(57) Zusammenfassung: Die Patentanmeldung beschreibt ein Verfahren zur diagnostischen Untersuchung biologischer Proben eines Menschen auf Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, wobei die Probe auf ein oder mehrere Proteine als Marker für Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, untersucht wird, wobei die Marker ausgewählt sind aus der Gruppe: ER60, Vimentin, Actin alpha 1 skeletales Muskelprotein, hMFAP 4, Troponomyosin, PTGES 2, Amyloid P-Komponente, Transgellin, Calponin 1, Homo sapiens p20 Protein, 17 kDa Myosin leichte Kette, Methylenetetrahydrofolatdehydrogenase 1, PRO2619, Aldehyddehydrogenase 1, Fibrinogen alpha-Kette Preproprotein, Fructose-Bisphosphat-Aldolase B, Argininosuccinatsynthetase, Eef1a2, ATP5A1, alpha-2-Actin, Regucalcin, Serumalbumin, mitochondriale Malatdehydrogenase, mitochondriale Acetoacetyl-CoA-Thiolase, H Chain Igg B12 und Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit, wobei eine gegenüber dem gesunden Zustand erhöhte oder verringerte Konzentration der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung anzeigt.

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
fibrotisch							
nicht-fibrotisch							

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur diagnostischen Untersuchung biologischer Proben eines Menschen auf Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, wobei die Probe auf eines oder mehrere Proteine als Marker für Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, untersucht wird, wobei eine gegenüber dem gesunden Zustand erhöhte oder verringerte Konzentration der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose, anzeigt.

[0002] Weltweit sind ca. 170 Mio. Menschen chronisch mit dem Hepatitis C-Virus (HCV) infiziert. Der Verlauf der Krankheit variiert dabei zwischen den Patienten erheblich; während ca. 20 % der Patienten innerhalb von 20 Jahren eine Leberzirrhose entwickeln, ist bei anderen Patienten eine derartige Entwicklung selbst nach noch längeren Zeiträumen nicht zu beobachten. Es konnten eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die die Wahrscheinlichkeit einer hepatischen Fibrose erhöhen, u.a. männliches Geschlecht, Alkoholmissbrauch, Co-Infektion mit HIV oder Schistosoma mansoni, genetische Prädisposition und erhöhtes Alter bei der Infektion.

[0003] Als Vorläuferzellen sind für die Entwicklung einer Leberfibrose vor allem die hepatischen Stelatzellen (HSC) verantwortlich, die in einer normalen Leber im Ruhezustand insbesondere für die Speicherung von Vitamin A verantwortlich sind. In einer fibrotischen Leber hingegen werden sie aktiviert, proliferieren und entwickeln sich zu myofibroblastartigen Zellen. Diese Myofibroblasten produzieren große Mengen Kollagen, regulieren die Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) herab und zeigen eine erhöhte Expression der physiologischen Inhibitoren der MMPs (TIMPs). Mit zunehmender Kollagenakkumulation entwickelt sich die Fibrose der Leber weiter, was schließlich bis zum Organversagen führen kann.

[0004] Zur antiviralen Behandlung einer chronischen Hepatitis C werden insbesondere Peg-Interferon Alfa und Ribavirin eingesetzt. Auch wenn auf diese Weise viele Patienten erfolgreich behandelt werden können, bleibt die Therapie bei mindestens 50 % der Patienten, die mit dem HCV Genotyp 1 infiziert sind, der in der westlichen Welt am weitesten verbreitet ist, erfolglos. Ähnliches gilt für Patienten, die mit dem HCV Genotyp 4 infiziert sind, der in Ägypten häufig vorkommt. Darüber hinaus sind die Kosten der dauerhaften antiviralen Behandlung immens und die Behandlung ist mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden. Bei Patienten, die sich in einem weit fortgeschrittenen Stadium befinden, führt die antivirale Behandlung wiederum nicht mehr zum gewünschten Erfolg. Es besteht daher Bedarf, eine Fibrose bei Hepatitis-Patienten und damit die Entstehung einer Leberzirrhose besser diagnostizieren zu können, um dem behandelnden Arzt die Möglichkeit zu verschaffen, zu entscheiden, ob eine antivirale Behandlung sinnvoll und Erfolg versprechend ist.

[0005] Bereits in der Vergangenheit wurde eine Reihe nicht-invasiver Marker zum Nachweis von Leberfibrose verwendet, darunter der sog. Acti- oder Fibro-Test, Prokollagen III-Peptid (PIIP), Hyaluronsäure, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und ihre Inhibitoren (TIMPs) (T. Poynard et al., Expert Rev Mol Diagn. 2005, 5 (1): 15–21; V. Leroy et al., J Hep 2001, 35 (1):26). All diese Marker zeigen jedoch nur eine limitierte Sensibilität und Spezifität, weshalb weiterhin Bedarf nach geeigneteren Biomarkern besteht.

[0006] Ausgehend vom beschriebenen Stand der Technik stellt sich daher die Aufgabe, ein verbessertes Verfahren zur Untersuchung biologischer Proben auf Leberentzündung und hepatische Fibrose zur Verfügung zu stellen, bei dem neuartige Marker verwendet werden.

[0007] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Untersuchung biologischer Proben eines Menschen auf Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, wobei die Probe auf eines oder mehrere Proteine als Marker für Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, untersucht wird und wobei ein erhöhter Level der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose anzeigt, wobei die Proteine ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus: ER60, Vimentin, Actin alpha 1 skeletales Muskelprotein, hMFAP4, Tropomyosin, PTGES2, Amyloid-P-Komponente, Transgelin, Calponin 1, Homo sapiens p20 Protein, 17 kDa Myosin leichte Kette, H Chain H Igg B12 und Prollyl-4-hydroxylase, beta subunit.

[0008] Des Weiteren betrifft die Erfindung auch ein entsprechendes Verfahren bei dem ein verringerter Level der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose, anzeigt, wobei in diesem Fall die Proteine ausgewählt sind aus einer Gruppe: Methylentetrahydrofolatdehydrogenase 1, PRO2619, Aldehyddehydrogenase 1, Fibrinogen alpha-Kette Preproprotein, Fructose-Eisphosphat-Aldolase B, Argininosuccinatsynthetase, Eef1a2, ATP5A1, alpha-2-Actin, Regucalcin, Serumalbumin, mitochondriale Malatdehydrogenase, mitochondriale Acetoacetyl-CoA-Thiolase. Sowohl bei den herauf- als auch bei herun-

terregulierten Proteinen kann die Untersuchung auch über die Bestimmung von Teilsequenzen erfolgen.

[0009] Die genannten Proteine konnten bei einer Proteomanalyse von fibrotischem Gewebe im Vergleich zu nicht-fibrotischem Gewebe als potentielle Biomarker identifiziert werden. Hierzu wurden mit Hepatitis C infizierten Patienten Leber-Biopsieproben entnommen. Die Proben wurden in einem Handhomogenisator mit Lysis-puffer homogenisiert und von DNA und sonstigem Zellmaterial befreit, um ein Proteinkonzentrat zu erhalten. Die Proteine wurden mit einem Farbstoff gelabelt und einer 2D-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen mit einer isoelektrischen Fokussierung in der ersten und einer SDS-Gelelektrophorese in der zweiten Dimension. Die Ergebnisse wurden für fibrotische und nicht-fibrotische Zellen mit Hilfe einer dafür geeigneten Software verglichen, um die Spots zu detektieren und zu quantifizieren, die bei der fibrotischen Probe im Vergleich zur nicht-fibrotischen Probe verstärkt oder verringert waren. Als Software kann beispielsweise die ImageQuantTM-Software der Firma GE Healthcare in Verbindung mit der DeCyder-Software derselben Firma durchgeführt werden. Dabei wird die Emission der Farbstoffe, mit denen die Proteine gelabelt wurden, gemessen und ausgewertet.

[0010] Die weitere Auswertung erfolgte mit Hilfe von LC-ESI-MS (Flüssigchromatographie-Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie). Dabei wurden zunächst die Proteine im Gel, in dem die Proben zuvor aufgetrennt wurden, mit Hilfe von Trypsin in einzelne Peptidfragmente zerlegt. Diese wurden mit Hilfe von Reversed-Phase HPLC voneinander separiert und massenspektrometrisch untersucht, um die einzelnen Proteine zu identifizieren. Selbstverständlich können hierbei auch andere geeignete massenspektrometrische Verfahren angewandt werden, beispielsweise MALDI-TOF-MS.

[0011] Bei den Untersuchungen konnten folgende Proteine identifiziert werden, die in fibrotischen Zellen gegenüber nicht-fibrotischen Zellen herauf-(fold change positiv) bzw. herunterreguliert (fold change negativ) wurden:

Heraufregulierte Proteine:

NCBI-Accession	Identifiziertes Protein	Fold change
IPI00025252.1	ER60 Protein	26,9
IPI00418471.5	Vimentin	5,6
IPI00448938.1	H Chain H Igg B12	14,7
IPI00697648.1	Actin alpha 1 skeletales Muskelprotein	6,5
IPI00022792.3	hMFAP 4	45,1
IPI00455050.1	sarkomeres Tropomyosin kappa	87,1
IPI00014581.1	TPM1 humanes Tropomyosin alpha-Kette	28,7
IPI00220709.3	beta Tropomyosin	52,4
IPI00010779.3	Tropomyosin 4	20,6
IPI00303568.3	PTGES 2	6,1
IPI00010796.1	Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit	4,6
IPI00022391.1	Amyloid P-Komponente, Serum	7,3
IPI00216138.5	Transgelin	15
IPI00021264.1	Calponin 1	21,1
IPI00022433.5	Homo sapiens p20 Protein [pir B53814]	16,9
IPI00718271.2	17 kDa Myosin leichte Kette	8,4

Herunterregulierte Proteine:

NCBI-Accession	Identifiziertes Protein	Fold change
IPI00218342.9	Methylentetrahydrofolatdehydrogenase 1	-9,37
IPI00745872.1	PRO2619	-3,2
IPI00218914.4	Aldehyddehydrogenase 1	-7,7
IPI00029717.1	Fibrinogen alpha-Kette Preprotein	-6,4
IPI00218407.5	Fructose-Bisphosphat-Aldolase B	-16,6
IPI00020632.4	Argininosuccinatsynthetase	-11,0
IPI00014424.1	Eef1a2	-6,4
IPI00440493.2	ATP5A1 Protein	-5,8
IPI00708487.1	alpha-2-Actin; alpha cardiac Actin	-8,6
IPI00017551.1	Regucalcin (Seneszenzmarkerprotein 30)	-13,3
IPI00708398.1	ABBOS-Serumalbuminprecursor	-13,3
IPI00291006.1	mitochondrialer Malatdehydrogenaseprecursor	-5,9
IPI00030363.1	mitochondrialer Acetoacetyl-CoA-Thiolaseprecursor	-5,9

NCBI: National Centre for Biotechnology Information

[0012] Im folgenden werden die Sequenzinformationen zu einigen der identifizierten Proteine angegeben. Dabei sind die Peptidsequenzen dunkel unterlegt, die zum einen zur Identifikation der Proteine führten und zum anderen eine Unterscheidung der Proteinisoformen zulassen (vgl. auch Sequenzprotokoll (sequence listing) als Anhang zur Patentanmeldung).

Tropomyosin

SEQ ID NO 1 MDAIKKKMQMLKLDKENALDRAEQAEADKKAEDRSKQLEEDIAAKEKLL
 SEQ ID NO 2 MDAIKKKMQMLKLDKENALDRAEQAEADKKAEDRSKQLEEDIAAKEKLL
 SEQ ID NO 3 MDAIKKKMQMLKLDKENALDRAEQAEADKKAEDRSKQLEEDIAAKEKLL
 SEQ ID NO 4 MDAIKKKMQMLKLDKENALDRAEQAEADKKAEDRSKQLEEDIAAKEKLL
 SEQ ID NO 5 -----MAGLNSLEAVKRKI

SEQ ID NO 1 RVSEDERDRVLEELHKAEDSLLAEEFAAAKAEADVASLNRRRIQLVEEELD
 SEQ ID NO 2 RVSEDERDRVLEELHKAEDSLLAEEFAAAKAEADVASLNRRRIQLVEEELD
 SEQ ID NO 3 KGTEDEVEKYSESVKEAQEKLEQAEEKATDAEADVASLNRRRIQLVEEELD
 SEQ ID NO 4 KGTEDELDKYSEALKDAQEKLELAEEKATDAEADVASLNRRRIQLVEEELD
 SEQ ID NO 5 QALQQQADEADRAOGLQRELDGERERREKAEGDVAALNRRRIQLVEEELD

SEQ ID NO 1 RAQERLATALQKLEEAKAADESERGMKVIESRAQKDEEKMEIQEIQLKE
 SEQ ID NO 2 RAQERLATALQKLEEAKAADESERGMKVIESRAQKDEEKMEIQEIQLKE
 SEQ ID NO 3 RAQERLATALQKLEEAKAADESERGMKVIENRAMKDEEKMEIQEIQLKE
 SEQ ID NO 4 RAQERLATALQKLEEAKAADESERGMKVIESRAQKDEEKMEIQEIQLKE
 SEQ ID NO 5 RAQERLATALQKLEEAKAADESERGMKVIENRAMKDEEKMEIQEIQLKE

SEQ ID NO 1 AKHIAEDADRKYEEVARKLVIIESDLERAERAELSEGKCAELEEEELKTV
 SEQ ID NO 2 AKHIAEDADRKYEEVARKLVIIESDLERAERAELSEGKCAELEEEELKTV
 SEQ ID NO 3 AKHIAEDADRKYEEVARKLVIIEGELERSEERAEVAESRARQLEEBELRTM
 SEQ ID NO 4 AKHIAEDADRKYEEVARKLVIIESDLERAERAELSEGQVRQLEEBQLRIM
 SEQ ID NO 5 AKHIAEDADRKYEEVARKLVIIEGELERAEERAEVSELKCGDLEEEELKTV

SEQ ID NO 1 TNDLKSLEAQAEKYSQKEDRYEEIKVLSDKLKEAETRAEFAERSVTKLE
 SEQ ID NO 2 TNDLKSLEAQAEKYSQKEDRYEEIKVLSDKLKEAETRAEFAERSVTKLE
 SEQ ID NO 3 DQALKSLMASEEEYSTKEDKYEEIKLLEEKLEAETRAEFAERSVAKLE
 SEQ ID NO 4 DQTLKALMAEDKYSQKEDRYEEIKVLSDKLKEAETRAEFAERSVTKLE
 SEQ ID NO 5 TNNLKSLEAASEKYSQKEDKYEEIKLSDKLKEAETRAEFAERTVAKLE

SEQ ID NO 1 KSIDDLEDELYAQKLYKAISELDHALNDMTSI
 SEQ ID NO 2 KSIDDLEDELYAQKLYKAISELDHALNDMTSI
 SEQ ID NO 3 KTIDDLESETLASAKEEENVEIHQTLDQTLLELNNL
 SEQ ID NO 4 KSIDDLEEKVAHAKEEENLSMHQMLDQTLLELNNM
 SEQ ID NO 5 KTIDDLEEKLAQAKEEENVGLHQTLDQTLNELNCI

Transgelin

SEQ ID NO 6 MANKGPSYGMSREVSQKIEKKYDEELEERLVEWIIVQCGPDVGRPDRGRL
 SEQ ID NO 7 MANKGPSYGMSREVSQKIEKKYDEELEERLVEWIIVQCGPDVGRPDRGRL

SEQ ID NO 6 GFQVWLKNGVILSKLVNSLYPDGSKPVKVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKA
 SEQ ID NO 7 GFQVWLKNGVILSKLVNSLYPDGSKPVKVPENPPSMVFKQMEQVAQFLKA

SEQ ID NO 6 AEDYGVIKTDMFQTVDLFEGKDMAAVQRTLMALGSLAVTKNDGHYRGDPN
 SEQ ID NO 7 AEDYGVIKTDMFQTVDLFEGKDMAAVQRTLMALGSLAVTKNDGHYRGDPN

SEQ ID NO 6 WFMKKAQEHKREFTESQLOEGKHVIGLQMGSNRGASQAGMTGYGRPRQII
 SEQ ID NO 7 WFMKKAQEHKREFTESQLOEGKHVIGLQMGSNRG-----

SEQ ID NO 6 S
 SEQ ID NO 7 -

SEQ ID NO 1: sarkomeres Tropomyosin kappa, TPM1-kappa; NCBI Accession: IPI00455050.1
 SEQ ID NO 2: sarkomeres Tropomyosin kappa; NCBI Accession: IPI00455050.1
 SEQ ID NO 3: beta Tropomyosin; NCBI Accession: IPI00220709.3
 SEQ ID NO 4: TPM 1 humanes Tropomyosin 1 alpha-Kette; NCBI Accession: IPI00014581.1
 SEQ ID NO 5: Tropomyosin 4; NCBI Accession: IPI00010779.3

SEQ ID NO 6: Transgelin; NCBI Accession: IPI00216138.5

SEQ ID NO 7: Transgelinvariante; NCBI Accession: IPI00216138.5

[0013] In **Fig. 1** sind Aufnahmen der mittels 2D-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine gezeigt, wobei fibrotische und nicht-fibrotische Zellen aus zirrhotischem Leberparenchym von insgesamt 7 Patienten verwendet wurden, die unter mit Hepatitis C verbundener Leberzirrhose litten. Die kreisrunde Markierung zeigt Tropomyosin (beta), die ovale Markierung hMFAP4. Die Ähnlichkeit der Aufnahmen unterstreicht die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

[0014] Als besonders erfolgversprechende Biomarker haben sich Tropomyosin, Transgelin, Calponin, hMFAP4 und Vimentin erwiesen. Bei dem Tropomyosin kann es sich um sarkomeres Tropomyosin kappa, beta Tropomyosin, TPM1 humanes Tropomyosin oder Tropomyosin 4 handeln.

[0015] Bei dem erwähnten hMFAP4 handelt es sich um das humane mikrofibrillar assoziierte Protein 4. Neben den zuvor erwähnten hochregulierten Proteinen, können jedoch auch herunterregulierte metabolische Enzyme als Marker verwendet werden, insbesondere Argininosuccinatsynthetase, Methylentetrahydrofolatdehydrogenase, Fructose-1,6-Bisphosphataldolase, mitochondriale Malatdehydrogenase und mitochondriale Acetoacetyl-CoA-Thiolase.

[0016] Auf einige der identifizierten Proteine wird im folgenden kurz eingegangen, wobei es sich bei den dort angegebenen Erläuterungen lediglich um Erklärungsversuche handelt, die hinsichtlich des Patentbegehrens in keiner Weise beschränkend zu verstehen sind.

[0017] Regucalcin, auch als Seneszenzmarkerprotein-30 (SMP-30) bekannt, spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung des intrazellulären Ca^{2+} -Niveaus durch Aktivierung von Ca^{2+} -Enzymen in der Plasmamembran, den Mikrosomen und Mitochondrien. Regucalcin wurde 13-fach herabreguliert in fibrotischen im Vergleich zu gesunden Leberzellen. Dies könnte darauf hindeuten, dass die kompensatorischen Effekte von Regucalcin gegenüber oxidativem Stress in erkranktem Lebergewebe vermindert werden.

[0018] Mitochondriale Malatdehydrogenase und mitochondriale Acetoacetyltransferase wurden beide um das 5,9-fache im fibrotischen Lebergewebe herunterreguliert. Es konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung zwischen Hepatitis C-Virus-Coreprotein und den Proteinen NS3 und NS5 mit Mitochondrien zur Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt, was eine Erklärung für die schwächere Expression der genannten Enzyme in fibrotischen Zellen sein könnte.

[0019] Ein weiteres Anzeichen für gestörte mitochondriale Enzyme in fibrotischen Leberzellen ist die verringerte Expression der ATP-Synthase alpha-Untereinheit (ATP5A1), die die ATP-Synthase während der oxidativen Phosphorylierung katalysiert.

[0020] Weitere Effekte des Hepatitis C-Virus-Coreproteins und des NS5A-Proteins sind die Assoziierung mit Membranen des endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und eine Verstärkung der intrazellulären Lipidakkumulation durch Wechselwirkung mit Apolipoprotein A1 (apoA1) oder A2 (apoA2). Das Lipidtransferprotein wird entsprechend inhibiert oder die Synthese von VLDL (very low density lipoproteins) wird gestört. Es konnte eine signifikante Herabregulierung der Acetyl-CoA-Acetyltransferase in fibrotischen Leberzellen beobachtet werden (fold change: -5,88).

[0021] Metabolische Störungen in fibrotischer Leber manifestieren sich auch in einer herabgesetzten Expression von glykolytischen Enzymen wie Fructose-1,6-Bisphosphataldolase (fold change: -16,6), Enolase-1 (2-Phosphodiglycerathydrolyase) oder Glyoxylase.

[0022] Aufgrund dieser metabolischen Disfunktionen ist die Proteinsynthese in fibrotischen Leberzellen teilweise deutlich reduziert: Serumalbumin (fold change: -13,2), welches als Carrier für Fettsäuren, Steroide und Thyroidhormone fungiert und das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen stabilisiert, wurde nur noch vermindert exprimiert.

[0023] Der Prozess der Leberregeneration in fibrotischen Leberzellen wird offenbar durch eine schwächere Expression von Methylentetrahydrofolatdehydrogenase beeinträchtigt (fold change: -9,4), welche drei aufeinanderfolgende Reaktionen bei der Umwandlung von C-1-Derivaten von Tetrahydrofolat katalysiert. Eine unverminderte enzymatische Funktion ist für die normale zelluläre Funktion, das Wachstum und die Dedifferenzierung bedeutsam.

[0024] Insgesamt scheint eine Störung des zellulären Gleichgewichtes, der glykolytischen Reaktionswege und der Lipidkompartimentierung und des Metabolismus in fibrotischen Zellen vorzuliegen, was die Produktion von reaktiven organischen Spezies (ROS) begünstigt. Diese wiederum induzieren die Synthese von TGF- β 1 in Hepatozyten und hepatischen Stelatzellen, den stärksten Promotor von hepatischer Fibrogenese.

[0025] Im Bereich der verstärkt nachweisbaren Proteine in fibrotischem Gewebe konnten die Proteine Actin alpha (fold change: 6,5) und Actin gamma (fold change: 9,1) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um Hauptkomponenten der dünnen Filamente von Muskelzellen und des Zytoskeletons von Nicht-Muskelzellen. Actin ist offenbar ein Produkt der HSC-Zellen und tritt daher bei Hepatitis C-induzierter Fibrose verstärkt auf.

[0026] Ein weiteres identifiziertes Protein ist das Vimentin (fold change: 4,6). Es handelt sich hierbei vermutlich um ein Produkt der hepatischen Stelatzellen aus Mesenchym.

[0027] Verschiedene Tropomyosin-Isoformen, die offenbar nicht durch Hepatozyten aber durch myofibroblastartige hepatische Stelatzellen produziert werden, weisen z. T. die höchsten Raten an Verstärkung auf (fold change: 9,7 bis 83,1).

[0028] Das 34 kDa Protein Calponin wird normalerweise ebenfalls spezifisch in glatten Muskelzellen exprimiert und bindet Calmodulin, Actin und Tropomyosin. Angesichts der myofibroblastartigen aktivierten hepatischen Stelatzellen wurde gemäß Ergebnis der Proteomanalyse auch Calponin in fibrotischen Zellen heraufreguliert (fold change: 18,5).

[0029] Auch Transgelin (fold change: 15) ist vermutlich ein Produkt von hepatischen Stelatzellen. Transgelin ist ein 22 kDa Protein, das auch als SM22-alpha bezeichnet wird, und weist strukturelle Ähnlichkeiten mit Calponin auf. Die Amyloidkomponente P, ein Glykoprotein, das sich aus einem Paar nicht kovalent gebundener Pentamere zusammensetzt, wobei die Untereinheiten eine Größe von 23 bis 25 kDa aufweisen, wurde ebenfalls bei Fibrose stärker exprimiert als in gesundem Gewebe (fold change: 7,3). Die physiologische Funktion in hepatischer Fibrogenese ist bislang unbekannt, aber die Überexpression deutet auf einen abnormalen zellulären Prozess hin.

[0030] Zusammengefasst läßt sich sagen, dass die Über- bzw. Unterexpression der als Biomarker verwendbaren Proteine auf ein gestörtes zelluläres Gleichgewicht, beeinträchtigte mitochondriale und metabolische Enzyme, verminderte zelluläre Synthese und eine verstärkte Expression zytoskeletaler Proteine beim Prozess der Apoptose in fibrotischen Leberzellen zurückzuführen ist.

[0031] Bei der Untersuchung einer Probe auf die als Biomarker dienenden Proteine kann, wie oben beschrieben, so vorgegangen werden, dass mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese, bestehend aus isoelektrischer Fokussierung in der ersten Dimension und Gelelektrophorese in der zweiten Dimension eine Auftrennung der Proteine erfolgt und durch Vergleich des Proteinmusters mit einer nicht-fibrotischen Kontrollprobe die Über- bzw. Unterexpression bestimmter Proteine nachgewiesen wird. Bei der Gelelektrophorese handelt es sich bevorzugt um eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Entsprechende Software zur Auswertung der Gele ist beispielsweise von GE Healthcare in Form der DeCyder Software erhältlich.

[0032] Zum Nachweise der Proteine werden die Proben vor Durchführung der 2D-Gelelektrophorese vorzugsweise mit einem Farbstoff gelabelt. Bei den Farbstoffen handelt es sich vorzugsweise um Fluoreszenzfarbstoffe. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Cy2, Cy3 und/oder Cy5. Diese Farbstoffe sind beispielsweise von der Firma GE Healthcare, Freiburg, Deutschland, erhältlich. Es handelt sich dabei um Carbomethylindocyaninfarbstoffe, wobei zwei Indolmoleküle über eine Kohlenstoffkette mit konjugierten Doppelbindungen verbunden sind. Die entsprechend funktionalisierten Farbstoffe können beispielsweise mit den Thiolgruppen der Seitenketten des Cysteins zur Reaktion gebracht werden, um die Proteine mit den Farbstoffen kovalent zu verknüpfen. Zwecks Reduktion von Disulfidbrücken wird dabei die Probe zunächst mit Hilfe eines geeigneten Reduktionsmittels reduziert, beispielsweise mit Hilfe von Tris(2-Carboxyethyl)phosphinhydrochlorid (TCEP). Anschließend wird mit entsprechend funktionalisiertem Farbstoff umgesetzt, bis schließlich die Reaktion durch Zugabe von DTT gestoppt wird. Denkbar ist jedoch auch die Funktionalisierung anderer Aminosäurereste mit Hilfe der Farbstoffe, beispielsweise der Seitenkette des Lysins.

[0033] Die Verwendung des Cy3, Cy5-Farbstoffsystems ist insofern besonders vorteilhaft als neben der eigentlichen Probe auch ein interner Standard bei der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt werden kann, wobei die eigentliche Probe und der interne Standard mit unterschiedlichen Farbstoffen (Cy3 bzw. Cy5) versehen werden.

[0034] Selbstverständlich sind neben den genannten Farbstoffen auch andere (Fluoreszenz)farbstoffe einsetzbar, die aus dem Stand der Technik sind, beispielsweise Fluorescein oder Tetramethylrhodamin.

[0035] Der Nachweis und die Quantifizierung der als Marker dienenden Proteine kann auch mit Hilfe weiterer, dem Fachmann geläufiger Protein-Diagnoseverfahren durchgeführt werden, insbesondere unter Verwendung radioaktiv oder fluoreszenzmarkierter Antikörper. Zu nennen sind hier insbesondere geeignete bioanalytische Verfahren, wie zum Beispiel Immunhistochemie, Antikörperarrays, Luminex, ELISA, Immunfluoreszenz, Radioimmunoassays. Der Nachweis und die Quantifizierung der als Marker dienenden Proteine kann auch mit weiteren dazu geeigneten bioanalytischen Verfahren, wie zum Beispiel massenspektrometrischen Verfahren, z. B. MRM (Multi reaction monitoring) oder AQUA (absolute Quantification), mit deren Hilfe die Markerproteine quantitativ gemessen werden können, durchgeführt werden.

[0036] Bei der zum Nachweis der Proteine verwendeten Probe kann es sich um eine Probe von Lebergewebe handeln, die mit Hilfe einer Biopsie entnommen wurde. Möglich ist jedoch auch die Verwendung von Blut-, Serum- oder Plasmaproben, welche selbstverständlich leichter zu gewinnen sind.

[0037] Neben den beschriebenen Verfahren betrifft die Erfindung auch die Verwendung der genannten Proteine als Biomarker zum Nachweis einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose.

[0038] Die genannten Markerproteine können auch zur Differentialdiagnose, insbesondere der differentialdiagnostischen Früherkennung, Verlaufsprognose der Lebererkrankung, Beurteilung des Schweregrades, therapiebegleitenden Verlaufsbeurteilung, Ätiologie und in-vitro-Diagnostik eingesetzt werden.

[0039] Nachfolgend wird ein Beispiel für die Probenanalyse gemäß Erfindung gegeben.

Beispiel

[0040] Von insgesamt sieben Patienten mit einer Hepatitis C-Infektion, Genotyp 1, die sich einer Lebertransplantation unterzogen, wurde Leberparenchym entnommen, sofort auf Eis gekühlt und bei -86°C gelagert. Unter dem Mikroskop wurden Gewebeprobe aufgetrennt zwischen fibrotischem Gewebe und gesunden Abschnitten. Das fibrotische Material wurde dabei entlang des fibrotischen Septums entnommen. Die Schichten für die 2D-Gelelektrophorese wurden mit Haematoxylin angefärbt und bei -20°C gelagert. Die isolierten Zellen aus der Mikrodissektion wurden in $100\ \mu\text{l}$ Lysispuffer (Tris HCl $30\ \text{mM}$; Thioharnstoff $2\ \text{M}$; Harnstoff $7\ \text{M}$, CHAPS $4\ \%$; pH $8,0$) aufgenommen und anschließend durch Anwendung von Ultraschall aufgebrochen ($6 \times 10\ \text{s}$ Pulse).

[0041] Mit einer Zentrifugation ($12.000\ \text{g}$ für $5\ \text{min}$) wurden DNA und sonstige Zellreste entfernt. Die Proteinkonzentration des Lysats wurde ermittelt.

[0042] Zur Anfertigung eines internen Standards wurden $3\ \mu\text{g}$ des Gewebelysates durch Anwendung von $2\ \text{nmol}$ Tris-(2-Carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid (TCEP) bei 37°C im Dunkeln über eine Zeitspanne von einer Stunde reduziert. Cy-Farbstoffe (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) wurden mit wasserfreiem DMF p. a. ($2\ \text{nmol}/\mu\text{l}$) verdünnt und $4\ \text{nmol}$ Cy3 wurden den mit Hilfe von TCEP reduzierten Proben zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von $30\ \text{min}$ bei 37°C wurde die Labeling-Reaktion durch Zugabe von $4\ \mu\text{l}$ DTT ($1,08\ \text{g/ml}$) gestoppt.

[0043] Die Cystein-Aminosäuren der zu untersuchenden Proteine (3.500 fibrotische Zellen, 2.500 nicht-fibrotische Zellen) wurden ebenfalls durch Inkubation mit $2\ \text{nmol}$ TCEP bei 37°C im Dunkeln für eine Stunde reduziert, bevor $4\ \text{nmol}$ Cy5 hinzugegeben wurden. Nach gründlicher Durchmischung wurden die Proben $30\ \text{min}$ lang bei 37°C im Dunkeln umgesetzt. Die Reaktion wurde gestoppt durch Zugabe von $10\ \mu\text{l}$ DTT.

[0044] Zur Vorbereitung der isoelektrischen Fokussierung wurden $10\ \mu\text{l}$ Ampholine 2–4 (GE Healthcare) hinzugefügt. Die Cy3- und Cy5-markierten Zellen wurden nach Durchmischung gleichzeitig weiter verarbeitet.

[0045] Anschließend wurde eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei zur isoelektrischen Fokussierung ein $21,25\ \text{h}$ Spannungsgradient verwendet wurde. Als Äquilibrationpuffer wurde $125\ \text{mM}$ Tris, $40\ \%$ (w/v) Glycerol, $3\ \%$ (w/v) SDS, $65\ \text{mM}$ DTT, pH $6,8$ für $10\ \text{min}$ verwendet. Anschließend wurde in der zweiten Dimension eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

[0046] Mit Hilfe eines geeigneten Scanners (Typhoon 9400, GE Healthcare) wurden nach beendeter Gelelek-

trophorese Bilder aufgenommen und mit Hilfe der ImageQuant-Software und der DeCyder-Software (GE Healthcare) ausgewertet. Auf diese Weise konnte eine differenzielle Analyse im Gel (DIA) durchgeführt werden, um die einzelnen Spots zu detektieren und zu quantifizieren.

[0047] Mit Hilfe des Enzyms Trypsin in 10 mM Ammoniumbicarbonatpuffer (pH 7,8) wurden die Proteine bei 37°C über Nacht gespalten. Die auf diese Weise generierten Fragmente wurden zweifach mit einem Acetonitril-Ameisensäuregemisch extrahiert zur weiteren Auftrennung und massenspektrometrischen Untersuchung. Dies erfolgte mit Hilfe von Online-RP-Kapillar-HPLC, gekoppelt mit nano-ESI-MS (Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie). Mit Hilfe der HPLC-MS-Kopplung und unter Heranziehung geeigneter Proteindatenbanken (NCBI, National Centre for Biotechnology Information) konnte eine vollständige Identifizierung der Proteinspots herbeigeführt werden.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO St. 25.

Dieses kann von der amtlichen Veröffentlichungsplattform des DPMA heruntergeladen werden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung biologischer Proben eines Menschen auf Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, wobei die Probe auf eines oder mehrere Proteine als Marker für Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, untersucht wird, wobei eine gegenüber dem gesunden Zustand erhöhte Konzentration der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose, anzeigt, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Proteine ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus: ER60, Vimentin, Actin alpha 1 skeletales Muskelprotein, hMFAP 4, Tropomyosin, PTGES 2, Amyloid P-Komponente, Transgelin, Calponin 1, Homo sapiens p20 Protein, 17 kDa Myosin leichte Kette, H chain H Igg B12 und Prolyl 4-hydroxylase, beta subunit.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Tropomyosin sarkomeres Tropomyosin kappa, beta Tropomyosin, TPM 1 humanes Tropomyosin oder Tropomyosin 4 ist.

3. Verfahren zur Untersuchung biologischer Proben eines Menschen auf Leberentzündung, insbesondere auf hepatische Fibrose, wobei die Probe auf eines oder mehrere Proteine als Marker für Leberentzündung, insbesondere hepatische Fibrose, untersucht wird, wobei eine gegenüber dem gesunden Zustand verringerte Konzentration der Proteine das Vorliegen einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose, anzeigt, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine ausgewählt sind aus einer Gruppe bestehend aus: Methylentetrahydrofolatdehydrogenase 1, PRO2619, Aldehyddehydrogenase 1, Fibrinogen alpha-Kette Preproprotein, Fructose-Eisphosphat-Aldolase B, Argininosuccinatsynthetase, Eef1a2, ATP5A1, alpha-2-Actin, Regucalcin, Serumalbumin, mitochondriale Malatdehydrogenase, mitochondriale Acetoacetyl-CoA-Thiolase.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung der Probe mit Hilfe eines Diagnostikums durchgeführt wird, das dazu geeignete bioanalytische Verfahren, wie zum Beispiel Immunhistochemie, Antikörperarrays, Luminex, ELISA, Immunfluoreszenz, Radioimmunoassays verwendet.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung der Probe mittels massenspektrometrischer Verfahren wie MRM (Multi reaction monitoring) oder AQUA (absolute Quantification) erfolgt, mit deren Hilfe die Markerproteine quantitativ bestimmbar sind.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Untersuchung der Probe mit Hilfe einer 2D-Elektrophorese erfolgt, wobei in der ersten Dimension eine isoelektrische Fokussierung, in der zweiten Dimension eine Gelelektrophorese durchgeführt wird.

7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Gelelektrophorese eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist.

8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Proben vor Durchführung der 2D-Gelelektrophorese mit einem Farbstoff gelabelt werden.

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Farbstoff Cy2, Cy3 und/oder Cy5 ist.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe eine Leberbiopsieprobe ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Probe ein Blutserum, Blutplasma oder Vollblut ist.

12. Verwendung von ER60, Vimentin, Actin alpha 1 skeletales Muskelprotein, hMFAP 4, Tropomyosin, PTGES 2, Amyloid P-Komponente, Transgelin, Calponin 1, Homo sapiens p20 Protein, 17 kDa Myosin leichte Kette, H Chain Igg B12, Prolyl 4-hydroxylase beta subunit, Methylentetrahydrofolatdehydrogenase 1, PRO2619, Aldehyddehydrogenase 1, Fibrinogen alpha-Kette Preproprotein, Fructose-Eisphosphat-Aldolase B, Argininosuccinatsynthetase, Eef1a2, ATP5A1, alpha-2-Actin, Regucalcin, Serumalbumin, mitochondriale Malatdehydrogenase, mitochondriale Acetoacetyl-CoA-Thiolase als Marker zum Nachweis einer Leberentzündung, insbesondere einer hepatischen Fibrose.

13. Verwendung mindestens eines der in Anspruch 12 genannten Markerproteine zur Differentialdiagnose, insbesondere differentialdiagnostischer Früherkennung, Verlaufsprognose der Lebererkrankung, Beurteilung des Schweregrades, therapiebegleitende Verlaufsbeurteilung, Ätiologie und in-vitro-Diagnostik.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6	Patient 7
fibrotisch							
nicht-fibrotisch							

Fig. 1