



PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

 Internationales Büro

 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE

 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 9/00</p>	A2	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/10480</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 4. März 1999 (04.03.99)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/05275</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 19. August 1998 (19.08.98)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 197 37 105.1 26. August 1997 (26.08.97) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BOEHM, Thomas [DE/DE]; Freiburgerstrasse 30, D-79279 Vörstetten (DE). DEAR, Neil, T. [AU/DE]; Wundstrasse 31, D-69123 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; D-67056 Ludwigshafen (DE).</p>		<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AU, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, GE, HU, ID, IL, JP, KR, KZ, LT, LV, MK, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TR, UA, US, 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).</p> <p>Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p>
<p>(54) Title: NEW TISSUE-SPECIFIC CALPAINES, THEIR PRODUCTION AND THEIR USE</p> <p>(54) Bezeichnung: NEUE GEWEBSSPEZIFISCHE CALPAINE, IHRE HERSTELLUNG UND VERWENDUNG</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention relates to new tissue-specific calpaines and their production. The invention also relates to a method for screening for new calpaine inhibitors and their use.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft neue gewebsspezifische Calpaine und ihre Herstellung. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Screening nach neuen Calpaininhibitoren und deren Verwendung.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Neue gewebspezifische Calpaine, ihre Herstellung und Verwendung

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neue gewebspezifische Calpaine und ihre Herstellung.

Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zum Screening nach
10 neuen Calpaininhibitoren und deren Verwendung.

Calpaine gehören zu den intrazellulären, nicht-lysosomalen Enzymen aus der Gruppe der Cystein-Proteasen. Sie sind an der Ca²⁺-abhängigen Signaltransduktion in eukaryontischen Zellen be-
15 teilt, d.h. sie regulieren abhängig von der Ca²⁺ Konzentration zelluläre Funktionen. Calpaine kommen ubiquitär in tierischen Geweben bzw. Zellen von beispielsweise Mensch, Hühnern, Kaninchen oder in der Ratte vor. Auch in niederen Tieren wie beispielsweise in *Drosophila melanogaster*, *Schistosoma* oder *Caenorhabditis*
20 *elegans* wurden Calpaine gefunden. In Hefen, Pilzen oder Bakterien konnten bisher keine Calpaine nachgewiesen werden.

Bisher sind drei Hauptisoformen dieser ubiquitären Calpaine bekannt, die sich in vitro durch ihre Kalzium-abhängige Aktivier-
25 barkeit unterscheiden. Calpain I (= μ Calpain) wird durch μ -molare Kalziumion-Konzentrationen aktiviert, während Calpain II (= mCalpain) erst durch millimolare Konzentrationen an Kalziumionen aktiviert wird. Beide Calpaine bestehen aus zwei Untereinheiten, einer großen Untereinheit mit ca. 80 kDa und einer
30 kleinen Untereinheit von ca. 30 kDa. Beide Untereinheiten des aktiven Heterodimers besitzen Bindungsstellen für Kalzium. Die große Untereinheit wird aus folgenden vier Proteindomänen (= I - IV) aufgebaut: einer Proteasedomäne (= Domäne II), einer Kalzium-bindenden Domäne (= Domäne IV) und zwei weiteren Domänen
35 (= Domäne I und III), deren Funktion unklar ist. Die kleine 30 K-Untereinheit besteht aus einer Kalzium-bindenden Untereinheit (= IV') und einer weiteren Untereinheit (= V), deren Funktion unklar ist. Zusätzlich zu diesen beiden Calpaintypen wurde ein dritter bezüglich der Kalziumaktivierung intermediärer
40 Typ (= μ /m 80K) im Huhn gefunden (Wang K.K.W. et al., TIPS, Vol. 15, 1994: 412 - 419, Suzuki, K et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, Vol. 376, 1995: 523 - 529).

Neben diesen ubiquitär vorkommenden Calpainen wurden in letzter
45 Zeit zwei neue gewebespezifisch exprimierte Calpaine identifiziert. nCL-1 (= p94) ist ein in Hühnern, Ratten und Menschen vorkommendes, Muskel-spezifisches Calpain, das vermutlich als Mono-

mer aktiv sein könnte und nur aus der 80 kd Untereinheit besteht. Neben nCL-1 gibt es ein Magen-spezifische Calpain, das in zwei Splicing-Varianten nCL-2 und nCL-2' vorkommen kann. nCL-2' unterscheidet sich gegenüber nCL-2 durch das Fehlen der Kalziumbindenden Region (Sorimachi, H.S. et al., J. Biol. Chem. Vol. 268, No. 26, 1993: 19476 - 19482, Sorimachi, H.S: et al., FEBS Lett. 343, 1994: 1 - 5). Auch in Drosophila wurde ein Calpain-homologes Protein (= CalpA), das mit Actin interagiert und vermutlich eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung spielt, gefunden, daß zwei verschiedene Splicing-Varianten aufweist (Mol. Cell. Biol. Vol. 15, No. 2, 1995: 824 - 834). Auch hier fehlt der kürzeren Variante die Kalziumbindestelle.

Man vermutet, daß Calpaine bei verschiedenen physiologischen Prozessen eine wichtige Rollen spielen. Eine Vielzahl von cytoskeletalen, membrangebundenen oder regulatorischen Proteinen wie Proteinkinase C, Phospholipase C, Spectrin, Cytoskelett-Proteine wie MAP2, Muskelproteine, Neurofilamente und Neuropeptide, Plättchenproteine, -"Epidermal Growth Factor"-, NMDA-Rezeptor und Proteine, die an der Mitose beteiligt sind, sowie weitere Proteine sind Calpainsubstrate (Barrett M.J. et al., Life Sci. 48, 1991: 1659 - 69, Wang K.K. et al., Trends in Pharmacol. Sci., 15, 1994: 412 - 419). Die normale physiologische Funktion der Calpaine ist bis heute jedoch noch nicht klar verstanden. Sie sind bei einer Vielzahl von physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Apoptose, der Zellteilung und -differenzierung oder an der Embryonalentwicklung beteiligt.

Bei verschiedenen pathophysiologischen Prozessen und Krankheiten wurden erhöhte Calpain-Spiegel gemessen, zum Beispiel bei: Ischämien des Herzen (z.B. Herzinfarkt), der Niere oder des Zentralnervensystems (z.B. Hirnschlag), Entzündungen, Muskeldystrophien, Katarakten der Augen (Grauer Star), Verletzungen des Zentralnervensystems (z.B. Trauma), Alzheimer Krankheit, HIV-induzierte Neuropathy, Parkinsonsche- und Huntingtonsche Krankheit usw. (siehe Wang K.K. oben). Man vermutet einen Zusammenhang dieser Krankheiten mit einem erhöhten und anhaltenden intrazellulären Kalziumspiegel. Dadurch werden Kalzium-abhängige Prozesse überaktiviert und unterliegen nicht mehr der physiologischen Regelung. Dementsprechend kann eine Überaktivierung von Calpainen auch pathophysiologische Prozesse auslösen.

Daher wurde postuliert, daß Inhibitoren der Calpain-Enzyme für die Behandlung dieser Krankheiten nützlich sein können. Verschiedene Untersuchungen bestätigten dies. So haben Seung-Chyul Hong et al. (Stroke 1994, 25 (3), 663 - 669) und Bartus R.T. et al. (Neurological Res. 1995, 17, 249 - 258) eine neuroprotektive

Wirkung von Calpaininhibitoren bei akuten neurodegenerativen Störungen, wie sie nach Hirnschlag auftreten, gezeigt. Ebenso verbesserten nach experimentellen Gehirntraumata Calpaininhibitoren die Erholung der auftretenden Gedächtnisleistungsdefizite und neuromotorischen Störungen (Saatman K.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 1996: 3428 - 3433). Edelstein C.L. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 1995, 7662 - 7666) fand eine protektive Wirkung von Calpaininhibitoren auf durch Hypoxie geschädigten Nieren. Yoshida K.I. et al. (Jap. Circ. J. 59 (1), 1995, 40 - 48) konnten günstige Effekte von Calpaininhibitoren nach cardialen Schädigungen aufzeigen, die durch Ischämie oder Reperfusion erzeugt wurden. Da Calpaininhibitoren die Freisetzung von β -AP4-Protein hemmen, wurde eine potentielle Anwendung als Therapeutikum der Alzheimer Krankheit vorgeschlagen (Higaki J. et al., Neuron, 14, 1995: 651 - 659). Die Freisetzung von Interleukin- 1α wird ebenfalls durch Calpaininhibitoren gehemmt (Watanabe N. et al., Cytokine, 6 (6), 1994: 597 - 601). Weiterhin wurde gefunden, daß Calpaininhibitoren cytotoxische Effekte an Tumorzellen zeigen (Shiba E. et al., 20th Meeting Int. Ass. Breast Cancer Res., Sendai Jp, 1994, 25. - 28. Sept., Int. J. Onco. 5 (Suppl.), 1994, 381). Auch bei der Restenose und bei Arthritis spielt Calpain eine wichtige Rolle und Calpaininhibitoren können das Krankheitsbild positiv beeinflussen (March K:L: et al. Circ. Res. 72, 1993: 413 - 423, Suzuki K. et al., Biochem J., 285, 1992: 857 - 862).

Weitere mögliche Anwendungen von Calpaininhibitoren sind Wang K.K (Trends in Pharmacol. Sci., 15, 1994: 412 - 419) zu entnehmen.

Der potenteste und selektivste Calpaininhibitor ist das natürlich vorkommende intrazelluläre Protein Calpastatin. Es hemmt sowohl Calpain I als auch Calpain II, nicht jedoch andere Cystein- bzw. Thiolproteasen wie Cathepsin B, L oder Papain. Das aus ca. 700 Aminosäuren bestehende Calpastatin hat jedoch den Nachteil, daß es für therapeutische Möglichkeiten aufgrund der Größe und der Unpassierbarkeit der Zellmembran nicht in Frage kommt. Neben niedermolekularen peptidischen Calpaininhibitoren wurden eine Reihe nicht-peptidischer Inhibitoren identifiziert. Nachteil dieser Inhibitoren ist, daß sie instabil sind, rasch metabolisiert werden und zum Teil toxisch sind. Viele Calpaininhibitoren zeichnen sich außerdem durch eine mangelnde Selektivität aus, d.h. sie hemmen nicht nur Calpain I und II sondern auch andere Cysteinproteasen wie Papain, Chymotrypsin, Elastase oder Cathepsin B und L.

Es besteht daher nach wie vor ein Bedarf nach selektiven, hoch wirksamen Calpaininhibitoren. Für das Screening nach diesen selektiven, gut wirksamen Calpaininhibitoren sind hochspezifische Testsysteme erforderlich, die es ermöglichen selektive Inhibitoren zu identifizieren. Üblicherweise werden die Screeningtests mit den ubiquitär vorkommenden Calpainen Calpain I und Calpain II durchgeführt.

Für das Auffinden selektiver Inhibitoren ist es notwendig und wünschenswert weitere Calpaine zur Testung zur Verfügung zu stellen, die möglichst gewebespezifisch exprimiert werden, so daß die Inhibitoren auf ihre Selektivität zwischen den einzelnen Calpainen geprüft werden können.

Darüber hinaus sind weitere neue Calpaine gesuchte Proteine, da sie mit hoher Wahrscheinlichkeit bei den verschiedenen Krankheitsbildern bzw. Krankheiten unterschiedlich exprimiert werden und eine wichtige Rolle bei diesen Krankheiten spielen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, Mittel zur Profilierung und Identifizierung von Calpaininhibitoren zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen Calpaininhibitoren zu identifizieren, die einerseits nur gegenüber einem Calpain inhibierende Wirkung aufweisen, und/oder andererseits gegenüber mehreren Calpainen inhibierende Wirkung aufweisen und diese als therapeutisches Target zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung ist ein neues gewebsspezifisches Calpaingen mit der Sequenz SEQ ID NO. 1 oder SEQ ID NO. 3 und der Bezeichnung CAPN6, seine allelischen Varianten, Analoge oder Derivate, die auf der abgeleiteten Aminosäureebene eine Homologie von 60 bis 100 % aufweisen, wobei die Calpaingene, ihre allelischen Varianten, Analoge oder Derivate folgende Sequenzen enthalten:

35

(a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala,

wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Cystein im humanen Calpain I, die die Position 115 im Calpain I besitzt, gegen Lysin, das an Position 81 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist;

40

(b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala,

wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122 und 125 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und 91 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind;

45

- (c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr,
wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Histidin, Alanin und Serin in den Positionen 272, 273 und 275 gegen Tyrosin, Threonin und Threonin in den Positionen 252, 253 und 255 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind und in der SEQ ID No. 3 zusätzlich der Tyrosinrest in Position 274 im Calpain I gegen Histidin in Position 254 in der SEQ ID No. 3 verändert ist;
- 10 (d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly
wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Tryptophan im humanen Calpain I, die die Position 298 im Calpain I besitzt, gegen Leucin, das an Position 286 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist und

X in den genannten Sequenzen eine beliebige natürliche Aminosäure bedeutet.

20

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, wobei man ein Calpain, seine allelischen Varianten oder Analoge codiert durch eine Sequenz gemäß Anspruch 1 aus Geweben oder Zellen isoliert und die Inhibierung der Spaltung eines Substrats des Enzyms CAPN6 und in mindestens einem weiteren Test die Inhibierung der Spaltung eines Substrats der Enzyme Calpain I und/oder II durch Testsubstanzen mißt und die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 und mindestens ein weiteres der Calpaine hemmen.

30

Weiterhin ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, dadurch gekennzeichnet, daß man die Inhibierung der Spaltung eines Substrates des Enzyms CAPN6 bzw. der Calpaine I und/oder II durch Testsubstanzen in zellulären Systemen bestimmt und solche Testsubstanzen auswählt, die die Zellmembran passieren und die intrazelluläre Aktivität des Enzyms CAPN6 und/oder der Calpaine I und/oder II hemmen, die das Enzym CAPN6 nicht hemmen, jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II oder die das Enzym CAPN6 hemmen, nicht jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II. Auch Substanzen, die eine Aktivität in vitro gegenüber den Calpainen zeigen, ohne daß ihre Zellgängigkeit getestet wurden, werden vorteilhafterweise ausgewählt. Zeigt sich in einem anschließenden Assay, das diese Substanzen nicht oder nur schlecht zellgängig sind, so kann durch Derivatisierung ihre Zellpermeabilität verbessert werden.

Humane μ - und m-Calpainproteinsequenzen wurden für eine Homologiesuche in der EST-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) unter Verwendung des BLAST Verfahrensprogramms verwendet. Es wurde eine

5 Sequenz mit der Bezeichnung EST AA050030 gefunden, die eine für Calpaine typische Sequenz aufweist. Mit Hilfe dieser Sequenz ließ sich ein Klon aus der Maus darstellen, der für ein Gen kodiert, dessen erfindungsgemäße Genprodukt als neues Calpain die Bezeichnung CAPN6 (= nCL-4) erhielt. Die Nucleinsäuresequenz des Klons

10 nCL-4 ist Sequenz SEQ ID NO: 1 zu entnehmen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des Calpains CAPN6 ist der Sequenz SEQ ID NO: 2 zu entnehmen. Die unter Berücksichtigung eines vorhandenen Introns deduzierte Aminosäuresequenz weist eine typische Calpain-signatur auf, wobei eine Zuordnung zu den bekannten Calpain-Sub-

15 familien μ Calpain, mCalpain, nCL-1 oder nCL-2 aufgrund der geringen Homologie nicht möglich ist. Es handelt sich bei dem Calpain CAPN6 um ein neues bisher unbekanntes Calpain. Die weiteren Untersuchungen mit dieser Sequenz aus Mäusen in der EST-Datenbank lieferte darüberhinaus noch 4 humane Teilsequenzen (AA169715,

20 C17331, C16980 und T39424) mit einer Homology zur Maus CAPN6-Sequenz. Diese Teilsequenzen konnten zu einer fortlaufenden Sequenz, die für ein 374 Aminosäuren langes Protein kodiert, zusammengesetzt werden. Dieser Sequenz fehlt sowohl das typische Startcodon für Methionin als auch das Stopcodon. Bei dieser

25 Sequenz handelt es sich deshalb wohl nur um eine Teilsequenz des humanen Orthologue zur klonierten Mausequenz. Die Homologie beider Sequenzen über die 374 Aminosäuren liegt bei 94,9 % (Figur 1).

30 Die von der Gensequenz SEQ ID NO:1 abgeleitete Proteinsequenz zeigt mit 30 % Homologie die größte Homologie zum bekannten *Caenorhabditis elegans* Gen tra-3 über die gesamte Aminosäuresequenz. Die Homologie zu den anderen bekannten Calpainen liegt zwischen 20,9 % (Ratten nCL-2) bis zu 25,4 % (Maus mCalpain). In

35 einem Sequenzvergleich nach Lipman-Pearson (Ktupl 2, Gap Penalty 4, Gap Length Penalty 12) zwischen CAPN6 und humanen CAPN1 (= CAN1_HUMAN, Aoki et al., FEBS Lett. 205, 1986: 313 - 317), humanen CAPN2 (= CAN2_HUMAN, Aoki et al., Biochemistry 27, 1988: 8122 - 8128), Ratten-CAPN2 (= CAN2_RAT, Deluca et al., Biochim.

40 Biophys. Acta 1216, 1993: 81 - 93), humanen CAPN3 (= CAN3_HUMAN, Richard et al., Cell 81, 27 - 40) Ratten-CAPN3 (= CAN3_RAT, Sorimachi et al., J. Biol. Chem. 264, 1989: 20106 - 20111) und *Drosophila* Calpain (= DMCLPNOCM_1) über Teilsequenzen von 230 - 520 Aminosäuren wurden leicht größere Homologien von 32,8 bis

45 39,5 % gefunden, die aber insgesamt geringer als die Homologien zu tra-3 liegen (Figur 1, Alignment, Clustal method with PAM25 residue weight tabl.). Neben tra-3 weist CAPN6 eine ausgeprägte

Homologie zum kürzlich beschriebenen CAPN5-Calpain auf (44,2 % Homologie Aktenzeichen P 19 718 248.8).

Sequenzvergleiche zwischen der Maus und humanen CAPN6-Sequenz in
5 verschiedensten Datenbanken ergaben Homologien zu CalpA, Tra-3
und humanen Sequenzen mit den Bezeichnungen C16980, T39424,
AA16971, R93331 und G17331 über deren Funktionen keine Angaben
gemacht wurden. Die Sequenzvergleiche wurden mit der Genbank EST-
und Datenbanken am National Center for Biotechnology Information
10 ([http: Hwww.ncbi.nlm.nih.yor](http://Hwww.ncbi.nlm.nih.yor)) und der Wash-U-Datenbank durchge-
führt (Homo sapiens). In den Datenbanken wurde außerdem eine Maus
EST-Sequenz mit der Bezeichnung AA050030 und der Bezeichnung als
Calpain gefunden. Weitere Angaben konnten den Datenbanken nicht
entnommen werden. Die vollständigen Gensequenzen von AA16971T,
15 R93331, C17331 und AA050030 sind unbekannt.

Beide Calpaine (CAPN5 und CAPN6) weisen gemeinsame Eigenschaften
auf, die sie von den anderen Calpainen unterscheiden. CAPN5 und
CAPN6 weisen im Vergleich zu den anderen Calpainen neben einer
20 verkürzten Domäne I ein verändertes C-terminales Ende auf, das
keine ausgeprägte Homologie zur Domäne IV der anderen Calpaine
hat. Im Bereich der Domäne IV liegt die Konsensussequenz der
Ca²⁺-Bindungsstelle der Calpaine (sog. "EF-hand"). Diese Ca²⁺-
Bindungsstelle fehlt im Falle von CAPN5 und CAPN6, daß heißt
25 möglicherweise wird kein Ca²⁺ an der Domäne IV gebunden und die
Proteine werden auf anderem Wege aktiviert. Sie sind damit die
einzigen Vertebraten-Calpaine, denen die Calmodulin ähnliche
Domäne IV fehlt.

30 Die abgeleitete CAPN6-Aminosäuresequenz besitzt als weitere
Besonderheit ein verändertes katalytisches Zentrum. Nur der
Asn-Rest in Position 284 ist konserviert. Der Cysteinrest in
Position 81 und der Histidinrest in Position 252 wurden jeweils
gegen Lysin bzw. Tyrosin in der Maus CAPN6-Sequenz ausgetauscht.
35 Darüberhinaus wurden weitere ausgetauschte Aminosäuren beim Ver-
gleich der CAPN6 Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 mit dem
humanen Calpain I (= CAPN1, Aoki et al., FEBS Lett. 205, 1986:
313 -317) im Bereich des katalytischen Zentrums identifiziert. So
sind die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122
40 und 125 des CAPN1 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und
91 im CAPN6 verändert. Ebenfalls verändert sind die Aminosäuren
Histidin, Alanin, Serin und Tryptophan in den Positionen 272,
273, 275 und 298 im CAPN1 zu Tyrosin, Threonin, Threonin und
Leucin in den Positionen 252, 253, 255 und 286 im CAPN6. Die
45 Zuordnung der Aminosäuren an den verschiedenen Positionen der
Proteine CAPN1 und CAPN6 erfolgt durch Sequenzvergleich und
Zuordnung der konservierten Regionen der Proteine zueinander,

so daß eine maximale Übereinstimmung zwischen den Proteinen auf Aminosäureebene erfolgt. So können beispielsweise dieselben Sequenzen in unterschiedlichen Proteinen einer Proteinfamilie an sehr unterschiedlichen Stellen bzw. Positionen lokalisiert werden.

Die humane CAPN6-Sequenz weist zusätzlich zum Austausch des Cysteinrestes einen Austausch des Tyrosins in Position 254 gegen Histidin auf (Tabelle 1). Eine mögliche Erklärung könnte beispielsweise sein, daß CAPN6 eine gegenüber den anderen Calpainen geänderte Substratspezifität hat oder das aktive Zentrum nicht kritisch für die CAPN6-Funktion ist, daß es ein Hemmstoff anderer Calpaine ist oder daß CAPN6 ein Pseudogen ist. Diese letzte Möglichkeit scheint aufgrund der Vielzahl der konservierten Aminosäuren unwahrscheinlich zu sein. Wahrscheinlich kann der Cysteinrest in Position 89 in der Katalysereaktion die Funktion des fehlenden Cysteinrestes in Position 81 übernehmen. Selbst wenn CAPN6 keine Proteaseaktivität hätte, was sehr unwahrscheinlich ist, so könnte es an regulatorischen Prozessen beteiligt sein, möglicherweise indem es mit anderen Calpainen um Bindungsplätze an Cofaktoren oder Substraten konkurriert.

Tabelle 1: CAPN6 genomische Sequenzen

Aminosäure Nr.	81*	89	254*	284*	286 ¹
Maus CAPN6 (129 ES Zellen DNA)	K	C	Y	N	L
Mensch CAPN6 (HeLa Zellen DNA)	K	C	H	N	L
andere Calpaine	C	S/C	Y	N	W

* Aminosäuren des aktiven Zentrums (Arthur et al., FEBS Lett. 368, 1995: 397 - 400)

¹ niedrige Aktivität ohne Leucin in m-Calpain (Arthur et al., FEBS Lett. 368, 1995: 397 - 400)

Tra-3 ist an der Geschlechtsbestimmung von *Caenorhabditis elegans* beteiligt. In einer Kaskade von mehreren Genen und deren Genprodukten entscheidet tra-3 mit darüber, ob sich *Caenorhabditis* Männchen oder Hermaphroditen entwickeln (Kuwabara P.E. et al., TIG, Vol. 8, No.5, 1992: 164 - 168). Tra-3 scheint an der Spermatogenese beteiligt zu sein. Die Konservierung der Aminosäuren in den verschiedenen Domänen zwischen Maus CAPN6 und tra3 beträgt 39,2 %; 42,0 %; 30,9 % und 22 % jeweils für die Domänen I, II, III und T.

Ausgehend von aus (Ia) 17 Mausembryo mRNA abgeleiteten cDNA konnte mit Hilfe einer modifizierten RACE-Methode (= rapid amplification of cDNA ends) nach Frohman et al. (Proc. Natl. Acad.

Sci. USA 85, 1988, 8998 - 9002) bzw. Edwards et al. (Nucl. Acids Res. 19, 1991, 5227 - 5232) unter Verwendung der oben genannten Primer (Cal6 und Cal9) sowie Sequenzen, die sich vom EST AA050030 ableiten, die Gesamtsequenz des Klonen CAPN6 kloniert werden. Die
5 SEQ ID No. 1 kodiert für ein Protein mit 641 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 74,6 kDa. Dem Startcodon Methionin ist eine typische Sequenz für den Translationsstart vorgelagert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung mehrerer cDNA-Klone mit der genannten Sequenz bestätigt.

10

Figur 2 gibt die Homologien zwischen Maus CAPN5 (= nCL-3), human CAPN5 (= nCL-3), Maus CAPN6 (= nCL-4) und humanen CAPN6 (= nCL-4) wieder. Figur 2 zeigt außerdem die Sequenzen von *Caenorhabditis tra-3*, humanen p94, Maus m-Calpain, humanen μ -Calpain und Ratten
15 nCL-2. Aminosäuren, die zwischen den verschiedenen Calpainen und CAPN6 übereinstimmen sind durch dunkle Kästchen gekennzeichnet. Striche deuten Lücken an, die um eine maximale Übereinstimmung der Sequenzen zu erreichen, eingeführt wurden. Aus der humanen p94-Sequenz wurden zwei Sequenzen der Übersichtlichkeit wegen
20 entfernt. Diese Bereiche wurden mit = gekennzeichnet. Die konservierten Aminosäuren des katalytischen Zentrums wurden mit Pfeilen markiert. Die CAL6 und CAL9 entsprechenden Aminosäure-Sequenzen wurden unterstrichen. Die Domänenbezeichnungen wurden über den relevanten Sequenzsegmenten angegeben.

25

Figur 3 gibt den phylogenetischen Stammbaum der verschiedenen Calpaine wieder. Die phylogenetischen Analysen zur Aufstellung dieses Stammbaums wurden unter Verwendung der nächsten Nachbar-Methode (Saitou et al. Mol. Biol. Evol. 4, 1987, 406 - 425)
30 unter Ausschluß der Lücken durchgeführt. Mit Hilfe dieser phylogenetischen Analysen konnten die Vertebraten-Calpaine in sechs verschiedene Gruppen aufgeteilt werden (Figur 3, rechte Seite). Die Nicht-Vertebraten-Calpaine lassen sich der CAPN5-(= nCL-3-) und CAPN6-(= nCL-4-)Gruppe als nächste Nachbarn zuordnen und
35 stehen in einer eigenen Gruppe. Die CAPN5 und CAPN6 Gene bilden damit je eine eigene Gruppe von Calpainen, die eine größere Ähnlichkeit zu Invertebraten Calpaine haben als zu Vertebraten Calpaine. Die Länge der horizontalen Linien ist proportional zur phylogenetischen Entfernung der verschiedenen Calpaine. Die Länge
40 der vertikalen Linien ist ohne Bedeutung. Die für die Aufstellung des phylogenetischen Stammbaums verwendeten Sequenzen haben die folgenden SWISSPROT- und EMBL-Nummern ("accession numbers"):
Mensch m (P17655), μ (P07384), p94 (P20807); Ratten m (Q07009), nCL-2 (D14480), p94 (P16259); Maus p94 (X92523); Hühner m
45 (D38026), μ (D38027), μ /m (P00789), p94 (D38028); Nematoden tra-3 (U12921); *Drosophila* Calp A (Q11002) und Dm (X78555), *Schistosoma* (P27730). Die humane nCL-2-Teilsequenz entspricht der Translation

des EST-Klon AA026030 (Hellier et al., 1995, The Wash U-Merck EST-Projekt).

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des EST-Klon AA026030 weist
5 eine höhere als übliche Homologie nach dieser Analyse zur Ratten
nCL-2-Sequenz auf. Da hier nur eine Teilsequenz für die Analyse
verwendet wurde, hat der für nCL-2 erhaltene phylogenetische
Stammbaum eine höhere Ungenauigkeit. Die Nematoden CPL1-Sequenz
ist die korrigierte Version wie sie von Barnes und Hodjkin
10 (EMBOJ., 1996, 15:4477-4484) verwendet wurde.

Die ersten 7 Exons wurden, wie sie aus der EMBL-Datenbank
(Accession No. L25598) zu entnehmen sind, verwendet, während
die letzten 5 Exons durch Verbindung der Nucleotide 8028-8133,
15 8182-8239, 8729-8818, 8865-8983 und 9087 bis zum Ende erhalten
wurde. Die abgeleitete N-terminale Sequenz ist aufgrund ihrer
Länge und ihrer vielen Glycinreste für Calpain ungewöhnlich.

Das erfindungsgemäße neue gewebsspezifische Calpain CAPN6 wird
20 nur im Gewebe aus der Placenta exprimiert (Figur 4). Die mensch-
liche Placenta ist ein rasch wachsendes und sich schnell aus-
differenzierendes Organ. Sie wird deshalb auch als "pre malignes
Gewebe" bezeichnet, da sie ein hochinvasives Gewebe ähnlich dem
von malignen Tumoren ist.

25 Proteasen spielen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung und
Differenzierung von Zellen und damit auch in der Plazenta. Die
Plazenta ist reich an Proteasen und Proteaseinhibitoren, die in
einem ausgewogenen Gleichgewicht die Entwicklung der Plazenta
30 ermöglichen. CAPN6 scheint hier eine wichtige Rolle als Protease
zu spielen und/oder ist möglicherweise an der Regulation anderer
Calpain-Cystein-Proteasen beteiligt.

Dort spielt es möglicherweise bei Krankheitsprozessen der
35 Placenta wie der Gestose (= Präeklampsie) eine Rolle, die
in 5 bis 7 % aller Schwangerschaften auftritt. Präeklampsie
(= schwangerschaftsinduzierter Bluthochdruck) ist eine der
häufigsten schwangerschaftsbedingten Komplikationen, charak-
terisiert durch Hypertonie und Proteinurie, häufig kombiniert
40 mit exzessiven Ödemen und unter Umständen mit Krampfanfällen.
Präeklampsie während der Schwangerschaft ist eine wichtige
Ursache für den Tod von Mutter und Kind, von Frühgeburten oder
in leichteren Fällen von Unterernährung oder Wachstumsstörungen
des Embryos. Es handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen
45 an dem beispielsweise genetische Faktoren (rezessive oder
dominante Gene), die mütterliche Immuntoleranz, Vasodilator/

Vasoconstriktorungleichgewichte und vermutlich auch CAPN6 beteiligt ist.

Frauen, die an Präeklampsie erkrankt sind, zeigen einen veränderten Vasopressinase- und Angiotensinasespiegel, der möglicherweise durch CAPN6 regulativ beeinflusst wird.

Eine weitere mögliche Funktion von CAPN6 könnte die Regulation des Abbaus von Somatostatin, Glucagon und Wachstumshormon in der Placenta sein und damit das Wachstum des Foetus beeinflussen. Auch der Abbau von mütterlichem Serumproteinen könnte durch CAPN6 beeinflusst werden, die ebenfalls das Wachstum des Foetus stimulieren.

Möglicherweise nimmt CAPN6 am komplexen Geschehen der Plazenta-schleimhaut während der Embryogenese teil und steuert so die durch z.B. TNF α und IFN γ induzierte Apoptose der Trophoblasten, in dem es andere Calpaine reguliert. CAPN6 scheint damit an der Embryonalentwicklung beteiligt zu sein.

Für die Identifizierung von selektiven Calpaininhibitoren sind möglichst spezifische Verfahren zur Identifizierung der Inhibitoren erforderlich. Wichtig dabei ist, daß die selektierten Inhibitoren nur das gewünschte oder die gewünschten Calpaine hemmen, nicht jedoch andere Cystein-Proteasen und damit in physiologische Prozesse eingreifen.

Die auf ihre inhibitorische Aktivität hin zu prüfenden Testsubstanzen können beispielsweise chemische Substanzen, mikrobielle oder pflanzliche Extrakte sein. Sie werden üblicherweise neben den Test auf ihre Inhibitoraktivität gegenüber CAPN6, Calpain I und/oder II auf ihre Aktivität gegenüber Cathepsin B oder andere Thiolproteasen getestet.

Idealerweise sollten gute Inhibitoren keine oder nur geringe Aktivität gegenüber Cathepsin B, L, Elastase, Papain, Chymotrypsin oder andere Cystein-Proteasen aufweisen, aber eine gute Aktivität gegenüber den Calpainen I und II aufweisen.

Durch das erfindungsgemäße neue gewebsspezifische Calpain CAPN6 können mit den erfindungsgemäßen Verfahren Inhibitoren identifiziert werden, die zu ihrer inhibitorischen Wirkung zwischen den verschiedenen Calpainen Calpain I, II, nCL-1 nCL-2 und/oder nCL-4 diskriminieren können.

45

Die verschiedenen Inhibitortests wurden dabei wie folgt durchgeführt:

Cathepsin B-Test

5

Die Cathepsin B-Hemmung wurde analog einer Methode von S. Hasnain et al., J. Biol. Chem. 1993, 268, 235 - 240 bestimmt.

Zu 88 µl Cathepsin B (Cathepsin B aus menschlicher Leber von der
10 Firma Calbiochem, verdünnt auf 5 Units in 500µM Puffer) werden
2 µl einer Inhibitorlösung, hergestellt aus der zu testenden
chemischen Substanz, einem mikrobiellen oder pflanzlichen Extrakt
und DMSO (Endkonzentration: 100 µM bis 0,01 µM) zugegeben. Dieser
Ansatz wird für 60 Minuten bei Raumtemperatur (= 25 °C) vor-
15 inkubiert und anschließend die Reaktion durch Zugabe von 10 µl
10 mM Z-Arg-Arg-pNA (in Puffer mit 10 % DMSO) gestartet. Die
Reaktion wird 30 Minuten bei 405 nm im Mikrotiterplattenreader
verfolgt. Aus den maximalen Steigungen werden anschließend die
IC₅₀'s bestimmt.

20

Calpain I und II-Test

Die Aktivität der Calpaininhibitoren wurde in einem colori-
metrischen Test mit Casein nach Hammarsten (Merck, Darmstadt)
25 als Substrat untersucht. Der Test wurde in Mikrotiterplatten,
entsprechend der Veröffentlichung von Buroker-Kilgore und Wang
in Anal. Biochem. 208, 1993, 387 - 392, durchgeführt. Als Enzyme
wurde Calpain I (0,04 U/Test) aus Erythrozyten und Calpain II
(0,2 U/Test) aus Nieren, beide vom Schwein, der Firma Calbiochem,
30 benutzt. Die zu testenden Substanzen wurden mit dem Enzym für
60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei eine Konzentration
von 1 % des Lösungsmittels DMSO nicht überschritten wurde. Nach
Zugabe des Bio-Rad Farbreagenz erfolgte die Messung der optischen
Dichte bei 595 nm in dem Easy Reader EAR 400 der Firma SLT.
35 Die 50 %ige Aktivität des Enzyms ergibt sich aus den optischen
Dichten, die bei der maximalen Aktivität des Enzyms ohne Inhibi-
toren und der Aktivität des Enzyms ohne Zugabe von Kalzium
bestimmt wurden.

40 Die Aktivität von Calpaininhibitoren kann ferner mit dem Substrat
Suc-Leu-Tyr-AMC bestimmt werden. Diese fluorimetrische Methode
ist bei Zhaozhao Li et al, J. Med. Chem. 1993, 36, 3472-3480
beschrieben.

45 Da Calpaine intrazelluläre Cysteinproteasen sind, müssen
Calpaininhibitoren die Zellmembran passieren, um den Abbau von
intrazellulären Proteinen durch Calpain zu verhindern. Einige

bekannte Calpaininhibitoren, wie zum Beispiel E 64 und Leupeptin, überwinden die Zellmembranen nur schlecht und zeigen dementsprechend, obwohl sie gute Calpaininhibitoren darstellen nur schlechte Wirkung an Zellen. Es ist deshalb vorteilhaft einen
5 zusätzlichen Test für die Membrangängigkeit von potentiellen Calpaininhibitoren wie den humanen Plättchentest durchzuführen.

Plättchen-Test zur Bestimmung der zellulären Aktivität von Calpaininhibitoren

10

Der Calpain vermittelte Abbau von Proteinen in Plättchen wurde, wie von ZhaozhaoLi et al., J. Med. Chem., 36, 1993, 3472- 3480 beschrieben, durchgeführt. Humane Plättchen wurden aus frischem Natrium-Citrat-Blut von Spendern isoliert und in Puffer (5 mM
15 Hepes, 140 mM NaCl und 1 mg/ml BSA, pH 7,3) auf 10^7 Zellen/ml eingestellt.

Plättchen (0,1 ml) wurden für 5 Minuten in $1 \mu\text{l}$ an verschiedenen Konzentrationen an potentiellen Inhibitoren (gelöst in DMSO) vor-
20 inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Kalziumionophor A 23187 ($1 \mu\text{M}$ im Test) und Kalzium (5 mM im Test) und eine weitere Inkubation von 5 Minuten bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Nach einem Zentrifugations-
schritt wurden die Plättchen in SDS-Page Probenpuffer auf-
genommen, 5 Minuten bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ gekocht und die Proteine in einem
25 8%igen Gel aufgetrennt. Der Abbau der beiden Proteine Actin bindendes Protein (= ABP) und Talin wurde durch quantitative Densitometrie verfolgt. Nach der Zugabe von Kalzium und Ionophor
30 verschwanden diese Proteine und es entstanden neue Banden von kleiner 200 Kd Molekulargewicht. Daraus wird die halb maximale Enzymaktivität mit oder als Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt.

Ebenfalls geeignet für die Testung der Membrangängigkeit sind Gewebesteile wie Gehirnschnitte oder Zellkulturen.

35 Test auf Hemmung gegenüber CAPN6 wird in Zellen durchgeführt, die dieses Protein exprimieren und sich dieses mit einem spezifischen Antikörper nachweisen läßt. Werden Zellen mit z. B: Kalzium und dem entsprechenden Ionophor stimuliert, führt dies zu einer Aktivierung von CAPN6. Takaomi Saido beschrieb 1992 im J. Bio-
40 chem. Vol. 11, 81-86 die autolytische Transition von μ -Calpain nach Aktivierung und der Nachweis mit Antikörpern. Entsprechende Antikörper werden für den Nachweis von CAPN6 erzeugt. Calpain-
Inhibitoren verhindern die autolytische Transition und eine entsprechende Quantifizierung ist mit Antikörpern möglich.

45

Neben den beschriebenen in vitro Tests sowie dem zellulären Plättchentest eignen sich alle weiteren dem Fachmann bekannten Calpaintests wie der Test auf Hemmung des Glutamat induzierten Zelltods an corticalen Neuronen (Maulucci-Gedde M.A. et al., 5 J. Neurosci. 7, 1987: 357 - 368), der Kalzium-vermittelte Zelltod in NT2-Zellen (Squier M.K.T. et al., J. Cell. Physiol., 159, 1994: 229 - 237, Patel T. et al., Faseb Journal 590, 1996: 587 - 597) oder die Analyse in Gewebeproben nach Abbauprodukten von Proteinen wie Spectrin, MAP2 oder Tau (Ami Arai et al., Brain 10 Research, 1991, 555, 276 - 280, James Brorson et al., Stroke, 1995, 26, 1259 - 1267).

Für die in vitro-Tests von CAPN6 wird das Calpain CAPN6 oder seine tierischen oder sein humanes Homologes aus Geweben oder 15 Zellen in denen das Enzym üblicherweise oder artifiziell (z.B. durch rekombinante Expression) exprimiert wird wie vorteilhafterweise das Placenta oder aus Zellen oder Mikroorganismen, die mindestens eine Genkopie und/oder einen Vektor mit mindestens einer Genkopie des CAPN6-Gens, seiner allelischen Varianten oder 20 Analoge enthalten, aufgereinigt und als Rohextrakt oder als reines Enzym verwendet.

Für die erfindungsgemäßen Verfahren werden die verschiedenen Calpaininhibitortests vorteilhafterweise in Kombination mit dem 25 Test auf Hemmung der CAPN6-Enzymaktivität durch potentielle Inhibitoren durchgeführt. Dabei werden Inhibitoren so ausgewählt, daß sie entweder nur das Enzym CAPN6 hemmen und nicht die anderen Calpaine oder umgedreht nur die anderen Calpaine und nicht das Enzym CAPN6 oder das Enzym CAPN6 und mindestens ein weiteres 30 Calpain. Inhibitoren gegen CAPN6 können vorteilhafterweise im Falle von Gestose verwendet werden.

Die verschiedenen Inhibitortests werden dabei so ausgeführt, das neben dem Test auf die inhibierende Wirkung der Testsubstanz 35 gegenüber CAPN6, Calpain I und/oder II als Kontrolle die Tests ohne die Testsubstanz durchgeführt wird. Durch diese Testanordnung lassen sich einfach die inhibitorischen Wirkungen der Testsubstanzen erkennen.

40 Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren verwendet CAPN6 oder dessen allelische Varianten, Analoge oder synthetischen Derivate vorteilhafterweise zum Schutz vor der enzymatischen Wirkung anderer Calpaine.

45 Ein weiteres erfindungsgemäßes Verfahren verwendet das Enzym CAPN6 zum Screening nach neuen Calpaininhibitoren, wobei diese Inhibitoren vorteilhafterweise generell alle Calpaine oder ein-

zelne Calpaine wie Calpain I, II, nCL-1, nCL-2 oder CAPN6 hemmen können. Die verschiedenen Testsubstanzen können dabei einzeln oder parallel in Testsystemen getestet werden. Vorteilhafterweise werden die Testsubstanzen in parallelen, automatisierten Testsystemen auf ihre inhibitorische Wirkung hin gescreent.

Für die Inhibitortests sind generell alle Substanzen geeignet. So stammen die Substanzen beispielsweise aus der klassischen chemischen Synthese, aus der Kombinatorik, aus mikrobiellen, tierischen oder pflanzlichen Extrakten. Unter mikrobiellen Extrakten sind beispielsweise Fermentationsbrühen, Zellaufschlüsse von Mikroorganismen oder Substanzen nach Biotransformation zu verstehen. Auch Zellfraktionen sind für die Tests geeignet.

Für die Klonierung des CAPN6-Gens oder seiner tierischen Homologen oder seines humanen Homologen, seiner allelischen Varianten oder Analogen eignen sich alle prokaryontischen oder eukaryontischen Expressionssysteme, die zur Isolierung eines enzymatisch aktiven Genprodukts geeignet sind. Bevorzugt werden Expressionssysteme, die eine Expression der CAPN6-Gensequenzen in bakteriellen, pilzlichen oder tierischen Zellen ganz besonders bevorzugt in Insektenzellen ermöglicht. Unter enzymatisch aktivem Genprodukt sind CAPN6-Proteine zu verstehen, die direkt nach Isolierung aus dem Expressionsorganismus wie beispielsweise aus einer prokaryotischen oder eukaryotischen Zelle oder nach Renaturierung ein aktives Protein ergeben, das in der Lage ist mindestens ein bekanntes Calpainsubstrat wie die oben genannten oder über Autokatalyse sich selbst zu spalten.

Für die Bestimmung der enzymatischen Aktivität sind alle dem Fachmann bekannten Calpaintests wie in vitro-Tests wie die oben beschriebenen Tests für Calpain I und II oder zelluläre Tests wie der Plättchentest geeignet. Dabei können als Detektionsmöglichkeit Tests verwendet werden, die auf Basis eines colorimetrischen Assays (Buroker-Kilgore M. et al., Anal. Biochem. 208, 1993: 387 - 392) oder auf Basis eines Fluoreszenz-Assays beruhen.

Außerdem sind auch alle Teilsequenzen, die das katalytische Zentrum des CAPN6 Gens und/oder weitere Sequenzen des CAPN6 Gens und/oder andere Calpaingensequenzen und/oder andere Sequenzen enthalten und enzymatische Aktivität zeigen, unter enzymatisch aktivem Genprodukt von CAPN6 zu verstehen.

Unter Wirtsorganismen sind alle prokaryotischen oder eukaryontischen Organismen, die als Wirtsorganismen geeignet sind, beispielsweise Bakterien wie *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*,

Streptomyces lividans, Streptococcus carnosus, Hefen wie Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Pilze wie Aspergillus niger, Insektenzellen wie Spodoptera frugiperda, Trichoplusia-Zellen oder alle anderen Insektenzellen, die für
5 eine virale Expression geeignet sind, oder tierische Zellen wie CV1, COS, C127, 3T3 oder CHO oder humane Zellen zu verstehen.

Unter Expressionssysteme sind die Kombination aus den oben beispielhaft genannten Expressionsorganismen und den zu den
10 Organismen passenden Vektoren wie Plasmide, Viren oder Phagen wie das T7 RNA Polymerase/Promoter System oder Vektoren mit regulatorischen Sequenzen für den Phagen λ zu verstehen.

Bevorzugt sind unter dem Begriff Expressionssysteme die Kombination aus Escherichia coli und seinen Plasmiden und Phagen oder
15 das Baculovirus-System und die entsprechenden Insektenzellen wie Spodoptera frugiperda zu verstehen.

Für die vorteilhafte erfindungsgemäße Expression des CAPN6-Gens
20 sind außerdem weitere 3' und/oder 5' Terminale regulatorische Sequenzen geeignet.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression des CAPN6 Gens ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach
25 Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugs-
30 weise die CAPN6 Genexpression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der
35 Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Unter "Enhancer" sind beispielsweise DNA-Sequenzen zu verstehen, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase
40 und DNA eine erhöhte CAPN6-Genexpression bewirken.

Dem CAPN6-Gen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur
45 enthalten ist.

- Die Genexpression des CAPN6-Gens läßt sich darüber hinaus auch durch Erhöhen der CAPN6-Genkopienzahl erhöhen. Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das CAPN6-Gen beispielsweise in einem CHO-Expressionsvektor amplifiziert. Als Vektoren eignen sich auch
- 5 Vektoren der pED-Reihe - dicistronische Vektoren -, die auch das amplifizierbare Markergen Dihydrofolat Reduktase enthalten. Details können den Current Protocols in Molecular Biology Vol 2, 1994 entnommen werden.
- 10 Eine Steigerung der CAPN6-Enzymaktivität läßt sich zum Beispiel gegenüber dem Ausgangsenzym durch Veränderung des CAPN6-Gens oder seiner tierischen Homologen durch klassische Mutagenese wie UV- Bestrahlung oder Behandlung mit chemischen Mutagenen und/oder durch gezielte Mutagenese wie site directed mutagenesis,
- 15 Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) erzielen. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem das katalytische Zentrum so verändert wird, daß das zu spaltende Substrat rascher umgesetzt wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität neben der beschriebenen Genamplifikation
- 20 durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren und/oder durch Synthese aktiver statt inaktiver CAPN6-Proteine erreicht werden. Auf diesem Weg können erhöhte Enzymmengen für die in vitro-Tests zur Verfügung gestellt werden.
- 25 CAPN6 oder seine tierischen Homologen oder sein humanes Homolog lassen sich vorteilhafterweise ausgehend von genomischer DNA oder cDNA unter Verwendung beispielsweise der PCR-Technik (siehe Molekular Cloning, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Second Edition 1989, Kapitel 14, 1 - 35,
- 30 ISBN 0-87969-309-6 und Saiki et al., Science, 1988, Vol. 239, 487ff) klonieren, bevorzugt läßt sich CAPN6 unter Verwendung von genomischer DNA und besonders bevorzugt unter Verwendung von genomischer DNA aus Mauszellen oder humanen Zellen klonieren.
- 35 Als Wirtsorganismus für die Klonierung eignen sich beispielsweise alle Escherichia coli-Stämme, bevorzugt der Escherichia coli Stamm DH10B. Als Vektoren für die Klonierung sind alle Vektoren geeignet, die für die Expression in Escherichia coli geeignet sind (siehe Molecular Cloning, Sambrook, Fritsch and Maniatis,
- 40 Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Second Edition 1989, ISBN 0-87969-309-6). Besonders geeignet sind beispielsweise Vektoren, die sich von pBR oder pUC ableiten oder shuttle-Vektoren, ganz besonders geeignet ist pBluescript.
- 45 Nach Isolierung und Sequenzierung sind CAPN6-Gene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in SEQ ID NO: 2 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvarianten kodieren. Unter Al-

Allelvarianten sind CAPN6-Varianten zu verstehen, die 60 bis 100 % Homologie auf Aminosäureebene, bevorzugt 70 bis 100 %, ganz besonders bevorzugt 80 bis 100 % aufweisen. Allelvarianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus der in SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 3 dargestellten Sequenz erhältlich sind, wobei die CAPN6-Aktivität aber erhalten bleibt und die Sequenzen (a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala, (b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala, (c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr und (d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly wie auch in den CAPN6-Genen, Analogen oder Derivaten vorhanden sind.

Unter Analoge von CAPN6 sind beispielsweise seine tierischen Homologen, verkürzte Sequenzen, Einzelstrang-DNA oder RNA der codierenden und nichtcodierenden DNA-Sequenz besonders antisense RNA zu verstehen.

Derivate von CAPN6 sind beispielsweise solche Derivate, die enzymatisch nicht oder nur schwer spaltbar sind wie die Nucleinsäurephosphonate oder -phosphothioate, bei denen die Phosphatgruppe der Nucleinsäuren gegen eine Phosphonat- bzw Thioatgruppe ersetzt wurde.

Auch der Promotor, der der angegebenen Nukleotidsequenz vorgeschaltet ist, kann durch ein oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) verändert sein, ohne daß aber die Funktionalität bzw. Wirksamkeit des Promotors beeinträchtigt ist. Des weiteren kann der Promotor auch durch Veränderung seiner Sequenz in seiner Wirksamkeit erhöht oder komplett durch wirksamere Promotoren auch artfremder Organismen oder synthetischen Ursprungs ausgetauscht werden.

Die nach den erfindungsgemäßen Verfahren identifizierten Calpaininhibitoren eignen sich zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei Calpainfehlfunktionen beispielsweise bei Krankheiten ausgewählt aus der Gruppe der kardiovaskulären, immunologischen, entzündlichen, allergischen, neurologischen, neurodegenerativen, oder onkologischen Erkrankungen wie beispielsweise Restenose, Arthritis, Ischämien des Herzen, der Niere oder des Zentralnervensystems (z.B. Hirnschlag), Entzündungen, Muskeldystrophien, Katarakten der Augen (Grauer Star), Verletzungen des Zentralnervensystems (z.B. Trauma), Alzheimer Krankheit, HIV-induzierte Neuropathy, Parkinsonsche- und Huntingtonsche Krankheit bevorzugt zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten der Plazenta wie z.B. Gestose oder der Embryogenese.

Die erfindungsgemäßen CAPN6-Gensequenzen eignen sich vorteilhafterweise auch zur Diagnose von Krankheiten oder zur Gentherapie.

5 Beispiele

Beispiel 1: Klonierung des CAPN6-Gens

Die Maus CAPN6 Sequenz (EMBL accession number Y12583) wurde mit
10 der RACE Methode unter Verwendung von Tag 17 Mäuseembryonen und
Primersequenzen, die von der Sequenz EST AA050030 abgeleitet
wurden, kloniert. Ein Plasmidklon, der die entsprechenden EST-
Sequenzen enthielt wurde vom I.M.A.G.E consortium (Research
Genetics Inc.) erhalten. Das humane CAPN6-Homologe wurde über
15 eine Homologierecherche in der EST-Datenbank unter Verwendung der
Mausproteinsequenz und des tblastn-Algorithmus erhalten. Die ge-
fundenen Teilsequenzen konnten zu einer unvollständigen Sequenz
des humanen CAPN6 mit einer Länge von 1083 Nukleotiden zusammen-
gefügt werden (SEQ ID NO: 3).

20

Beispiel 2: Expression des CAPN6-Gens in verschiedenen Geweben

Die Expression des CAPN6-Gens in den verschiedenen Geweben wurden
mit Hilfe eines ³²P-markierten humane cDNA-Fragments mit einem
25 humanen RNA Master Blot der Firma Clontech, welcher RNA 50 ver-
schiedener Gewebe enthält, ermittelt. Die Hybridisierung und die
hochstringenten Waschbedingungen wurden entsprechend den Vor-
schriften des Herstellers durchgeführt. Als CAPN6 cDNA-Fragment
wurde eine 2,2 kb EcoRI/XhoI-Fragment, das das EST AA050030
30 beinhaltet für die Expressionsexperimente verwendet. CAPN6 wurde
nur in Gewebe aus der Placenta exprimiert (siehe Figur 4). Als
Kontrolle wurde der Blot mit einer humanen Ubiquitin DNA Probe,
um die RNA Beladung zu ermitteln, durchgeführt.

35 3. Beispiel: Lokalisierung des CAPN6 Gens auf dem Chromosom

Die Lokalisierung des Gens im Mensch erfolgte mit Hilfe des NIGMS
Mensch/Nager somatischen Zellhybrid "mapping panel" (Coriell Cell
Repositories). Als Primer-Sequenzen für die PCR-Reaktion wurden
40 folgende Primer verwendet : 5'-ggtgaaactgattggggtctg-3' und
5'-ctgtcttcccaaggggtttctc-3'. Die PCR-Amplifikation wurde mit
einer "Annealing"-Temperatur von 58 °C durchgeführt und führte zu
einem 200 bp Fragment. Die Ergebnisse wurden auf Übereinstimmung
zwischen der Anwesenheit von menschlichen Chromosomen und dem
45 PCR-Produkt untersucht. Die genaue Lokalisierung des Gens im
menschlichen Chromosom erfolgte mit Hilfe des "Stanford G3 RH
Panel" (Research Genetics) und Übermittlung der PCR-Ergebnisse

an den Lokalisierungsservice des Stanford Human Genome Center (<http://www-shgc.stanford.edu>). Das Mensch CAPN6-Gen wurde auf dem X-Chromosom gekoppelt mit dem Marker DXS7356 gefunden.

5 4. Beispiel: Cathepsin B-Test

Die Cathepsin B-Hemmung wurde analog einer Methode von S. Hasnain et al., J. Biol. Chem. 1993, 268, 235-40 bestimmt.

- 10 Zu 88µL Cathepsin B (Cathepsin B aus menschlicher Leber (Calbiochem), verdünnt auf 5 Units in 500 µM Puffer) werden 2 µL einer Inhibitor-Lösung, hergestellt aus Inhibitor und DMSO (Endkonzentrationen: 100 µM bis 0,01 µM). Dieser Ansatz wird für 60 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) vorinkubiert und anschließend
- 15 die Reaktion durch Zugabe von 10 µL 10mM Z-Arg-Arg-pNA (in Puffer mit 10 % DMSO) gestartet. Die Reaktion wird 30 Minuten bei 405 nm im Mikrotiterplattenreader verfolgt. Aus den maximalen Steigungen werden anschließend die IC₅₀ bestimmt.

20 5. Beispiel: Calpain-Test

- Die Aktivität der Calpain Inhibitoren wurde in einem colorimetrischen Test mit Casein nach Hammarsten (Merck, Darmstadt) als Substrat untersucht. Der Test wurde in der Mikrotiterplatte,
- 25 entsprechend der Veröffentlichung von Buroker-Kilgore und Wang in Anal. Biochemistry 208, 387-392 (1993), durchgeführt. Als Enzym wurde CAPN6, welches in einem der oben beschriebenen Systemen exprimiert und anschließend gereinigt wurde, verwendet. Die Substanzen wurden mit dem Enzym für 60 Minuten bei Raumtemperatur
- 30 inkubiert, wobei eine Konzentration von 1% des Lösungsmittels DMSO nicht überschritten wurde. Nach Zugabe des Bio-Rad Farb-reagenz erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 nm in dem Easy Reader EAR 400 der Firma SLT. Die 50%ige Aktivität des Enzyms ergibt sich aus den optischen Dichten, die bei der maxi-
- 35 malen Aktivität des Enzyms ohne Inhibitoren und der Aktivität des Enzyms ohne Zugabe von Kalzium bestimmt wurden.

6. Beispiel: Plättchen-Test zur Bestimmung der zellulären Aktivität von Calpain-Inhibitoren

40

- Der Calpain-vermittelte Abbau von Proteinen in Plättchen wurde, wie von ZhaozhaoLi et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 3472-3480 beschrieben, durchgeführt. Humane Plättchen wurden aus frischem Natrium-Citrat-Blut von Spendern isoliert und in Puffer (5 mM
- 45 Hepes, 140 mM NaCl und 1 mg/ml BSA, pH 7,3) auf 10⁷ Zellen/ml eingestellt.

Plättchen (0,1ml) werden für 5 Minuten mit 1 μ l an verschiedenen Konzentrationen an Inhibitoren (gelöst in DMSO) vorinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Kalziumionophor A 23187 (1 μ M im Test) und Kalzium (5 mM im Test) und eine weitere Inkubation von 5 5 Minuten bei 37°C. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Plättchen in SDS-Page Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C gekocht und die Proteine in einem 8% igen Gel aufgetrennt. Der Abbau der beiden Proteine Actin bindendes Protein (ABP) und Talin wurde durch quantitative Densitometrie verfolgt, da nach der 10 Zugabe von Kalzium und Ionophor diese Proteine verschwanden und eine neue Bande im Bereich von 200 Kd Molekulargewicht entstand. Daraus wird die halb maximale Enzymaktivität bestimmt.

15

20

25

30

35

40

45

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANMELDER:
 - (A) NAME: BASF Aktiengesellschaft
 - (B) STRASSE: Carl Bosch Strasse
 - (C) ORT: Ludwigshafen
 - (D) BUNDESLAND: Rheinland-Pfalz
 - (E) LAND: Germany
 - (F) POSTLEITZAHL: D-67056
- (ii) ANMELDETITEL: Neue gewebsspezifische Calpaine, ihre Herstellung und Verwendung
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4
- (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:
 - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
 - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 2069 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:
 - (A) ORGANISMUS: Mus musculus
- (vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:
 - (B) CLON: CAPN6
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: 5'UTR
 - (B) LAGE: 1..129
- (ix) MERKMALE:
 - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
 - (B) LAGE: 130..2055

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: 3'UTR

(B) LAGE: 2056..2069

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GGGGTTACCT GGCTAAGAGC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGT AGCAGCAGCA	60
GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC AGCAGCAGCA GCAGGGTTCC TGAGCTAACT CAGACCTAGT	120
TTGATAGCA ATG GGT CCT CCT CTG AAG CTC TTC AAA AAC CAG AAG TAC	168
Met Gly Pro Pro Leu Lys Leu Phe Lys Asn Gln Lys Tyr	
1 5 10	
CAA GAA CTG AAG CAG GAG TGC ATG AAG GAT GGC CGC CTT TTC TGT GAC	216
Gln Glu Leu Lys Gln Glu Cys Met Lys Asp Gly Arg Leu Phe Cys Asp	
15 20 25	
CCA ACC TTC CTA CCG GAG AAT GAT TCT CTG TTT TTC AAC CGG CTG CTT	264
Pro Thr Phe Leu Pro Glu Asn Asp Ser Leu Phe Phe Asn Arg Leu Leu	
30 35 40 45	
CCT GGG AAG GTG GTG TGG AAG CGT CCA CAG GAC ATT TCT GAT GAC CCC	312
Pro Gly Lys Val Val Trp Lys Arg Pro Gln Asp Ile Ser Asp Asp Pro	
50 55 60	
CAC CTG ATT GTG GGC AAC ATC AGC AAC CAC CAG CTG ATC CAG GGC AGA	360
His Leu Ile Val Gly Asn Ile Ser Asn His Gln Leu Ile Gln Gly Arg	
65 70 75	
TTG GGG AAC AAG GCA ATG ATC TCT GCA TTT TCC TGT TTG GCT GTT CAG	408
Leu Gly Asn Lys Ala Met Ile Ser Ala Phe Ser Cys Leu Ala Val Gln	
80 85 90	
GAG TCA CAC TGG ACA AAG GCA ATT CCC AAC CAC AAG GAT CAG GAA TGG	456
Glu Ser His Trp Thr Lys Ala Ile Pro Asn His Lys Asp Gln Glu Trp	
95 100 105	
GAT CCT CGA AAG CCA GAG AAA TAC GCT GGA ATC TTT CAC TTC CGC TTC	504
Asp Pro Arg Lys Pro Glu Lys Tyr Ala Gly Ile Phe His Phe Arg Phe	
110 115 120 125	
TGG CAT TTT GGA GAA TGG ACC GAG GTG GTG ATT GAT GAC TTG CTT CCC	552
Trp His Phe Gly Glu Trp Thr Glu Val Val Ile Asp Asp Leu Leu Pro	
130 135 140	
ACC ATC AAC GGA GAT CTG GTC TTC TCA TTC TCC ACC TCC ATG AAT GAG	600
Thr Ile Asn Gly Asp Leu Val Phe Ser Phe Ser Thr Ser Met Asn Glu	
145 150 155	
TTT TGG AAT GCT CTA CTG GAA AAA GCG TAT GCA AAG CTG CTG GGC TGT	648
Phe Trp Asn Ala Leu Leu Glu Lys Ala Tyr Ala Lys Leu Leu Gly Cys	
160 165 170	

TAT	GAG	GCT	TTG	GAT	GGT	CTG	ACC	ATC	ACT	GAT	ATC	ATC	ATG	GAC	TTC	696
Tyr	Glu	Ala	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Thr	Asp	Ile	Ile	Met	Asp	Phe	
	175					180					185					
ACT	GGC	ACA	CTG	GCT	GAA	ATC	ATT	GAC	ATG	CAG	AAA	GGA	CGA	TAC	ACT	744
Thr	Gly	Thr	Leu	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Met	Gln	Lys	Gly	Arg	Tyr	Thr	
190					195				200					205		
GAT	CTT	GTT	GAG	GAG	AAG	TAC	AAG	CTG	TTT	GGA	GAA	CTG	TAC	AAA	ACG	792
Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Lys	Tyr	Lys	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Tyr	Lys	Thr	
			210					215					220			
TTC	ACC	AAA	GGA	GGT	CTA	ATT	TGC	TGC	TCC	ATT	GAG	TCT	CCC	AGC	CAG	840
Phe	Thr	Lys	Gly	Gly	Leu	Ile	Cys	Cys	Ser	Ile	Glu	Ser	Pro	Ser	Gln	
		225					230						235			
GAG	GAA	CAA	GAA	GTT	GAA	ACA	GAC	TGG	GGA	CTA	CTG	AAG	GGT	TAT	ACC	888
Glu	Glu	Gln	Glu	Val	Glu	Thr	Asp	Trp	Gly	Leu	Leu	Lys	Gly	Tyr	Thr	
	240					245						250				
TAC	ACC	ATG	ACT	GAT	ATT	CGC	AAG	CTC	CGT	CTC	GGA	GAA	AGA	CTT	GTG	936
Tyr	Thr	Met	Thr	Asp	Ile	Arg	Lys	Leu	Arg	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Val	
	255					260					265					
GAA	GTC	TTC	AGT	ACT	GAG	AAG	CTG	TAT	ATG	GTT	CGC	CTA	AGG	AAC	CCA	984
Glu	Val	Phe	Ser	Thr	Glu	Lys	Leu	Tyr	Met	Val	Arg	Leu	Arg	Asn	Pro	
270					275				280					285		
TTG	GGA	AGA	CAG	GAA	TGG	AGT	GGC	CCC	TGG	AGT	GAA	ATT	TCA	GAG	GAG	1032
Leu	Gly	Arg	Gln	Glu	Trp	Ser	Gly	Pro	Trp	Ser	Glu	Ile	Ser	Glu	Glu	
			290						295					300		
TGG	CAG	CAA	CTG	ACT	GTA	ACA	GAT	CGC	AAG	AAC	CTA	GGA	CTT	GTT	ATG	1080
Trp	Gln	Gln	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Arg	Lys	Asn	Leu	Gly	Leu	Val	Met	
		305						310					315			
TCT	GAT	GAT	GGA	GAA	TTT	TGG	ATG	AGT	CTG	GAA	GAT	TTT	TGC	CAC	AAC	1128
Ser	Asp	Asp	Gly	Glu	Phe	Trp	Met	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Cys	His	Asn	
	320						325					330				
TTT	CAC	AAA	CTG	AAT	GTC	TGC	CGC	AAT	GTG	AAT	AAT	CCT	GTT	TTT	GGC	1176
Phe	His	Lys	Leu	Asn	Val	Cys	Arg	Asn	Val	Asn	Asn	Pro	Val	Phe	Gly	
	335					340					345					
CGC	AAG	GAG	CTG	GAA	TCA	GTG	GTG	GGA	TGT	TGG	ACT	GTG	GAT	GAT	GAC	1224
Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Gly	Cys	Trp	Thr	Val	Asp	Asp	Asp	
350					355				360					365		
CCT	CTG	ATG	AAC	CGA	TCA	GGA	GGT	TGC	TAT	AAC	AAC	CGT	GAT	ACC	TTC	1272
Pro	Leu	Met	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Cys	Tyr	Asn	Asn	Arg	Asp	Thr	Phe	
			370						375					380		

TTG CAG AAT CCT CAG TAC ATT TTC ACT GTG CCC GAG GAT GGC CAT AAA	1320
Leu Gln Asn Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys	
385 390 395	
GTC ATC ATG TCA CTG CAA CAG AAG GAC CTA CGC ACT TAC CGC CGA ATG	1368
Val Ile Met Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met	
400 405 410	
GGA AGA CCT GAT AAT TAC ATC ATT GGT TTT GAG CTC TTC AAG GTG GAG	1416
Gly Arg Pro Asp Asn Tyr Ile Ile Gly Phe Glu Leu Phe Lys Val Glu	
415 420 425	
ATG AAC CGA AGG TTC CGT CTT CAC CAT CTG TAT ATT CAG GAG CGT GCT	1464
Met Asn Arg Arg Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala	
430 435 440 445	
GGG ACT TCC ACT TAT ATC GAC ACC CGT ACT GTG TTT CTG AGC AAG TAT	1512
Gly Thr Ser Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr	
450 455 460	
CTG AAG AAG GGC AGC TAC GTG CTT GTT CCA ACC ATG TTC CAA CAT GGC	1560
Leu Lys Lys Gly Ser Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly	
465 470 475	
CGT ACC AGT GAA TTT CTG CTG AGG ATC TTC TCT GAA GTG CCC GTC CAG	1608
Arg Thr Ser Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln	
480 485 490	
CTC AGG GAA CTG ACC TTG GAC ATG CCC AAG ATG TCT TGC TGG AAC CTG	1656
Leu Arg Glu Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu	
495 500 505	
GCA CGT GGC TAC CCA AAG GTG GTT ACC CAG ATC ACT GTC CAC AGT GCT	1704
Ala Arg Gly Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala	
510 515 520 525	
GAG GGC CTG GAG AAG AAG TAT GCC AAT GAA ACT GTC AAT CCA TAT CTG	1752
Glu Gly Leu Glu Lys Lys Tyr Ala Asn Glu Thr Val Asn Pro Tyr Leu	
530 535 540	
ATC ATC AAA TGT GGA AAG GAG GAA GTC CGT TCC CCT GTC CAG AAG AAT	1800
Ile Ile Lys Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn	
545 550 555	
ACT GTG CAT GCC ATT TTT GAC ACG CAG GCC GTT TTC TAC AGA AGG ACC	1848
Thr Val His Ala Ile Phe Asp Thr Gln Ala Val Phe Tyr Arg Arg Thr	
560 565 570	
ACT GAC ATT CCT ATT ATC ATC CAG GTG TGG AAC AGC AGA AAA TTC TGT	1896
Thr Asp Ile Pro Ile Ile Ile Gln Val Trp Asn Ser Arg Lys Phe Cys	
575 580 585	

GAT CAG TTC CTG GGG CAG GTT ACT CTC GAT GCT GAC CCC AGC GAC TGC	1944
Asp Gln Phe Leu Gly Gln Val Thr Leu Asp Ala Asp Pro Ser Asp Cys	
590	595 600 605
CGT GAT CTG AAA TCT CTG TAC CTG CGT AAG AAG GGT GGT CCT ACT GCC	1992
Arg Asp Leu Lys Ser Leu Tyr Leu Arg Lys Lys Gly Gly Pro Thr Ala	
610	615 620
AAA GTC AAG CAA GGT CAC ATC AGC TTC AAA GTT ATC TCT AGC GAT GAT	2040
Lys Val Lys Gln Gly His Ile Ser Phe Lys Val Ile Ser Ser Asp Asp	
625	630 635
CTC ACT GAG CTC TAAGTAGTCA TCATCAG	2069
Leu Thr Glu Leu	
640	

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 641 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Pro Pro Leu Lys Leu Phe Lys Asn Gln Lys Tyr Gln Glu Leu	1 5 10 15
Lys Gln Glu Cys Met Lys Asp Gly Arg Leu Phe Cys Asp Pro Thr Phe	20 25 30
Leu Pro Glu Asn Asp Ser Leu Phe Phe Asn Arg Leu Leu Pro Gly Lys	35 40 45
Val Val Trp Lys Arg Pro Gln Asp Ile Ser Asp Asp Pro His Leu Ile	50 55 60
Val Gly Asn Ile Ser Asn His Gln Leu Ile Gln Gly Arg Leu Gly Asn	65 70 75 80
Lys Ala Met Ile Ser Ala Phe Ser Cys Leu Ala Val Gln Glu Ser His	85 90 95
Trp Thr Lys Ala Ile Pro Asn His Lys Asp Gln Glu Trp Asp Pro Arg	100 105 110
Lys Pro Glu Lys Tyr Ala Gly Ile Phe His Phe Arg Phe Trp His Phe	115 120 125
Gly Glu Trp Thr Glu Val Val Ile Asp Asp Leu Leu Pro Thr Ile Asn	130 135 140

Gly	Asp	Leu	Val	Phe	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Met	Asn	Glu	Phe	Trp	Asn
145					150					155					160
Ala	Leu	Leu	Glu	Lys	Ala	Tyr	Ala	Lys	Leu	Leu	Gly	Cys	Tyr	Glu	Ala
				165					170					175	
Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Ile	Thr	Asp	Ile	Ile	Met	Asp	Phe	Thr	Gly	Thr
			180					185					190		
Leu	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Met	Gln	Lys	Gly	Arg	Tyr	Thr	Asp	Leu	Val
		195					200					205			
Glu	Glu	Lys	Tyr	Lys	Leu	Phe	Gly	Glu	Leu	Tyr	Lys	Thr	Phe	Thr	Lys
	210					215					220				
Gly	Gly	Leu	Ile	Cys	Cys	Ser	Ile	Glu	Ser	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Gln
225					230					235					240
Glu	Val	Glu	Thr	Asp	Trp	Gly	Leu	Leu	Lys	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Thr	Met
				245					250					255	
Thr	Asp	Ile	Arg	Lys	Leu	Arg	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Val	Glu	Val	Phe
			260					265					270		
Ser	Thr	Glu	Lys	Leu	Tyr	Met	Val	Arg	Leu	Arg	Asn	Pro	Leu	Gly	Arg
		275					280					285			
Gln	Glu	Trp	Ser	Gly	Pro	Trp	Ser	Glu	Ile	Ser	Glu	Glu	Trp	Gln	Gln
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Arg	Lys	Asn	Leu	Gly	Leu	Val	Met	Ser	Asp	Asp
305					310					315					320
Gly	Glu	Phe	Trp	Met	Ser	Leu	Glu	Asp	Phe	Cys	His	Asn	Phe	His	Lys
				325					330					335	
Leu	Asn	Val	Cys	Arg	Asn	Val	Asn	Asn	Pro	Val	Phe	Gly	Arg	Lys	Glu
			340					345					350		
Leu	Glu	Ser	Val	Val	Gly	Cys	Trp	Thr	Val	Asp	Asp	Asp	Pro	Leu	Met
		355					360					365			
Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Cys	Tyr	Asn	Asn	Arg	Asp	Thr	Phe	Leu	Gln	Asn
	370					375					380				
Pro	Gln	Tyr	Ile	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Lys	Val	Ile	Met
385					390					395					400
Ser	Leu	Gln	Gln	Lys	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Arg	Arg	Met	Gly	Arg	Pro
				405					410					415	
Asp	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Phe	Lys	Val	Glu	Met	Asn	Arg
			420					425					430		

Arg Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala Gly Thr Ser
 435 440 445
 Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr Leu Lys Lys
 450 455 460
 Gly Ser Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly Arg Thr Ser
 465 470 475 480
 Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln Leu Arg Glu
 485 490 495
 Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu Ala Arg Gly
 500 505 510
 Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala Glu Gly Leu
 515 520 525
 Glu Lys Lys Tyr Ala Asn Glu Thr Val Asn Pro Tyr Leu Ile Ile Lys
 530 535 540
 Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn Thr Val His
 545 550 555 560
 Ala Ile Phe Asp Thr Gln Ala Val Phe Tyr Arg Arg Thr Thr Asp Ile
 565 570 575
 Pro Ile Ile Ile Gln Val Trp Asn Ser Arg Lys Phe Cys Asp Gln Phe
 580 585 590
 Leu Gly Gln Val Thr Leu Asp Ala Asp Pro Ser Asp Cys Arg Asp Leu
 595 600 605
 Lys Ser Leu Tyr Leu Arg Lys Lys Gly Gly Pro Thr Ala Lys Val Lys
 610 615 620
 Gln Gly His Ile Ser Phe Lys Val Ile Ser Ser Asp Asp Leu Thr Glu
 625 630 635 640
 Leu

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1125 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(vii) UNMITTELBARE HERKUNFT:

(B) CLON: CAPN6

(ix) MERKMALE:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS

(B) LAGE: 2..1125

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

G CTT GTT GAG GAG AAG TAC AAG CTA TTC GGA GAA CTG TAC AAA ACA	46
Leu Val Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr	
1 5 10 15	
TTT ACC AAA GGT GGT CTG ATC TGC TGT TCC ATT GAG TCT CCC AAT CAG	94
Phe Thr Lys Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Asn Gln	
20 25 30	
GAG GAG CAA GAA GTT GAA ACT GAT TGG GGT CTG CTG AAG GGC CAT ACC	142
Glu Glu Gln Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly His Thr	
35 40 45	
TAT ACC ATG ACT GAT ATT CGC AAA ATT CGT CTT GGA GAG AGA CTT GTG	190
Tyr Thr Met Thr Asp Ile Arg Lys Ile Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val	
50 55 60	
GAA GTC TTC AGT GCT GAG AAG CTG TAT ATG GTT CGC CTG AGA AAC CCC	238
Glu Val Phe Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro	
65 70 75	
TTG GGA AGA CAG GAA TGG AGT GGC CCC TGG AGT GAA ATT TCT GAA GAG	286
Leu Gly Arg Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu	
80 85 90 95	
TGG CAG CAA CTG ACT GCA TCA GAT CGC AAG AAC CTG GGG CTT GTT ATG	334
Trp Gln Gln Leu Thr Ala Ser Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met	
100 105 110	
TCT GAT GAT GGA GAG TTT TGG ATG AGC TTG GAG GAC TTT TGC CGC AAC	382
Ser Asp Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys Arg Asn	
115 120 125	
TTT CAC AAA CTG AAT GTC TGC CGC AAT GTG AAC AAC CCT ATT TTT GGC	430
Phe His Lys Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Ile Phe Gly	
130 135 140	
CGA AAG GAG CTG GAA TCG GTG TTG GGA TGC TGG ACT GTG GAT GAT GAT	478
Arg Lys Glu Leu Glu Ser Val Leu Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp	
145 150 155	

CCC	CTG	ATG	AAC	CGC	TCA	GGA	GGC	TGC	TAT	AAC	AAC	CGT	GAT	ACC	TTC	526
Pro	Leu	Met	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Cys	Tyr	Asn	Asn	Arg	Asp	Thr	Phe	
160					165					170					175	
CTG	CAG	AAT	CCC	CAG	TAC	ATC	TTC	ACT	GTG	CCT	GAG	GAT	GGG	CAC	AAG	574
Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Tyr	Ile	Phe	Thr	Val	Pro	Glu	Asp	Gly	His	Lys	
				180						185					190	
GTC	ATT	ATG	TCA	CTG	CAG	CAG	AAG	GAC	CTG	CGC	ACT	TAC	CGC	CGA	ATG	622
Val	Ile	Met	Ser	Leu	Gln	Gln	Lys	Asp	Leu	Arg	Thr	Tyr	Arg	Arg	Met	
			195					200					205			
GGA	AGA	CCT	GAC	AAT	TAC	ATC	ATT	GGC	TTT	GAG	CTC	TTC	AAG	GTG	GAG	670
Gly	Arg	Pro	Asp	Asn	Tyr	Ile	Ile	Gly	Phe	Glu	Leu	Phe	Lys	Val	Glu	
		210						215					220			
ATG	AAC	CGC	AAA	TTC	CGC	CTC	CAC	CAC	CTC	TAC	ATC	CAG	GAG	CGT	GCT	718
Met	Asn	Arg	Lys	Phe	Arg	Leu	His	His	Leu	Tyr	Ile	Gln	Glu	Arg	Ala	
	225					230						235				
GGG	ACT	TCC	ACC	TAT	ATT	GAC	ACC	CGC	ACA	GTG	TTT	CTG	AGC	AAG	TAC	766
Gly	Thr	Ser	Thr	Tyr	Ile	Asp	Thr	Arg	Thr	Val	Phe	Leu	Ser	Lys	Tyr	
240					245					250					255	
CTG	AAG	AAG	GGC	AAC	TAT	GTG	CTT	GTC	CCA	ACC	ATG	TTC	CAG	CAT	GGT	814
Leu	Lys	Lys	Gly	Asn	Tyr	Val	Leu	Val	Pro	Thr	Met	Phe	Gln	His	Gly	
				260					265						270	
CGC	ACC	AGC	GAG	TTT	CTC	CTG	AGA	ATC	TTC	TCT	GAA	GTG	CCT	GTC	CAG	862
Arg	Thr	Ser	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ile	Phe	Ser	Glu	Val	Pro	Val	Gln	
			275					280						285		
CTC	AGG	GAA	CTG	ACT	CTG	GAC	ATG	CCC	AAA	ATG	TCC	TGC	TGG	AAC	CTG	910
Leu	Arg	Glu	Leu	Thr	Leu	Asp	Met	Pro	Lys	Met	Ser	Cys	Trp	Asn	Leu	
		290					295						300			
GCT	CGT	GGC	TAC	CCG	AAA	GTA	GTT	ACT	CAG	ATC	ACT	GTT	CAC	AGT	GCT	958
Ala	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Val	Val	Thr	Gln	Ile	Thr	Val	His	Ser	Ala	
	305					310					315					
GAG	GAC	CTG	GAG	AGG	AGG	TAT	GCC	AAT	GGA	ACT	GTA	AAC	CCA	TAT	TTG	1006
Glu	Asp	Leu	Glu	Arg	Arg	Tyr	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Asn	Pro	Tyr	Leu	
320					325					330					335	
GTC	ATC	AAA	TGT	GGA	AAG	GAG	GAA	GTC	CGT	TCT	CCT	GTC	CAG	AAA	AAT	1054
Val	Ile	Lys	Cys	Gly	Lys	Glu	Glu	Val	Arg	Ser	Pro	Val	Gln	Lys	Asn	
				340					345					350		
ACA	GTT	CAT	GCC	ATT	TTT	GAC	ACC	CAT	GCC	ATT	TTC	TAC	AGA	AGG	ACC	1102
Thr	Val	His	Ala	Ile	Phe	Asp	Thr	His	Ala	Ile	Phe	Tyr	Arg	Arg	Thr	
			355					360					365			

ACG GAC ATT CCT ATT ATA GTA CA
 Thr Asp Ile Pro Ile Ile Val
 370

1125

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 374 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Leu Val Glu Glu Lys Tyr Lys Leu Phe Gly Glu Leu Tyr Lys Thr Phe
 1 5 10 15
 Thr Lys Gly Gly Leu Ile Cys Cys Ser Ile Glu Ser Pro Asn Gln Glu
 20 25 30
 Glu Gln Glu Val Glu Thr Asp Trp Gly Leu Leu Lys Gly His Thr Tyr
 35 40 45
 Thr Met Thr Asp Ile Arg Lys Ile Arg Leu Gly Glu Arg Leu Val Glu
 50 55 60
 Val Phe Ser Ala Glu Lys Leu Tyr Met Val Arg Leu Arg Asn Pro Leu
 65 70 75 80
 Gly Arg Gln Glu Trp Ser Gly Pro Trp Ser Glu Ile Ser Glu Glu Trp
 85 90 95
 Gln Gln Leu Thr Ala Ser Asp Arg Lys Asn Leu Gly Leu Val Met Ser
 100 105 110
 Asp Asp Gly Glu Phe Trp Met Ser Leu Glu Asp Phe Cys Arg Asn Phe
 115 120 125
 His Lys Leu Asn Val Cys Arg Asn Val Asn Asn Pro Ile Phe Gly Arg
 130 135 140
 Lys Glu Leu Glu Ser Val Leu Gly Cys Trp Thr Val Asp Asp Asp Pro
 145 150 155 160
 Leu Met Asn Arg Ser Gly Gly Cys Tyr Asn Asn Arg Asp Thr Phe Leu
 165 170 175
 Gln Asn Pro Gln Tyr Ile Phe Thr Val Pro Glu Asp Gly His Lys Val
 180 185 190
 Ile Met Ser Leu Gln Gln Lys Asp Leu Arg Thr Tyr Arg Arg Met Gly
 195 200 205

Arg Pro Asp Asn Tyr Ile Ile Gly Phe Glu Leu Phe Lys Val Glu Met
 210 215 220
 Asn Arg Lys Phe Arg Leu His His Leu Tyr Ile Gln Glu Arg Ala Gly
 225 230 235 240
 Thr Ser Thr Tyr Ile Asp Thr Arg Thr Val Phe Leu Ser Lys Tyr Leu
 245 250 255
 Lys Lys Gly Asn Tyr Val Leu Val Pro Thr Met Phe Gln His Gly Arg
 260 265 270
 Thr Ser Glu Phe Leu Leu Arg Ile Phe Ser Glu Val Pro Val Gln Leu
 275 280 285
 Arg Glu Leu Thr Leu Asp Met Pro Lys Met Ser Cys Trp Asn Leu Ala
 290 295 300
 Arg Gly Tyr Pro Lys Val Val Thr Gln Ile Thr Val His Ser Ala Glu
 305 310 315 320
 Asp Leu Glu Arg Arg Tyr Ala Asn Gly Thr Val Asn Pro Tyr Leu Val
 325 330 335
 Ile Lys Cys Gly Lys Glu Glu Val Arg Ser Pro Val Gln Lys Asn Thr
 340 345 350
 Val His Ala Ile Phe Asp Thr His Ala Ile Phe Tyr Arg Arg Thr Thr
 355 360 365
 Asp Ile Pro Ile Ile Val
 370

Patentansprüche

1. CAPN6-Calpaingen mit der Sequenz SEQ ID NO. 1 oder
5 SEQ ID NO. 3, seine allelischen Varianten, Analoge oder
Derivate, die auf der abgeleiteten Aminosäureebene eine Homologie von 60 bis 100 % aufweisen, wobei die Calpaingene, ihre allelischen Varianten, Analoge oder Derivate folgende Sequenzen enthalten:
- 10
- (a) Leu-Gly-Asn-Lys-Ala,
wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Cystein im humanen Calpain I, die die Position
15 115 im Calpain I besitzt, gegen Lysin, das an Position 81 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist;
- (b) Ala-X-Ser-Cys-Leu-Ala,
20 wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Alanin und Threonin in den Positionen 122 und 125 gegen Serin und Alanin in den Positionen 88 und 91 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind;
- 25
- (c) Gly-Tyr-Thr-(His oder Tyr)-Thr-X-Thr,
wobei gegenüber der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I die Aminosäuren Histidin, Alanin und Serin in den Positionen 272, 273 und 275 gegen Tyrosin, Threonin
30 und Threonin in den Positionen 252, 253 und 255 in den Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 verändert sind und in der SEQ ID No. 3 zusätzlich der Tyrosinrest in Position 274 im Calpain I gegen Histidin in Position 254 in der SEQ ID No. 3 verändert ist;
- 35
- (d) Arg-X-Arg-Asn-Pro-Leu-Gly
wobei sich diese Sequenz von der entsprechenden Sequenz im humanen Calpain I dadurch unterscheidet, daß die Aminosäure Tryptophan im humanen Calpain I, die die
40 Position 298 im Calpain I besitzt, gegen Leucin, das an Position 286 der Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 liegt, verändert ist und
- X in den genannten Sequenzen eine beliebige natürliche
45 Aminosäure bedeutet.

Zeichn.

2. Genkonstrukt enthaltend ein CAPN6-Calpaingen, seine alleli-
schen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1, das funktio-
nell mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung
der Genexpression verknüpft ist.
5
3. Aminosäuresequenzen codiert durch CAPN6-Gene, allelischen
Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1.
4. Aminosäuresequenzen nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
10 daß es sich um enzymatisch aktive Proteine handelt.
5. Verfahren zur Identifizierung von Calpaininhibitoren, wobei
man ein Calpain, seine allelischen Varianten oder Analoge
codiert durch eine Sequenz gemäß Anspruch 1 aus Geweben
15 oder Zellen isoliert und die Inhibierung der Spaltung eines
Substrats des Enzyms CAPN6 und in mindestens einem weiteren
Test die Inhibierung der Spaltung eines Substrats der Enzyme
Calpain I und/oder II durch Testsubstanzen mißt und die Test-
substanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 und mindestens ein
20 weiteres der Calpaine hemmen.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man
die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 nicht
hemmen, jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II.
25
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man
die Testsubstanzen auswählt, die das Enzym CAPN6 hemmen,
nicht jedoch die Enzyme Calpain I und/oder II.
- 30 8. Verfahren nach den Ansprüchen 5 bis 7, dadurch gekenn-
zeichnet, daß man die Testsubstanzen auswählt, die in
zellulären Systemen die Zellmembran passieren.
9. Verfahren zur Herstellung des Enzyms CAPN6 sowie seiner alle-
35 lischen Varianten oder Analoge, dadurch gekennzeichnet, daß
man mindestens eine Kopie der Gensequenzen für CAPN6, seine
allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 in einen
Vektor kloniert und in einem dem Vektor entsprechenden Wirts-
organismus das Gen für das Enzym CAPN6, seine allelischen
40 Varianten oder Analoge exprimiert und anschließend das Enzym
aus dem Wirtsorganismus isoliert.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man
einen Vektor verwendet der in prokaryontischen oder eukaryon-
45 tischen Zellen die Expression der Gene, der allelischen
Varianten oder Analoge ermöglicht.

11. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Wirtsorganismus Bakterien, pilzliche oder tierische Zellen verwendet.
- 5 12. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als Vektor Baculoviren und als Wirtsorganismus Insektenzellen verwendet.
- 10 13. Verwendung eines Calpaininhibitors identifizierbar gemäß den Ansprüchen 5 bis 8 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei denen eine Calpainfehlfunktion vorliegt.
- 15 14. Verwendung eines Calpaininhibitors nach Anspruch 13 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten ausgewählt aus der Gruppe der kardiovaskulären, immunologischen, entzündlichen, allergischen, neurologischen, neurodegenerativen oder onkologischen Erkrankungen.
- 20 15. Verwendung einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 3 in Testsystemen.
16. Verwendung einer Aminosäuresequenz gemäß Anspruch 3 zur Herstellung von Antikörpern.
- 25 17. Verwendung einer Gensequenz, seiner allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 zur Herstellung von antisense mRNA.
- 30 18. Verwendung der antisense mRNA nach Anspruch 17 zur Herstellung von Medikamenten zur Behandlung von Krankheiten bei denen eine Calpainfehlfunktion vorliegt.
- 35 19. Verwendung eines Calpaingens sowie seiner allelischen Varianten oder Analoge gemäß Anspruch 1 zur Diagnose von Krankheiten oder in der Gentherapie.

40

45

Fig. 1

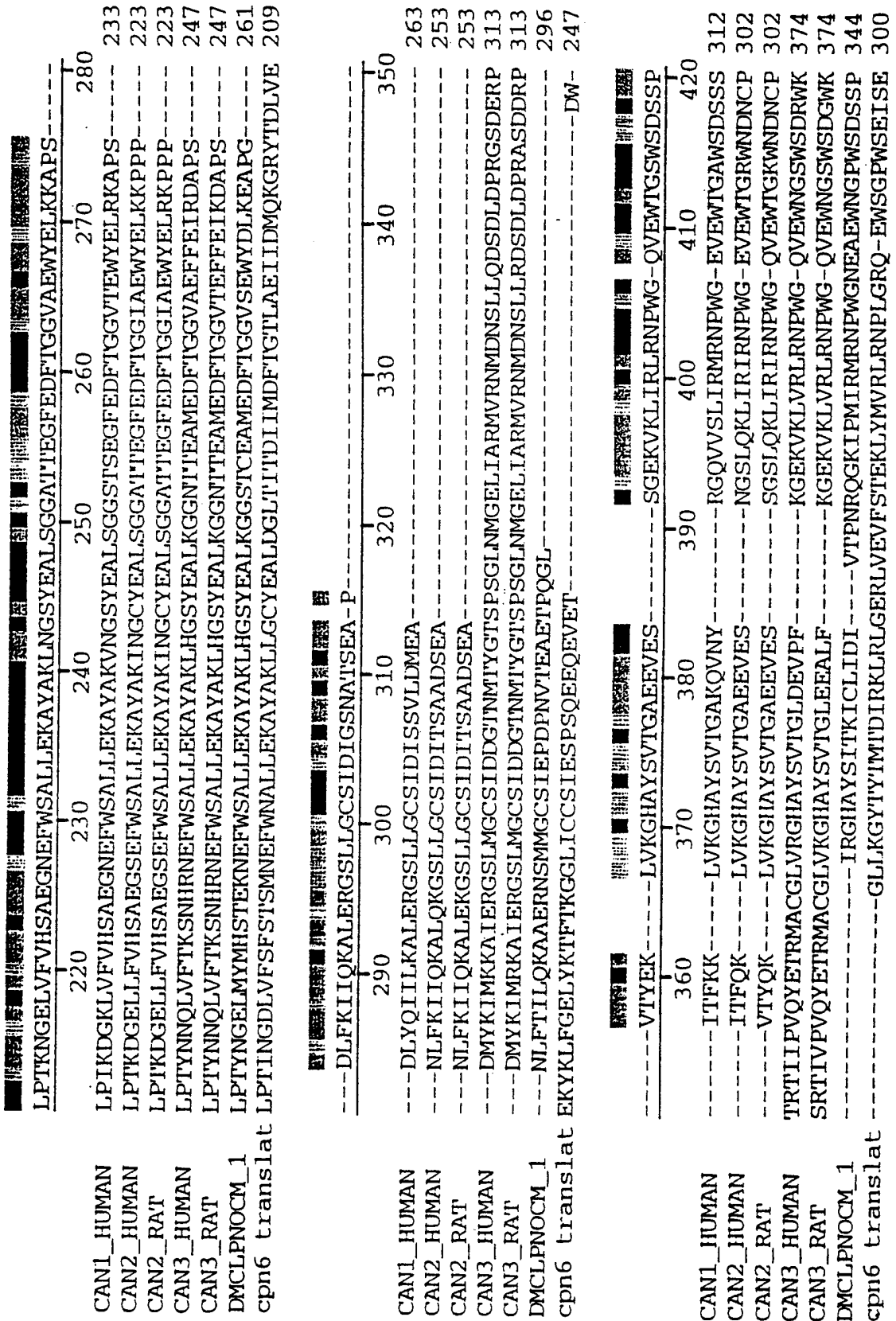


Fig. 1

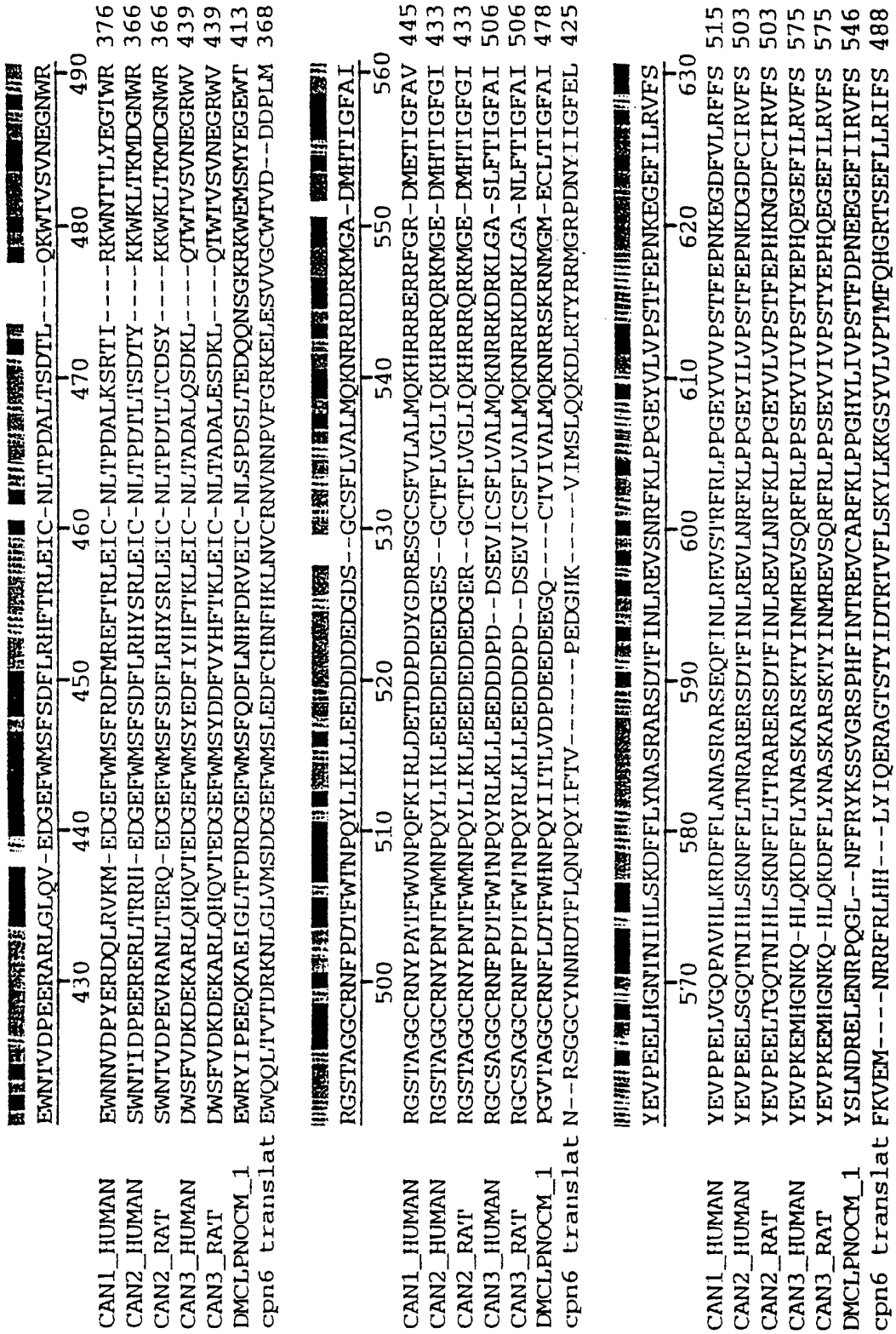


Fig. 1

```

#####
EKKALSEEVDITISANLP-----EKEL-VVEEIDEG--KT-----
640 650 660 670 680 690 700
CAN1_HUMAN EKSAG'IVELDDQIQANLP-----DEQVLSSEEIDEN----- 547
CAN2_HUMAN EKKADYQAVDDEIEANLE-----EFDI-SEDDIDDG----- 534
CAN2_RAT EKKADYQ'IVDDEIEANIE-----EIEA-NEEDIGDG----- 534
CAN3_HUMAN EKRNLSSEVENTISVDRPVKKKTKPIIFVSDRANSKNKELGVDQSESEEGKKTSPDKQKQSPQPQPGSSD 645
CAN3_RAT EKRNLSSEEAENTISVDRPVKKKKNKPIIFVSDRANSKNKELGVDQEAEEGDKTIGPDKQGESPPRPGHTD 645
DMCLPNOCM_1 E-----'YQNNMERTISRQ----- 558
cpn6 translat EVPVQLRELITLDMPE-----KMSCWNLARGYPKVVV'QITVHSAEGLKPKYANETVNP----- 540

```

```

#####
---FRNLFAQLAGEDMEISADELKT'ILNRVVAKHKDLK'IDGFSLESCRSVMALMD'IDGSGKLGLO
710 720 730 740 750 760 770
CAN1_HUMAN ---FKALFRQLAGELMEISVKELR'TILNR'ILSKIKDLR'IKGFSLESCRSVMNLM'DRDGNGKGLGV 608
CAN2_HUMAN ---VRRLFAQLAGEDAEISAFELQ'TILRRVLAKRQD'IKSDGFSIET'CKIMVMDLSDGSGKLGK 595
CAN2_RAT ---FRRLFAQLAGEDAEISAFELQ'TILRRVLAKRED'IKSDGFSIET'CKIMVMDLDEGSGKLGK 595
CAN3_HUMAN QESEEQQFRNIFKQ'LAGDDMEICADELKKVNL'IVNKKHDKLKT'HGFTLESCRSMI'ALMDT'DGSGKLNQ 715
CAN3_RAT QESEEQQFRNIFRQ'LAGDDMEICADELKNVNL'IVNKKHDKLKT'QGF'TLESCRSMI'ALMD'YD'GSGRLNLQ 715
DMCLPNOCM_1 -----YLI'IKGKEEVRSPVQKNIVIH'ALFD'IQAVF-----YRRRT'-----DIP 558
cpn6 translat -----YLI'IKGKEEVRSPVQKNIVIH'ALFD'IQAVF-----YRRRT'-----DIP 577

```

```

#####
EFHLLWNKIKAYQKIFREIDVDRSGT'INSYEMR'NAVEDAGFKLNCQ'LYDVIVARYADDHLLI'IDFDNFVCC
780 790 800 810 820 830 840
CAN1_HUMAN EFNILWNRIRNYLSIFRKF'DLDKSGSMSAYEMRMA'IESAGFKLNK'KLYELI'ITRYSEPD'LA'VDFDNFVCC 678
CAN2_HUMAN EFYILWTKIQKYQKIYREIDVDRSGT'INSYEMR'KALEEAGFKMPC'QLHQVIVARFADDQLI'IDFDNFVRC 665
CAN2_RAT EFYILWTKIQKYQKIYREIDVDRSGT'INSYEMR'KALEEAGFKL'PCQLHQVIVARFADDELI'IDFDNFVRC 665
CAN3_HUMAN EFHHLWNKIKAWQKIFKHYD'TDQSGT'INSYEMR'NAVNDAG'FHLNNQLYDI'ITMRYADKHMNI'DFDSFICC 785
CAN3_RAT EFHHLWNKIKAWQKIFKHYD'TDHSGT'INSYEMR'NAVNDAG'FHLNSQLYDI'ITMRYADKHMNI'DFDSFICC 785
DMCLPNOCM_1 -----DLKSLYL'RKKG'GPTAKVK----- 558
cpn6 translat I'IQVWNSR'KFC'DQ'FLGQV'TLDAD'P'SDCR-----DLKSLYL'RKKG'GPTAKVK----- 625

```

Fig. 1

	LVRLEGMFRAFKALDKDGDGIIKLDVLSWLQLITML-	
	850 860 870	
CAN1_HUMAN	LVRLEIMFRFFKTLDTLDLGGVVTFDLQKWLQITMFA	714
CAN2_HUMAN	LVRLETLFKIFKQLDPENIGTIELDLISWLCFSVL	700
CAN2_RAT	LVRLEILFKIFKQLDPENIGTPIQLDLISWLSFSVL	700
CAN3_HUMAN	FVRLEGMFRAFHAFDKDGDGIIKLNVLQITMYA	821
CAN3_RAT	FVRLEGMFRAFHAFDKDGDGIIKLNVLQITMYA	821
DMCLPNOCM_1		558
cpn6 translated	-----QGIIISFKVISSDDLTEL.	642

Fig. 2

1 S S L A S R E S L W Q K V I P D W K E Q E W N P E K P D S Y A D I F H F
 2 S S L A S R E S L W Q K V I P D W K E Q E W D P E K P N A Y A D I F H F
 3 S C L A V Q E S H W T K A I P N H K K D Q E E W D L R K K P E K Y A G I F H F
 4

5 S A L T H N F K L L A Q V I P D A D D Q E W S T K - - H A Y A G I F R F
 6 A S L T L N E E I L A R R V V P P - - D Q S F Q - - - E N Y A G I F H F
 7 A S L T L N D T L L H R R V V P H - - G Q S F Q - - - N G Y A G I F H F
 8 A S L T L N E K L L Y R R V V P R - - D Q S F Q - - - K D Y A G I F H F
 9 A C L T L N Q H L L F R R V I P H - - D Q S F I - - - E N Y A G I F H F

1 N F W R F G E W V D V I V D D R L P T V N N Q L I Y C H S N S K N E 88
 2 H F W R F G E W V D V V I D D R L P T V N N Q L I Y C H S N S R N E 88
 3 R F W H F G E W T E V V I D D L L P T I N G D L V F S F S T S M N E 88
 4

5 R F W R F G K W V E V V I D D L L P T R D G K L L F A R S K T P N E 90
 6 Q F W Q Y G E W V E V V D D R L P T K D G E L L F F V H S A E G S E 112
 7 Q L W Q Q F G E W V D V V D D L L P I K D G K L L V F V H S A E G N E 122
 8 Q F W Q Q Y G E W V E V V D D R L P T K N G Q L L F F L H S E E G N E 112
 9 Q F W R Y G E W V D V V I D D C L P T Y N N Q L L V F T K S N H R N E 136

Fig. 2

1 I S A S I K A V T A A D - - - - - M E A R L A C G L V K G H A Y A V T
 2 I S A S I K A V T A A D - - - - - M E A R L A C G L V K G H A Y A V T
 3 I C C S I E S P S Q E E - - - - - Q E V E T D W G L L K G Y T Y T M T
 4 I C C S I E S P S Q E E - - - - - Q E V E T D W G L L K G Y T Y T M T
 5 V V A A I A A R T K E E - - - - - I E S L D C C G L V K G H A Y A V S
 6 L G C S I D I T S A A D - S E A V T Y Q K - - - L V K G H A Y S V T
 7 L G C S I D I S S V L D - M E A I T F K K - - - L V K G H A Y S V T
 8 L G C S I D V S T A A E - A E A T T R Q K - - - L V K G H A Y S V T
 9 M G C S I D D G T N M T Y G T = V Q Y E T R M A C G L V R G H A Y S V T

1 D V R K V R L G H G L L A F F K S - - - - - E K L D M I R L R N P 228
 2 D V R K V R L G H G L L A F F K S - - - - - E K L D M I R L R N P 228
 3 D I R K L R L G E R L V E V F S T - - - - - E K L Y M V R L R N P 228
 4 D I R K L R L G E R L V E V F S A - - - - - E K L Y M V R L R N P 22
 5 A V C T I D V T N P N E R S F T S F I M G S K R K Q N L R L Q N P 228
 6 G A E E V E S S G S L Q K - - - - - L I R I R N P 238
 7 G A K Q V N Y R G G Q V S - - - - - L I R I R N P 248
 8 G V E E V N F H G R P E K - - - - - L I R L R N P 238
 9 G L D E V P F F K G E K V K - - - - - L V R L R N P 262

CAL6

Fig. 2

11/19

```

1 W G E R E W T G P W S D T S E E W Q K V S K S E R E K M G V T V O - -
2 W G E R E W N G P W S D T S E E W Q K V S K S E R E K M G V T V O - -
3 L G R Q E W S G P W S E I S E E W Q Q L T V T D R R K N L G L V M S - -
4 L G R Q E W S G P W S E I S E E W Q Q L T A S D R R K N L G L V M S - -
5 W G F K E W N G A W S D D S S P E E W Q Q N V S A S Q L S T M G V Q P A N S D
6 W G Q V E W T G K W N D N C P S W N T V D P E V R A N L T E R Q - -
7 W G E V E W T G A W S D S S S E W N N V D P P Y E R D Q L R V K M - -
8 W G E V E W S G A W S D N A P E W N N Y I D P P R R K E E L D K K A - -
9 W G Q V E W N G S W S D R R W K D W S F V D K K D E K A R L Q H Q V T - -

```

<- DOAMIN II/DOMAIN III ->

```

1 - D D G E F W M T F E D M C R Y F T D I I K C R L I N T S Y L S I H 286
2 - D D G E F W M T F E D V C R Y F T D I I K C R V I N T S H L S I H 286
3 - D D G E F W M S L E D F C H N F H K L N V C R N V N N P V F G - R 286
4 - D D G E F W M S L E D F C R N F H K L N V C R N V N N P I F G - R 80
5 S D D G D F W M P W E S F V H Y F T D I S L C Q L F N T S V F F S F S 292
6 - E D G E F W M S F S D F L R H Y S R L E E I C N L T P D T L T C D S 288
7 - E D G E F W M S F R D F F M R E F T R L E E I C N L T P D A L K S R T 298
8 - E D G E F W M S F S D F L K Q Y S R L E E I C N L T S P D S L S S E E 288
9 - E D G E F W M S Y E D F T K L E E I C N L T A D A L Q S D K 318

```

CAL9

Fig. 2

1 - K T W E E A R L H G A W T R H E - - - D P Q Q N R S G G C I N H K D T
 2 - K T W E E A R L K G A W T L H E - - - D P R Q N R G G C I N H K D T
 3 - K E L E - - S V V G C W T V D D - - - D P L M N R S G G C Y N N R R D T
 4 - K E L E - - S V V L G C W T V D D - - - D P L M N R S G G C Y N N R R D T
 5 - R S Y D E Q I V F S E W T T N G K S G A P D D R A G G C H N F K A T
 6 Y K K W K L T K M D G N W R R G S T - - - A G G C R N Y P N T
 7 I R K W N T T L Y E G T W R R G S T - - - A G G C R N Y P A T
 8 I H K W N L V L F N G R R W T R G S T - - - A G G C L N Y P G T
 9 L Q T W T V S V N E G R W V R G C S - - - A G G C R N Y P D T

1 F F Q N P Q Y V F E V K K P E D E - - - V L I S I Q 352
 2 F F Q N P Q Y I F E V K K P E D E - - - V L I C I Q 352
 3 F L Q N P Q Y I F T V P E D G H K - - - V I M S L Q 351
 4 F L Q N P Q Y I F T V P E D G H K - - - V I M S L Q 145
 5 F C N N P Q Y I F D I P S P N C S - - - V M F A L I 362
 6 F W M N P Q Y L I K L E E D E D E E D G G R - - G C T F L V G L I 353
 7 F W V N P Q Y F K I R L D E E T D D P D D Y G D R R E S G C S F V L A L M 363
 8 Y W T N P Q Y F F K I H L L D E E D Q E E G T S E P C C T V L L G L M 353
 9 F W T N P Q Y R R L L E E D D P D - - D S E V I C S F L V A L M 384

Fig. 2

1 Q R R P K R S T R R E G K G E N L A I G F D I Y K V
 2 Q R R P K R S T R R E G K G E N L A I G F D I Y K V
 3 Q K D L R T Y R R M G R P D N Y I I G F E L F K V
 4 Q K D L R T Y R R M G R P D N Y I I G F E L F K V
 5 Q N D D P S E G L K K - R E P F V T I G M H V M K V
 6 Q K H R R R R Q R K M G E D - M H T T I G F G I Y E V
 7 Q K H R R R R Q R K M G E D - M H T T I G F G I Y E V
 8 Q K N R R R R Q R K I G Q G - M L S I G Y A V Y Q I
 9 Q K N R R R R Q R K L G A S - L F T I G F A I Y E V

1 M H S - - - - - L - - - - - Q H K A A S S I Y I N S R S V F L R - - - - - T E L P E G 407
 2 M H S - - - - - L - - - - - Q H K A A S S I Y I N S R S V F L R - - - - - T D Q P P E G 407
 3 L H H - - - - - L Y I Q E R A G T S T Y I D T R R T V F L S - - - - - K Y L K K G G 404
 4 L H H - - - - - L Y I Q E R A G T S T Y I D T R R T V F L S - - - - - K Y L K K G G 198
 5 V H T - - - - - - - - - - H P I A I S D Y A S G R S V Y L H L Q S L P P R R G G 420
 6 L G K N F F F F F L T R A R E R S D T F I N L R R E V L N R R F F K - L P P P G G 413
 7 L K R D F F F F F L T R A R E R S D T F I N L R R E V L N R R F F K - L P P P G G 425
 8 L G R D F F F F F L G R Q P S T C S S T Y M N L R E E V S S R V R R - L P P P G G 415
 9 L Q K D F F F F F L Y N A S K A R S K T Y I N M P E V S S Q R R F R - L P P P S 444

Fig. 2

1 G A A G L K D - - - - - S P T G A N S Y V I I K C E G - - E K V
 2 G A A G L K D - - - - - S P T G A N S Y V I I K C E G - - D K V
 3 S A E G L E K - - - - - K Y A N E T V N P Y L I I K C C G K - - E E V
 4 S A E D L E R - - - - - R Y A N G T V N P Y L V I I K C C G K - - E E V
 5 G V D F - - - - - S A S T G T H N V Y A I L K C D S R - - K S F
 6 S A F E L Q T I L R R V L A K R Q D I K S D G F S I E T C C R I M V D M L
 7 S V K E L R T I L N R R I I S K H K D L R T K G F S L E S C R S M V N L M
 8 S A N Q L K R V L N E V L S K R T D M K F D G F N I N T C R E M I S L L
 9 C A D E L K K V L N T V V N K H K D L K T H G F T L E S C R S M I A L M

1 R S A V Q R G T S T P E Y N V - - - - - K G I F Y R H K L A Q 525
 2 R S A V Q K G T S T P E Y N V - - - - - K G I F Y R K K L S Q 525
 3 R S P V Q K N T V H A I F D T - - - - - Q A I F Y R R T T D I 524
 4 R S P V Q K N T V H A I F D T - - - - - H A I F Y R R T T D I 318
 5 R T K T L S G V K S I Q W D E - - - - - Q F L F H K S K N R Q 536
 6 D E D G S G K L G L K E F F Y I L W T K I Q K Y Q K I Y R E I D V D R 549
 7 D R D G N G K L G L V E F F N I L W N R I R R I R R K F D L D K 562
 8 D S D G T G S L G P M E F F K T L W L K I R R T Y L E I F Q E M D H N H 552
 9 D D G S G L N L Q E F F H H L W N K I K A W Q K I F F Q K H Y D T D Q 581

Fig. 2

1	V	R	V	L	C	S	A	S	L	T	A	V	629
2	V	H	I	L	S	S	T	S	L	T	A	V	629
3	F	K	V	I	S	S	D	D	L	T	E	L	630
4													
5	V	T	V	S	A	F	D	D	P	M	Y	L	637
6	L	N	L	A	S	W	L	S	F	S	V	L	689
7	F	D	L	F	K	W	L	Q	L	T	M	F	A 702
8	L	S	L	A	E	W	L	C	-	C	V	L	V 692
9	L	N	V	L	E	W	L	Q	L	T	M	Y	A 721

1	=	mouse	nCL-3
2	=	human	nCL-3
3	=	mouse	nCL-4
4	=	human	nCL-4
5	=	nematode	tra-3
6	=	mouse	mcal
7	=	human	mu
8	=	rat	ncl2
9	=	human	p94

fig.4

Capn6

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	whole brain	amygdala	caudate nucleus	cerebellum	cerebral cortex	frontal lobe	hippocampus	medulla oblongata
B	occipital lobe	putamen	substantia nigra	temporal lobe	thalamus	sub-thalamic nucleus	spinal cord	
C	heart	aorta	skeletal muscle	colon	bladder	uterus	prostate	stomach
D	testis	ovary	pancreas	pituitary gland	adrenal gland	thyroid gland	salivary gland	mammary gland
E	kidney	liver	small intestine	spleen	thymus	peripheral leukocyte	lymph node	bone marrow
F	appendix	lung	trachea	placenta				
G	fetal brain	fetal heart	fetal kidney	fetal liver	fetal spleen	fetal thymus	fetal lung	