

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. November 2004 (18.11.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/099424 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12P

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/004404

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. April 2004 (27.04.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 21 892.0 7. Mai 2003 (07.05.2003) DE
103 26 689.5 4. Juni 2003 (04.06.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **PROTEOSYS AG** [DE/DE]; Carl-Zeiss-Strasse 51,
55129 Mainz (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **SOSKIC, Vukic**
[YU/GB]; 6 Arlington Court, 22 The Grove, London,
N3 1QZ (GB). **SCHRATTENHOLZ, André** [DE/DE];
Hinter der Kirche 49, 55129 Mainz (DE).

(74) Anwalt: **RUFF, WILHELM, BEIER, DAUSTER &
PARTNER**; Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

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

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

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

(54) Title: ENRICHMENT OF ENZYMATIC CLEAVAGE PRODUCTS

(54) Bezeichnung: ANREICHERUNG VON ENZYMATISCHEN SPALTPRODUKTEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for the enrichment, isolation and/or identification of cleavage products of at least one enzyme from a sample. According to the invention, an enzymatically inactive mutant of a protease is used as an affinity material, said mutant furthermore maintaining its specific substrate nature. At least one cleavage product of the protease of which the mutant is used, and at least one cleavage product of the enzyme of which the cleavage products are to be analysed, comprise at least one structural similarity.

(57) Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von Spaltprodukten mindestens eines Enzyms aus einer Probe bereitgestellt, wobei eine enzymatisch inaktive Mutante einer Protease als Affinitätsmaterial verwendet wird, welche ihre Substratspezifität weiterhin aufweist. Hierbei weisen mindestens ein Spaltprodukt der Protease, deren Mutante verwendet wird, und mindestens ein Spaltprodukt des Enzyms, dessen Spaltprodukte analysiert werden sollen, mindestens eine strukturelle Ähnlichkeit auf.

WO 2004/099424 A2



Anreicherung von enzymatischen Spaltprodukten

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von enzymatischen Spaltprodukten sowie bestimmte Mutanten und deren Verwendung.

Der Abbau von Proteinen ist eine wesentliche Komponente von biologischen Regulationsmechanismen, wie sie in allen lebenden Organismen stattfinden. An dem Abbau von Proteinen sind die sogenannten Proteasen als Enzyme, die eine Spaltung katalysieren, maßgeblich beteiligt.

Als Proteasen werden die Enzyme bezeichnet, die die hydrolytische Spaltung (Proteolyse) der Peptid-Bindung in Proteinen und Peptiden katalysieren. Die Proteasen lassen sich in die sogenannten Proteinasen (früher: Endopeptidasen) und Peptidasen (früher Exopeptidasen) unterteilen. Erstere spalten Peptid-Bindungen im Inneren eines Proteins und produzieren dadurch Peptide als Spaltprodukte. Letztere spalten Proteine am Amino- oder Carboxy-Ende. Im folgenden wird in der Regel nur

von Proteasen gesprochen, wobei hierunter vorzugsweise Proteinasen zu verstehen sind.

Ein wichtiges Gebiet in der Proteomforschung ist die Identifizierung von Substraten der Proteasen und von den proteolytischen Produkten, also den Spaltprodukten, dieser Enzyme. Dies ist eine wichtige Voraussetzung dafür, daß die Funktion von bereits bekannten und auch neuen Proteasen erforscht werden kann. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von dem Forschungsfeld „Degradomics“, welches sich zum Ziel setzt, alle Proteasen eines Proteoms sowie auch die Substrate, die von einer bestimmten Protease gespalten werden, zu identifizieren. Definitionsgemäß ist „Degradomics“ die Anwendung von genomischen und proteomischen Ansätzen, um Proteasen sowie deren Substrate und Inhibitoren in einem komplexen System, wie es ein lebender Organismus darstellt, zu charakterisieren.

Insbesondere die Proteinase und ihre Spaltprodukte sind für die Degradomics-Forschung von besonderem Interesse. Beispielsweise ist die Erforschung der Familie der Caspasen ein besonderer Schwerpunkt. Die Caspasen spielen bei dem kontrollierten Abbau verschiedener zellulärer Substrate eine wichtige Rolle, insbesondere sind sie an apoptotischen Vorgängen beteiligt, d. h. also an Abbauvorgängen, die mit dem kontrollierten Zelltod einhergehen. Die Caspasen sind eine hoch konservierte Proteasenfamilie mit wenigstens 12 humanen Mitgliedern. Wegen ihrer Rolle in Entzündungsprozessen und bei der Apoptose von Zellen sind die Caspasen von enormem wissenschaftlichen Interesse. Die Caspasen zählen zu den Cystein-Proteasen, d. h., daß diese Proteasen im aktiven Zentrum an einer kritischen Stelle Cystein tragen, welches für die proteolytische Aktivität entscheidend ist. Caspasen sind sehr spezifische Proteasen, die nach einem Asparaginsäurerest in ihrem Substrat spalten. Alle Spaltprodukte der Caspasen tragen daher einen Asparaginsäurerest am C-terminalen Ende des peptidischen Spaltproduktes (Position

P1). An der Position P3 befindet sich oftmals Glutaminsäure. Durch Untersuchung der verschiedenen Spaltprodukte können interessante Rückschlüsse auf die Funktion und die Rolle der verschiedenen Caspasen in der Zelle bzw. im Organismus gezogen werden. Unter anderem können durch den allgemeinen Nachweis von Spaltprodukten der Caspasen Hinweise auf die Aktivität dieser multiplen Enzymgruppe gezogen werden, ohne daß ein einzelner Vertreter der Caspasen, der unter Umständen nur sehr geringe Aktivität entfaltet, nachgewiesen werden mußte.

10

Daher stellt sich die Erfindung die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, mit welchem Spaltprodukte eines bestimmten Enzyms oder einer Gruppe von Enzymen mit wenigen Verfahrensschritten untersucht werden können. Durch die Untersuchung der Spaltprodukte eines Enzyms sollen unter anderem Aussagen über die Aktivität des oder der für die Spaltung verantwortlichen Enzyme gemacht werden können.

15

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, wie es im Anspruch 1 dargestellt ist. Der Anspruch 16 betrifft eine bestimmte Mutante einer Protease und der Anspruch 25 eine entsprechende Nukleotidsequenz. Die Ansprüche 27 und 29 beschäftigen sich mit der Verwendung der Mutante bzw. mit einer entsprechenden Affinitätsmatrix. Bevorzugte Ausführungsformen finden sich in den Unteransprüchen. Durch Bezugnahme wird der Wortlaut sämtlicher Ansprüche zum Inhalt der Beschreibung gemacht.

20

25

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können Spaltprodukte mindestens eines Enzyms aus einer Probe angereichert, isoliert und/oder identifiziert werden. Dies geschieht unter Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante einer Protease als Affinitätsmaterial, wobei es für das erfindungsgemäße Verfahren entscheidend ist, daß die enzymatisch inaktive Mutante der Protease ihre Substratspezifität weiterhin aufweist.

30

Weiterhin ist es wichtig, daß das oder die Spaltprodukte des Enzyms, welche zu analysieren sind, mindestens eine strukturelle Ähnlichkeit mit den hydrolytischen Spaltprodukten der Protease aufweisen, deren Mutante eingesetzt wird. Die enzymatische Inaktivität ist vorteilhaft, da ansonsten durch die als Affinitätsmaterial eingesetzte Protease selbst Spaltprodukte produziert werden könnten, die die Ergebnisse des erfindungsgemäßen Verfahrens möglicherweise verfälschen würden.

Bei diesem Verfahren wird zunächst die Probe, die die nachzuweisenden Spaltprodukte enthält, mit der enzymatisch inaktiven Mutante inkubiert, so daß sich Wechselwirkungen zwischen den nachzuweisenden Spaltprodukten in der Probe und der Mutante ausbilden können. Diese Wechselwirkungen beruhen darauf, daß die Mutante für Substrate mit bestimmten Strukturmerkmalen eine hohe Bindungsaffinität hat. Die nachzuweisenden Spaltprodukte weisen diese Strukturmerkmale auf, so daß sie von dieser Mutante spezifisch gebunden werden. In einem weiteren Schritt des Verfahrens kann Material, welches nicht mit der Mutante wechselwirkt, entfernt werden. Anschließend können die Spaltprodukte, die von der Mutante gebunden worden waren, analysiert werden. Ob eine Abtrennung der wechselwirkenden Spaltprodukte von der Mutante vor der eigentlichen Analyse der Spaltprodukte sinnvoll und eventuell notwendig ist, hängt von der konkreten Ausgestaltung des Verfahrens und insbesondere von der Analysemethode ab.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht darauf, daß zum einen die Protease, deren Mutante als Affinitätsmaterial eingesetzt wird, eine hohe Bindungsaffinität für ihre eigenen Substrate und auch für die Produkte aufweist, die durch die proteolytische Spaltung der Substrate entstehen. Weiterhin ist es erforderlich, daß diese Bindungsaktivität der Protease von ihrer katalytischen Aktivität getrennt werden kann.

Eine solche Trennung der katalytischen Aktivität von der Bindungsaktivität ist bereits für die Proteasen Trypsin und Chymotrypsin bekannt. Durch eine sogenannte Anhydro-Modifikation im katalytischen Zentrum dieser Proteasen läßt sich die katalytische Aktivität, also die Katalyse von hydrolytischen Spaltungen, zerstören, wohingegen die Bindungsaffinität für die Spaltprodukte erhalten bleibt. Diese als Anhydrotrypsin bzw. als Anhydrochymotrypsin bezeichneten Formen sind also nicht mehr in der Lage, Proteine zu spalten. Sie können jedoch weiterhin ihre Spaltprodukte binden. Im Fall von Anhydrotrypsin sind die Spaltprodukte Peptide, die am C-terminalen Ende Arginin und Lysin aufweisen. Im Fall von Anhydrochymotrypsin sind dies Peptide mit hydrophoben Aminosäuren am C-terminalen Ende. Die Anhydro-Mutanten von Trypsin und Chymotrypsin können hierbei durch eine chemische Modifizierung bzw. Behandlung erzielt werden, wobei Serin im aktiven Zentrum der Enzyme durch Alanin, also die Anhydro-Form von Serin, ersetzt wird.

Eine ähnliche Trennbarkeit von katalytischer Aktivität und Bindungsaffinität für Substrate bzw. Spaltprodukte wurde für die Protease ClpXP beschrieben (Molecular Cell, Vol. 11, 671-683, 2003).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Enzym, dessen Spaltprodukte angereichert, isoliert und/oder identifiziert werden sollen, eine Protease, wobei sich diese Protease vorzugsweise von der Protease unterscheidet, deren enzymatisch inaktive Mutante als Affinitätsmaterial verwendet wird. Diese Ausführungsform der Erfindung hat den großen Vorteil, daß die enzymatisch inaktive Mutante einer Protease als universelles Werkzeug eingesetzt werden kann, um die Spaltprodukte eines beliebigen Enzyms zu untersuchen, solange die zu untersuchenden Spaltprodukte die entsprechenden strukturellen Merkmale aufweisen, wie sie für die Bindungsaktivität der eingesetzten enzymatisch inaktiven Mutante für bestimmte Substrate erforderlich sind. Hierdurch wird also ein breit einsetzbares Verfahren

für die Proteomforschung bereitgestellt, welches auf der Ausnutzung von funktionalen Merkmalen beruht. Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens können unter anderem Ergebnisse erzielt werden, die Rückschlüsse auf die Identität verschiedener Substrate bzw. Produkte von bestimmten Enzymen erlauben. Weiterhin wird hierdurch auch eine Quantifizierung der Aktivitäten von Enzymen oder ganzen Enzymfamilien ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei der strukturellen Ähnlichkeit zwischen den zu untersuchenden Spaltprodukten und den Produkten, die von der Protease, deren enzymatisch inaktive Mutante eingesetzt wird, gebunden werden, um einen oder mehrere übereinstimmende terminale Aminosäurereste, insbesondere um C-terminale Reste. Bei einer Vielzahl von Proteasen, deren Mutanten erfindungsgemäß eingesetzt werden können, beruht die Bindungsaffinität zu ihren Substraten auf einer oder mehreren bestimmten C-terminalen Aminosäuren. Beispielsweise zeigt die V8-Proteinase aus *Staphylococcus aureus* (Endoproteinase Glu(Asp)-C) eine spezifische Bindungsaffinität für Peptide, die Glutaminsäure (Glu) oder Asparaginsäure (Asp) am C-terminalen Ende aufweisen. Die Aminosäurereste an anderen Positionen spielen keine wesentliche Rolle. Eine enzymatisch inaktive Mutante dieser V8-Proteinase, die ihre Substratspezifität weiterhin aufweist, ist daher gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren geeignet, für die Untersuchung von Spaltprodukten anderer Enzyme eingesetzt zu werden, die entsprechende C-terminale Aminosäuren bzw. entsprechende Reste aufweisen. Dies gilt beispielsweise für die Spaltprodukte der Caspasen, die, wie anfangs erwähnt, Asparaginsäure am C-terminalen Ende tragen. Besonders bevorzugt ist daher eine Ausführungsform der Erfindung, bei welcher die strukturelle Ähnlichkeit ein C-terminaler Glutaminsäure- und/oder Asparaginsäurerest ist.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens trägt die enzymatisch inaktive Mutante der Protease eine Veränderung im aktiven Zentrum. Hierdurch wird erfindungsgemäß die katalytische Aktivität zerstört, wobei aber die Bindungsaktivität beibehalten wird.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei der Protease, deren Mutante eingesetzt wird, um eine Serin-Protease. Serin-Proteasen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie an einer kritischen Stelle im aktiven Zentrum Serin tragen. Durch ein Entfernen oder einen Austausch dieses Serins wird die enzymatische Aktivität zerstört, wohingegen die Substratspezifität beibehalten wird. Diese Proteasen sind daher erfindungsgemäß besonders geeignet, da durch eine einzelne Veränderung, die einen entsprechenden Aminosäureaustausch bewirkt, eine Mutante bereitgestellt werden kann, die erfindungsgemäß eingesetzt werden kann. Zu diesen besonders geeigneten Serin-Proteinasen zählt beispielsweise die bereits erwähnte V8-Proteinase.

Vorteilhafterweise handelt es sich bei der enzymatisch inaktiven Mutante um eine Anhydro-Mutante. In besonders bevorzugter Weise handelt es sich hierbei um einen Austausch von Serin zu Alanin. Da bei den erwähnten Serin-Proteasen ein Serin im katalytischen Zentrum der Protease für die hydrolytische Aktivität verantwortlich ist, kann durch eine solche Anhydro-Mutation die hydrolytische Aktivität zerstört werden, wobei die Substratspezifität beibehalten wird. Selbstverständlich können auch andere Mutanten von Proteasen erfindungsgemäß eingesetzt werden, solange sie enzymatisch inaktiv sind, also keine hydrolytische Spaltung mehr katalysieren können, und weiterhin ihre Substratspezifität aufweisen.

In einer besonders vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die enzymatisch inaktive Mutante in immobilisierter Form eingesetzt. Hierdurch wird die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wesentlich erleichtert, da das Inkubieren der Probe, das
5 Entfernen von Material und gegebenenfalls die Abtrennung von Spaltprodukten an einer festen Phase durchgeführt werden kann. In besonders vorteilhafter Weise kann das Verfahren in Form einer Säulenchromatographie durchgeführt werden, wobei die enzymatisch inaktive Mutante auf einem üblichen Chromatographiematerial, wie beispielsweise
10 Sepharose, Agarose oder Fraktogel immobilisiert sein kann. Die Immobilisierung kann mit üblichen Methoden erfolgen. Beispielsweise kann die Mutante über eine Sequenz von Histidinen an immobilisierte Nickelionen (z. B. Ni-NTA Agarose) gekoppelt werden.

15 Die Analyse der angereicherten Spaltprodukte kann mit üblichen Methoden erfolgen. Besonders bevorzugt ist eine Analyse unter Verwendung von ein- und/oder zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese. Weiterhin kann die Analyse mit üblichen massenspektrometrischen Methoden durchgeführt werden. Die Massenspektrometrie kann auch mit
20 einer Polyacrylamidgelelektrophorese oder anderen üblichen Methoden kombiniert werden.

Für die Durchführung des eigentlichen Verfahrens, also das Inkubieren der Probe und das Entfernen von nicht wechselwirkendem Material,
25 kann eine Chromatographie, insbesondere eine Säulenchromatographie, beispielsweise eine übliche Affinitätschromatographie, durchgeführt werden. Weiterhin kann die Analyse einen oder mehrere Chromatographieschritte, insbesondere Säulenchromatographieschritte, umfassen. Außerdem kann beispielsweise eine weitere Auftrennung von ver-
30 schiedenen angereicherten Spaltprodukten durch einen oder mehrere Chromatographieschritte erreicht werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die zu analysierenden Spaltprodukte im Verlauf des Verfahrens modifiziert. Hierbei kann es sich insbesondere um eine weitere Spaltung der Spaltprodukte handeln, die beispielsweise durch Behandlung mit geeigneten Enzymen erreicht wird. Insbesondere ist hierfür ein tryptischer Verdau oder ähnliches geeignet. Eine derartige Modifizierung erfolgt vor allem im Hinblick auf eine Analyse der Spaltprodukte, wobei die Spaltprodukte beispielsweise für eine massenspektrometrische Analyse weiter fragmentiert werden.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens handelt es sich bei der Protease, deren enzymatisch inaktive Mutante eingesetzt wird, um eine V8-Proteinase, beispielsweise um eine V8-Proteinase aus *Staphylococcus aureus*. Eine entsprechende Mutante, insbesondere eine Anhydro-Mutante dieses Enzyms, ist erfindungsgemäß besonders geeignet. Sie ist für eine Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von Spaltprodukten zu verwenden, die C-terminal einen Glutaminsäure- oder Asparaginsäurerest tragen. Besonders bevorzugt ist es hierbei, Peptide mit einem C-terminalen Asparaginsäurerest anzureichern bzw. zu isolieren und/oder zu identifizieren.

20

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhafterweise dazu eingesetzt werden, Spaltprodukte von Cystein-Proteasen zu untersuchen. Ganz besonders geeignet ist das Verfahren für die Untersuchung und Charakterisierung von Spaltprodukten einer oder mehrerer Caspasen. Caspasen sind sehr spezifische Proteasen, deren Spaltprodukte Asparaginsäure am C-terminalen Ende aufweisen. Somit ist insbesondere die Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante der V8-Proteinase für die Untersuchung von Spaltprodukten der Caspasen geeignet, da eine entsprechende Mutante eine hohe Affinität zu Spaltprodukten mit C-terminalen Asparaginsäurerest aufweist.

30

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine enzymatisch inaktive Mutante einer Protease, wobei bei dieser Mutante die Substratspezifität erhalten ist. Besonders bevorzugt ist hierbei eine entsprechende Mutante einer Serin-Protease, insbesondere einer V8-Proteinase, beispielsweise einer V8-Proteinase aus *Staphylococcus aureus*. Eine derartige Mutante kann mit großem Vorteil im beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden. Bezüglich weiterer Merkmale dieser Mutante wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform dieser Mutante handelt es sich um die erwähnte V8-Proteinase, beispielsweise aus *Staphylococcus aureus*, bei welcher an Position 237 Serin modifiziert, ausgetauscht oder entfernt ist. Bevorzugterweise ist das Serin an dieser Position durch eine andere Aminosäure, insbesondere durch Alanin, ersetzt.
- 15 Der Austausch an der Position 237 von Serin zu Alanin erfolgt hierbei vorzugsweise durch einen einzelnen Basenaustausch an Position 712 von Thymin zu Guanin. Bei dem Serin an Position 237 handelt es sich um das kritische Serin im aktiven Zentrum der Proteinase. Eine Veränderung an dieser Stelle bewirkt eine Zerstörung der katalytischen, also der hydrolytischen Aktivität, wobei die Substratspezifität erhalten bleibt.

Die erfindungsgemäße Mutante kann durch chemische Modifikation der Protease hergestellt werden. Besonders bevorzugt ist es jedoch, wenn die Mutante durch molekularbiologische Methoden hergestellt wird.

25

- Die erfindungsgemäße enzymatisch inaktive Mutante kann dadurch gekennzeichnet sein, daß sie zumindest einen Teil der Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 aufweist. Weiterhin umfaßt die Erfindung eine entsprechende Mutante, die zumindest zu 70 %, insbesondere zumindest zu 90 %, und vorzugsweise zumindest zu 99 %, identisch mit der Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder einem oder mehreren Teilen davon ist. Hiervon werden vor allem Mutanten umfaßt, die
- 30

den Teil bzw. die Teile der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 aufweisen, die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Darüber hinaus umfaßt die Erfindung auch solche Mutanten, die derartige Ähnlichkeiten mit solchen Sequenzen aufweisen, daß sie noch eine entsprechende Substratspezifität im erfindungsgemäßen Sinne bewirken.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform dieses Aspektes der Erfindung ist die enzymatisch inaktive Mutante ferner dadurch gekennzeichnet, daß sie in immobilisierter Form vorliegt. Auch diesbezüglich wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Weiterhin umfaßt die Erfindung eine Nukleotidsequenz, die für eine enzymatisch inaktive Mutante einer Protease kodiert, deren Substratspezifität beibehalten ist. Bezüglich der weiteren Merkmale der von dieser Nukleotidsequenz kodierten Protease wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Insbesondere ist die erfindungsgemäße Nukleotidsequenz dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen Teil der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 2 umfaßt. Insbesondere sind hierbei die Teile der Nukleotidsequenz bevorzugt, die für den Bereich der Protease kodieren, die für die Substratspezifität entscheidend sind.

Ferner umfaßt die Erfindung die Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante einer Protease, deren Substratspezifität erhalten ist, als Affinitätsmaterial in einem Verfahren zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von Spaltprodukten mindestens eines Enzyms, wobei mindestens ein Spaltprodukt der Protease und mindestens ein Spaltprodukt des Enzyms mindestens eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Bezüglich weiterer Merkmale dieser erfindungsgemäßen Verwendung wird auf die obige Beschreibung verwiesen.

Schließlich umfaßt die Erfindung eine Affinitätsmatrix zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von enzymatischen Spaltprodukten.

- Diese Affinitätsmatrix umfaßt eine immobilisierte, enzymatisch inaktive Mutante einer Protease unter Beibehalt ihrer Substratspezifität. Auch diesbezüglich wird auf die obige Beschreibung verwiesen. Diese erfindungsgemäße Affinitätsmatrix ist als universelles Werkzeug für Untersuchungen im Proteom-Bereich bzw. in der Degradomics-Forschung einsetzbar. Hiermit können beispielsweise Aktivitätsänderungen von ganzen Enzym-Familien, wie beispielsweise den Caspasen, unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden.
- 10 Die Affinitätsmatrix kann beispielsweise als einfache Säulenchromatographie-Matrix, vergleichbar mit einer üblichen Affinitätschromatographie, eingesetzt werden. Nach dem Auftragen der zu untersuchenden Probe und einem oder mehreren Waschschrritten können die zu untersuchenden Spaltprodukte beispielsweise durch Wechsel der Pufferbedingungen eluiert und anschließend analysiert werden. Die Analyse kann beispielsweise mit einer üblichen zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt werden. Mit einem solchen Verfahren können in wenigen Schritten Ergebnisse erzielt werden, die Aussagen über enzymatische Aktivitäten liefern. Weiterhin können auch Substrate und
- 15 Produkte von Enzymen, insbesondere von Proteinasen, charakterisiert und/oder identifiziert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt ein wirksames Werkzeug bereit, um selektiv spezifische Klassen von Proteinen bzw. Peptiden anzureichern bzw. zu reinigen, die insbesondere für die Proteomforschung von großem Interesse sind. Solch ein gruppenspezifisches Affinitäts-Werkzeug eröffnet die Möglichkeit, Profile von Proteinen aufgrund von deren Aktivität zu erstellen. Hierdurch können Veränderungen im funktionellen Status von Enzymen sogar dann untersucht werden, wenn der mengenmäßige Level des Enzyms konstant bleibt. Weiterhin könnten mit Hilfe der Erfindung Untersuchungen zur
- 20 Wirksamkeit von Inhibitoren vorgenommen werden, die die verschiedenen Mitglieder einer Enzymfamilie, beispielsweise die Caspasen, beeinflussen. Hierfür kann z.B. die intakte Zelle oder ein Zellextrakt mit einem
- 25
- 30

potentiellen Inhibitor behandelt werden, um dann anschließend die Aktivität der Enzymfamilie gemäß der Erfindung in der oben beschriebenen Weise zu analysieren.

- 5 Weitere Merkmale ergeben sich aus den Beispielen in Verbindung mit den Figuren und den Unteransprüchen. Hierbei können die verschiedenen Merkmale jeweils für sich oder in Kombination miteinander verwirklicht sein.
- 10 In den Figuren zeigt:
- Fig. 1 schematische Darstellung der Konstruktion von Ser237Ala-V8 Δ 48.
- 15 Fig. 2 Expression der Anhydro-Mutante der V8-Proteinase. Die Proteinproben wurden auf einem 12 % SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) mit einem diskontinuierlichen Puffer aufgetrennt. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brillantblau R-250. 1: gesamtes Zellysat, 2: Durchlauf, 3: Elution, 4: Markerproteine.
- 20 Fig. 3 Enzymatische Aktivitäten vom Wildtyp und der Anhydro-Mutante der V8-Proteinase. Die Proteinaseaktivität wurde bei 30 °C in 0,1 M Tris-HCl pH 7,8, 0,01 M CaCl₂ mit 0,4 % universellem Proteasesubstrat (Roche) in einem Volumen von 0,2 ml gemessen. Die Aktivität wurde durch Absorptionsmessung bei
- 25 574 nm mit einem Spektrophotometer für eine Zeitperiode von 10 min. bestimmt. Die Konzentration der Proteinase war jeweils 1 µg/µl.
- 30 Fig. 4 Massenspektrometriemessung (MALDI-TOF) der von der Anhydro-V8-Agarose eluierten Peptide. Die Ni-NTA-Agarosekügelchen wurden mit Ser237Ala-V8 Δ 48 in 50 mM Tris-HCl, 300 mM

NaCl, 1 % CHAPS bei pH 7,4 beladen. Der neurotrope Faktor für retinale cholinerge Neuronen und [Cys(Bz)⁸⁴, Glu(OBz)⁸⁵]-CD₄(81-92) wurden mit der beladenen Agarose inkubiert. Die Agarose wurde gewaschen und mit 200 mM Essigsäure eluiert. Die Proben wurden in einem Speed Vac lyophilisiert und für die MALDI-Analyse verwendet. Spektrum 1: Eluat des neurotropischen Faktors für retinale cholinerge Neuronen, Spektrum 2: Eluat von Cys[(Bz)⁸⁴, Glu(OBz)⁸⁵]-CD₄(81-92).

5
10 Fig. 5 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese der Eluate der Anhydro-V8-Agarose. ReadyStrip IPG-Streifen (pH 5-8) wurden mit 40 µg Zellextrakt beladen. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit bis zu 70 kVh durchgeführt. Das SDS-PAGE wurde mit 11 % Polyacrylamidgelen (70x70x1,0 mm) bei 11 °C bei konstantem Strom (40 mA) durchgeführt. Die zweite Dimension wurde durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden mit Silbernitrat gefärbt. Das linke Gel zeigt die Kontrolle, das rechte Gel zeigt das aufgetrennte Zellextrakt der Zellen mit induzierter Apoptose.

15
20 Fig. 6 Zweidimensionales Polyacrylamidgel des aufgetrennten Zellextrakts der Zellen mit induzierter Apoptose, wobei die im Vergleich mit dem Kontrollgel (siehe Fig. 5) unterschiedlichen Proteinspots mit Zahlen markiert sind.

25 Fig. 7 Datenbankvergleich von massenspektrometrischen Ergebnissen verschiedener Spots aus einem zweidimensionalen Polyacrylamidgel von Zellextrakt aus Zellen mit induzierter Apoptose (siehe Fig. 6).

30 Fig. 8 Aminosäure- (A) und Nukleotidsequenzen (B) und (C) der 6xHis-Ser237Ala-V8Δ48-Mutante. Unter (A) ist die Aminosäuresequenz

der Mutante inklusiv dem 6xHis-Linker gezeigt (SEQ ID No. 1).
Unter (B) ist die kodierende Nukleotidsequenz inklusiv dem
6xHis-Linker und den Stop-Codon aus dem Vektor pQE9 darge-
stellt (SEQ ID No. 2). Unter (C) ist die Nukleotidsequenz aufge-
führt, welche als Insert für die Klonierung in den Vektor pQE9
5 verwendet wurde (SEQ ID No. 3). Bei (A) ist 6xHis kursiv und die
Alanin-Mutation fett und unterstrichen dargestellt. Bei (B) und (C)
sind die Restriktionsschnittstellen (BamHI und HindIII) kursiv und
die Punktmutation (t zu g) fett und unterstrichen dargestellt.

10

Übersicht über das Sequenzprotokoll

SEQ ID No. 1	Aminosäuresequenz der 6xHis-Ser237Ala-V8 Δ 48-Mu- tante
15 SEQ ID No. 2	kodierende Nukleotidsequenz inklusiv 6xHis-Linker und Stop-Codon
SEQ ID No. 3	Nukleotidsequenz-Insert für die Klonierung in den Vektor pQE9
SEQ ID No. 4	Klonierungsprimer PF1
20 SEQ ID No. 5	Klonierungsprimer PR1
SEQ ID No. 6	Klonierungsprimer PF2
SEQ ID No. 7	Klonierungsprimer PR2

25 **BEISPIELE**

1. Methoden

1.1 Klonierung der V8 Δ 48-Protease

30 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) wurde in LB-Medium bei 37 °C
über Nacht kultiviert. Genomische DNA wurde mit dem RNA/DNA
QIAGEN Minikit ausgehend von 1 ml Kultur gereinigt. Die Polymerase
Kettenreaktion (PCR) wurde mit den Primern PF1 (SEQ ID No. 4) und

PR1 (SEQ ID No. 5) (Tabelle 1), einem dNTP-Mix und der PfuTurbo® DNA-Polymerase durchgeführt. Durch diese Primer gemäß Yabuta et al. (Appl. Microbiol. Biotechnol. 44, 118-125 (1995)) wurde eine Sequenz vervielfältigt, die für die Aminosäuren 1 bis 663 der V8-Protease kodiert (V8Δ48 Protease). Die Vervielfältigungsprodukte wurden durch Elektrophorese auf einem 1,2 % Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden gereinigt, mit *Bam*HI und *Hind*III doppelt verdaut und in den Vektor pUC18 ligiert, so daß das Plasmid pUC18-V8Δ48 entstand. Das Ligationsgemisch wurde verwendet, um *Escherichia coli* DH5α (kompetente Zellen) zu transfizieren. Alle produzierten Klone wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft.

Tabelle 1: Sequenzen der Primer, die für die Klonierung und die Mutagenese der Anhydro-V8-Proteinase verwendet wurden.

	Primersequenz	Restr.-stellen	Mutation
Klonierungsprimer			
PF1	5'-CGC <u>GGATCC</u> GTTATATTACCAAATAACGAT-3'	<i>Bam</i> HI	na
PR1	5'-CCCAAGCTTTTGGTCATCGTTGGCAAAATGG-3'	<i>Hind</i> III	na
Primer für <i>site-directed</i> Mutagenese			
PF2	5'-AGTACA <u>ACTGGTGGTAACGCAGGTT</u> CACCTGTA-3'	na	Ser ⇒Ala
PR2	5'-TACAGGTGAACCT <u>TGCGTT</u> ACCACCAGTTGTACT -3'	na	Ser ⇒Ala

1.2. *Site-directed* Mutagenese und Subklonierung in den Vektor pQE9

Die *site-directed* Mutagenese von V8Δ48 wurde unter Verwendung von QuikChange® XL *site-directed* Mutagenese-Kit und dem Plasmid pUC

18-V8 Δ 48 durchgeführt. Die Mutation von Serin (Ser) 237 zu Alanin (Ala) wurde mit den Primern PF2 (SEQ ID No. 6) und PR2 (SEQ ID No. 7) (Tabelle 1) erreicht. Die Vektoren wurden isoliert und sequenziert. Positive Klone wurden mit *Bam*HI und *Hind*III doppelt verdaut und in den Expressionsvektor pQE9 ligiert, so daß das Plasmid pQE9-Ser237Ala-V8 Δ 48 entstand.

1.3. Expression und Reinigung der V8-Protease aus *E. coli*

10 Der kompetente *E. coli*-Stamm BL21(DE3) wurde mit dem Plasmid pQE9-Ser237Ala-V8 Δ 48 transfiziert. Frisch transfizierte Zellen mit dem Plasmid wurden in 100 ml LB (Luria Bertani)-Medium mit 1 μ g/ml Ampicillin bei 37 °C kultiviert. Bei einer Zelldichte von 0,6 (Absorption bei $\lambda=660$ nm) wurde die Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-
15 Thiogalaktosid bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Nach 3 h weiterer Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und in 2 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 % CHAPS, pH 7,4) suspendiert. Für die Lyse der Zellen wurden 0,1 ml einer Lösung mit Lysozym (20 mg/ml) zugegeben. Die Gemische wurden
20 für 30 min. bei 37 °C inkubiert und für die vollständige Zellzerstörung sonifiziert. Nach der Inkubation der Lösungen wurde für 20 min. bei 15.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter verwendet und das Pellet verworfen. Eine Probe von 8 μ l wurde von jedem Überstand für eine SDS-Gelanalyse aufgehoben.

25

Ni-NTA Agarosekügelchen wurden in 0,5 ml Säulen gepackt und mit dem Überstand beladen. Die Säulen wurden mit 5 Säulenvolumen Lysispuffer und 5 Säulenvolumen Lysispuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit Elutionspuffer
30 (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 % CHAPS, 400 mM Imidazol, pH 7,4). Der Proteingehalt wurde mit der BCA-Methode mit bovinem Serumalbumin als Kalibrierungsstandard bestimmt. Die eluierten Fraktio-

nen wurden auf einem 12 %igen SDS-PAGE mit diskontinuierlichem Puffer gemäß Laemmli analysiert. Die Färbung erfolgte mit Coomassie Brillantblau R-250. Die gereinigten Enzymfraktionen wurden kombiniert und mit NAP-5 Gelfiltrationssäulen entsalzt. Die NAP-5 Säulen wurden
5 mit 50 mM Tris-HCl, 1 % CHAPS, 10 % Glycerin, pH 7,4 vor der Verwendung equilibriert. Die Proben wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

1.4. Enzym-Aktivitätstest

10

Die V8-Proteaseaktivität wurde bei $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8, 0,01 M CaCl_2 mit 0,4 % universellem Proteasesubstrat (Roche) in einem Volumen von 0,2 ml gemessen. Die Aktivität des Enzyms wurde durch Beobachtung der Absorption bei 574 nm über einen Zeitraum von 10 min.
15 bestimmt.

1.5. Bindung von N-Asp und N-Glu-Peptiden an die immobilisierte Ser237Ala-V8 Δ 48 Protease

20

Die Ni-NTA-Agarosekügelchen (20 μl) wurden mit 20 μg Ser237Ala-V8 Δ 48 in 50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 1 % CHAPS, pH 7,4 beladen. Die Agarosekügelchen wurden mit 2 x 200 μl 0,1 M Essigsäure und dann 3 x 1 ml 50 mM Na-Phosphat, 300 mM NaCl, 1 % CHAPS, pH 7,2
25 gewaschen. Neurotropischer Faktor für retinale cholinerge Neuronen und [Cys(Bz)⁸⁴, Glu(OBz)⁸⁵]-CD₄(81-92), jeweils 20 μl einer 1 mg/ml Lösung von jedem Peptid im selben Puffer, wurden mit den beladenen Agarosekügelchen für 20 min. bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln inkubiert. Bei [Cys(Bz)⁸⁴, Glu(OBz)⁸⁵]-CD₄(81-92) handelt es
30 sich um die kurze Aminosäuresequenz AS81-92 des CD4-Proteins, welches an Position 84 (Cys) mit Bz und an Position 85 (Glu) mit OBz derivatisiert ist. Die Kügelchen wurden dreimal mit je 500 μl eiskaltem Puffer

und je 500 µl 20 mM NH_4HCO_3 , pH 8,4 gewaschen und mit 20 µl 200 mM Essigsäure eluiert. Die Proben wurden in einem Speed Vac lyophilisiert und für die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF) verwendet.

5

1.6. Zellkultur

Die Fibroplasten-Zelllinie aus Rattenniere NRK-49F wurde in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nährstoffmischung F12 Ham, mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), 1 % Antibiotika-Antimykotika (100 X-Lösung mit 10.000 U/ml Penicillin-G, 10 mg/ml Streptomycin und 25 µl/ml Amphotericin-B) bei 37 °C in befeuchteter Atmosphäre bei 5 % CO_2 kultiviert. Die Zellen wurden in 10 cm-Kulturschalen bis zur Subkonfluenz kultiviert und unter Verwendung von Trypsin-EDTA im Verhältnis 1:5 gesplittet. Für alle Experimente wurden 80 % konfluente NRK-49F Zellen durch Inkubation in entsprechendem Medium mit 0,5 % FCS für 24-48 h ruhig gestellt. Eine Lagerung der Zellen erfolgte durch Einfrieren in 90 % FCS, 10 % DMSO in flüssigem Stickstoff.

15
20

1.7. Induktion der Apoptose und Herstellung des Zellextraktes

Die Apoptose bei 80 % konfluenten Zellen wurde durch Zugabe von 1 M Hydrogenperoxid bis zu einer finalen Konzentration von 1 mM induziert. Kontrollzellen wurden ohne Hydrogenperoxid für einen entsprechenden Zeitraum inkubiert. Die Zellen wurden in hypotonischem Puffer (10 mM Na-Phosphat, pH 7,2, 1 % Triton X-100, 1X komplette Protease-Inhibitoren) lysiert und die unlöslichen Zelltrümmer bei 10.000 x g für 20 min. abzentrifugiert. 5 M NaCl wurde zum Überstand zugegeben, um eine finale Konzentration von 300 mM zu erreichen. Die so erhaltenen Proben wurden auf 100 µl gepackte Ni-NTA-Agarosesäulen gegeben, die

25
30

mit Ser237Ala-V8 Δ 48 Protease wie oben beschrieben beladen waren. Die Kügelchen wurden 3 x mit 2 ml eiskaltem Puffer mit 300 mM NaCl gewaschen und mit 100 μ l 1 % SDS in 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 300 mM NaCl bei 80 °C für 5 min. eluiert. Die Salze wurden mit Millipore
5 BIOMAX 5K Ultrafiltrationsmembran-Vorrichtungen entfernt und die Proben in Elektrophorese-Probenpuffer verdünnt.

1.8. Zweidimensionale Gelelektrophorese

10

Ready-to-use ReadyStrip IPG Streifen (pH 5–8) von Bio-Rad wurden über Nacht mit 50 μ l Zellextrakt rehydriert. Die isoelektrische Fokussierung wurde bis zu insgesamt 70 kVh durchgeführt. Vor der SDS-Gelelektrophorese wurden die IPG-Streifen in einer Lösung von 20 mg/ml
15 Dithiothreitol (DTT) in Equilibrierungspuffer für 20 min. inkubiert und anschließend in eine Lösung von 45 mg/ml Iodoacetamid in demselben Puffer für 20 min. gegeben. SDS-PAGE wurde mit einem 11 % Polyacrylamidgel (70x70x1,0 mm) bei 11 °C bei einem konstanten Strom von 40 mA durchgeführt. Die zweite Dimension wurde durchgeführt, bis die
20 Bromphenolblaufront das Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden mit Silber gemäß Shevchenko et al. (Anal. Chem. 68, 850-858 (1996)) gefärbt.

25 1.9. Probenvorbereitung für die MALDI-TOF Massenspektrometrie

Um massenspektrometrische Peptidkarten der Proteine zu erhalten, wurden 0,5 μ l Aliquots der generierten Spaltprodukte auf dem Probenträger verteilt und 0,5 μ l einer Lösung von α -Cyano-4-Hydroxymizinsäure
30 in 35 % Acetonitril/0,1 % Trifluoressigsäure aufgegeben.

1.10. MALDI-TOF Massenspektrometrie

5 Die Proben wurden in einem Autoflex MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker, Germany) analysiert. Alle Spektren wurden in einem positiven Ionenreflektor-Modus aufgenommen. Typischerweise wurden die ersten 10 Schüsse eines neuen Spots verworfen und die nächsten 200 Schüsse aufgenommen.

10

1.11. Kalibrierung der MALDI-TOF Spektren

Als externe Standards für die Kalibrierung wurde humanes Angiotensin I und II, Adrenocorticotropisches Hormon, [Glu]-Fibrinopeptid B, Rennin-
15 substrat Tetradecapeptid und die Insulin B-Kette verwendet. Die Menge jedes Peptides war 0,25 pmol pro Spot.

2. Ergebnisse

20

Die kodierenden Regionen der V8 Δ 48-Protease wurden durch eine Polymerasekettenreaktion mit der genomischen DNA von *S. aureus* gemäß Yabuta et al. amplifiziert. Das erhaltene Produkt wurde über die *Bam*-
25 *HI/HindIII*-Restriktionsstellen in das Plasmid pUC18 ligiert. Durch doppelsträngige Sequenzierung wurde gezeigt, dass die kodierende Region mit der beschriebenen Sequenz früherer Arbeiten identisch ist.

Eine *site-directed* Mutagenese wurde eingesetzt, um eine Mutation von Ser-237 zu Ala (T712>G) im pUC18-Plasmid mit dem V8-Proteasegen
30 zu produzieren. Dieser Schritt wurde durch DNA-Sequenzierung kontrolliert. Die identifizierte Kolonie, die diese Mutation trug, wurde in LB-Medium kultiviert und das korrespondierende Plasmid isoliert und mit

*Bam*HI und *Hind*III verdaut. Das erhaltene Gen Ser237Ala-V8 Δ 48 wurde in den Expressionsvektor pQE9 unter Verwendung der *Bam*HI/*Hind*III-Restriktionsstellen subkloniert und zur Transfektion von *E. coli* BL21(DE3) verwendet.

5

Die Mutante Ser237Ala-V8 Δ 48 mit einem N-terminalen Histidin-Tag (Fig. 1) wurde erfolgreich in *E. coli* BL21(DE3) bei Verwendung von Isopropyl β -D-Thiogalaktopyranosid bei 37 °C für 3 h exprimiert. Ni-NTA Agarose-säulen wurden für die Reinigung der Mutante eingesetzt. Die Proteinfraktionen mit Ser237Ala-V8 Δ 48 wurden sobald wie möglich nach der Reinigung durch NAP5-Säulen entsalzt, welche mit 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% Triton X-100 und 100 mM NaCl equilibriert waren. Die Reinheit des Enzyms wurde durch SDS-PAGE untersucht, wobei eine einzelne Bande von 26 kDA mit einer Reinheit von über 95 % beobachtet wurde (Fig. 2). Nahezu die gesamte Menge der V8 Δ 48 Proteinase mutante wurde als lösliches Protein exprimiert, welches in einem einzigen Schritt unter Verwendung von Ni-NTA Agarose-Affinitätssäulen gereinigt werden konnte.

20 Das exprimierte gereinigte Protein zeigte keine proteolytische Aktivität. Der Wildtyp der V8-Proteinase wurde als positive Kontrolle in dem gleichen Ansatz eingesetzt (Fig. 3).

Der neurotropische Faktor für retinale cholinerge Neuronen und [Cys(Bz)⁸⁴, Glu(OBz)⁸⁵]-CD₄(81-92) wurden verwendet, um die Bindungseigenschaften von Ser237Ala-V8 Δ 48 gegenüber Peptiden zu testen, die am C-terminalen Ende Asparaginsäure oder Glutaminsäure aufweisen. Die an Ni-NTA-Agarosekügelchen immobilisierte Mutante wurde mit jedem der Peptide inkubiert und nach dem Waschen der Kügelchen wurden die gebundenen Peptide mit 200 mM Essigsäure eluiert. Beide Peptide wurden in den Eluaten durch MALDI-TOF detektiert (Fig. 4). Als eine Kontrolle für dieses Experiment wurden Kalibrierungspeptide

30

für die MALDI-TOF Massenspektrometrie eingesetzt. Mit diesen Kontrollpeptiden wurden keine Signale im MALDI-TOF-Spektrum detektiert. Um die Bindungseigenschaften dieses neuen Affinitätsmaterials gegenüber Spaltprodukten von Caspasen zu testen, wurde wiederum auf Ni-NTA-Agarose immobilisiertes gereinigtes Ser237Ala-V8 Δ 48 verwendet. Für diesen Versuch wurde die Apoptose in NRK-49F Zellen unter Verwendung von Hydrogenperoxid induziert. Nach der Isolierung wurden die Proteine und Peptide auf die Ni-NTA-Agarose mit Ser237Ala-V8 Δ 48 gegeben. Nach dem Waschen des ungebundenen Materials wurden die gebundenen Peptide mit einer SDS-Lösung bei einer erhöhten Temperatur eluiert. Als eine Kontrolle für dieses Experiment wurden nicht apoptotische NRK-49F Zellen benutzt. Beide Proben wurden auf 2D-PAGE analysiert, wobei deutliche Unterschiede in den Protein- bzw. Peptidmustern zu beobachten waren (Fig. 5). Viele der Proteinspots in Fig. 5 konnten sowohl in der Kontrolle als auch in dem Gel des apoptotischen Zellextraktes beobachtet werden. Dies ist damit zu begründen, daß alle Proteine mit Asparaginsäure oder Glutaminsäure am C-terminalen Ende durch das Affinitätsmaterial gebunden wurden. All diese Proteine sind als Hintergrund zu betrachten. Die Proteinspots, die ausschließlich in dem Gel des apoptotischen Zellextraktes zu beobachten waren, sind die Spaltprodukte, die auf eine Caspaseaktivität zurückzuführen sind.

Zur Identifizierung der Spaltprodukte, die auf eine Caspaseaktivität zurückzuführen sind, wurden entsprechende Spots auf dem zweidimensionalen Gel markiert (Fig. 6) und aus dem Gel ausgeschnitten. Die Proteine bzw. Peptide wurden aus dem Gel durch tryptischen Verdau gewonnen. Die erhaltenen Fragmente wurden einer MALDI-TOF-Massenspektrometrie unterzogen (Vogt et al., 2003. Rapid communications in mass spectrometry 17: 1273 - 1282). Die gefundenen Massen wurden mit Daten aus einer Datenbank verglichen (Fig. 7) und auf diese Weise die Proteine aus dem zweidimensionalen Gel identifiziert. Hierbei erwies sich das in Fig. 6 als Spot 5 bezeichnete Protein als β -Tubulin, das als

Spot 8 bezeichnete Protein als β -Aktin und das als Spot 16 bezeichnete Protein als Nukleosid-Diphosphatkinase (nm23). Diese Proteine werden in der Literatur als Caspase-Substrate beschrieben (z. B. J. Urol. 2003 May; 169 (5): 1729 - 1734; J. Neuroscience 2003 Mar. 1; 23 (5): 1742-5 1749; J. Neuroscience Research 2002 Oct. 15; 70 (2): 180 - 189; J. Comp. Neurol. 2002 Oct. 7; 452 (1): 65 - 79; J. Comp. Neurol. 2000 Aug. 28; 424 (3): 476 - 488; Brain Res. Mol. Brain Res. 2000 Jan. 10; 75 (1): 143 - 149; Cell 2003 Mar. 7; 112 (5): 659 - 672; Cell 2003 Mar. 7; 112 (5): 589 - 591; Blood 2003 Apr. 15; 101 (8): 3212 - 3219). Das als Spot 3 10 bezeichnete Protein wurde als γ -Aktin identifiziert (Eur. J. Biochem. 2003 Jan.; 270 (2): 342 - 349; Arch. Dermatol. Res. 2001 Jun.; 293 (6): 283 - 290; Mol. Endocrinol. 1991 Oct.; 5 (10): 1381 - 1388). Dieses Protein zeigt große Homologie mit β -Aktin, so daß angenommen werden kann, daß γ -Aktin ebenfalls ein Caspase-Substrat ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von Spaltprodukten mindestens eines Enzyms aus einer Probe unter Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante einer Protease unter Beibehalt der Substratspezifität als Affinitätsmaterial, wobei mindestens ein Spaltprodukt der Protease und mindestens ein Spaltprodukt des Enzyms mindestens eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen, umfassend die Schritte
 - Inkubieren der Probe mit der enzymatisch inaktiven Mutante zur Ausbildung von Wechselwirkungen zwischen möglichen Spaltprodukten des Enzyms in der Probe und der Mutante,
 - Entfernen von nicht-wechselwirkendem Material,
 - gegebenenfalls Abtrennung der wechselwirkenden Spaltprodukte von der Mutante,
 - gegebenenfalls Analyse der Spaltprodukte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym eine Protease ist, wobei das Enzym eine andere Protease als die Protease ist, deren enzymatisch inaktive Mutante verwendet wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als strukturelle Ähnlichkeit mindestens ein Spaltprodukt der Protease mindestens eine gleiche terminale Aminosäure wie mindestens ein Spaltprodukt des Enzyms aufweist, insbesondere eine gleiche C-terminale Aminosäure.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die C-terminale Aminosäure Glutaminsäure und/oder Asparaginsäure ist.

5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatisch inaktive Mutante der Protease eine Veränderung im aktiven Zentrum trägt.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease eine Serin-Protease ist.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatisch inaktive Mutante eine Anhydro-Mutante ist.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Mutante einen Austausch von Serin durch Alanin aufweist.
9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die enzymatisch inaktive Mutante immobilisiert ist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse mit Polyacrylamidgelelektrophorese, insbesondere mit eindimensionaler und/oder zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese, und/oder Massenspektrometrie durchgeführt wird.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Analyse mindestens einen Chromatographieschritt umfaßt.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Spaltprodukte im Verlauf des Verfahrens,

insbesondere während der Analyse, modifiziert, insbesondere gespalten, vorzugsweise enzymatisch gespalten, werden.

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease eine V8-Proteinase ist, insbesondere eine Anhydro-Mutante der V8-Proteinase.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mindestens eine Cystein-Protease ist.
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das Enzym mindestens eine Caspase ist.
16. Enzymatisch inaktive Mutante einer Protease, insbesondere einer Serin-Protease, dadurch gekennzeichnet, daß die Substratspezifität erhalten ist.
17. Mutante nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die Protease eine V8-Proteinase ist.
18. Mutante nach Anspruch 16 oder Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Veränderung im aktiven Zentrum trägt.
19. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Anhydro-Mutante ist.
20. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 19, insbesondere nach Anspruch 18 oder Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Austausch von Serin durch Alanin aufweist.

21. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß das Serin an Position 237 ausgetauscht ist.
22. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen Teil der Aminosäure-Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 aufweist.
23. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Aminosäuresequenz aufweist, die zumindest zu 70 %, insbesondere zumindest zu 90 %, vorzugsweise zumindest zu 99 % identisch mit zumindest einem Teil der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 1 ist.
24. Mutante nach einem der Ansprüche 16 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß sie immobilisiert ist.
25. Nukleotidsequenz, die für eine enzymatisch inaktive Mutante einer Protease gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24 kodiert.
26. Nukleotidsequenz nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß sie zumindest einen Teil der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 2 aufweist.
27. Verwendung einer enzymatisch inaktiven Mutante einer Protease gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24 als Affinitätsmaterial in einem Verfahren zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von Spaltprodukten mindestens eines Enzyms, wobei mindestens ein Spaltprodukt der Protease und mindestens ein Spaltprodukt des Enzyms mindestens eine strukturelle Ähnlichkeit aufweisen.

28. Verwendung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Verwendung mindestens ein Merkmal gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15 aufweist.
29. Affinitätsmatrix zur Anreicherung, Isolierung und/oder Identifizierung von enzymatischen Spaltprodukten, umfassend eine immobilisierte, enzymatisch inaktive Mutante einer Protease unter Beibehalt der Substratspezifität gemäß einem der Ansprüche 16 bis 24.

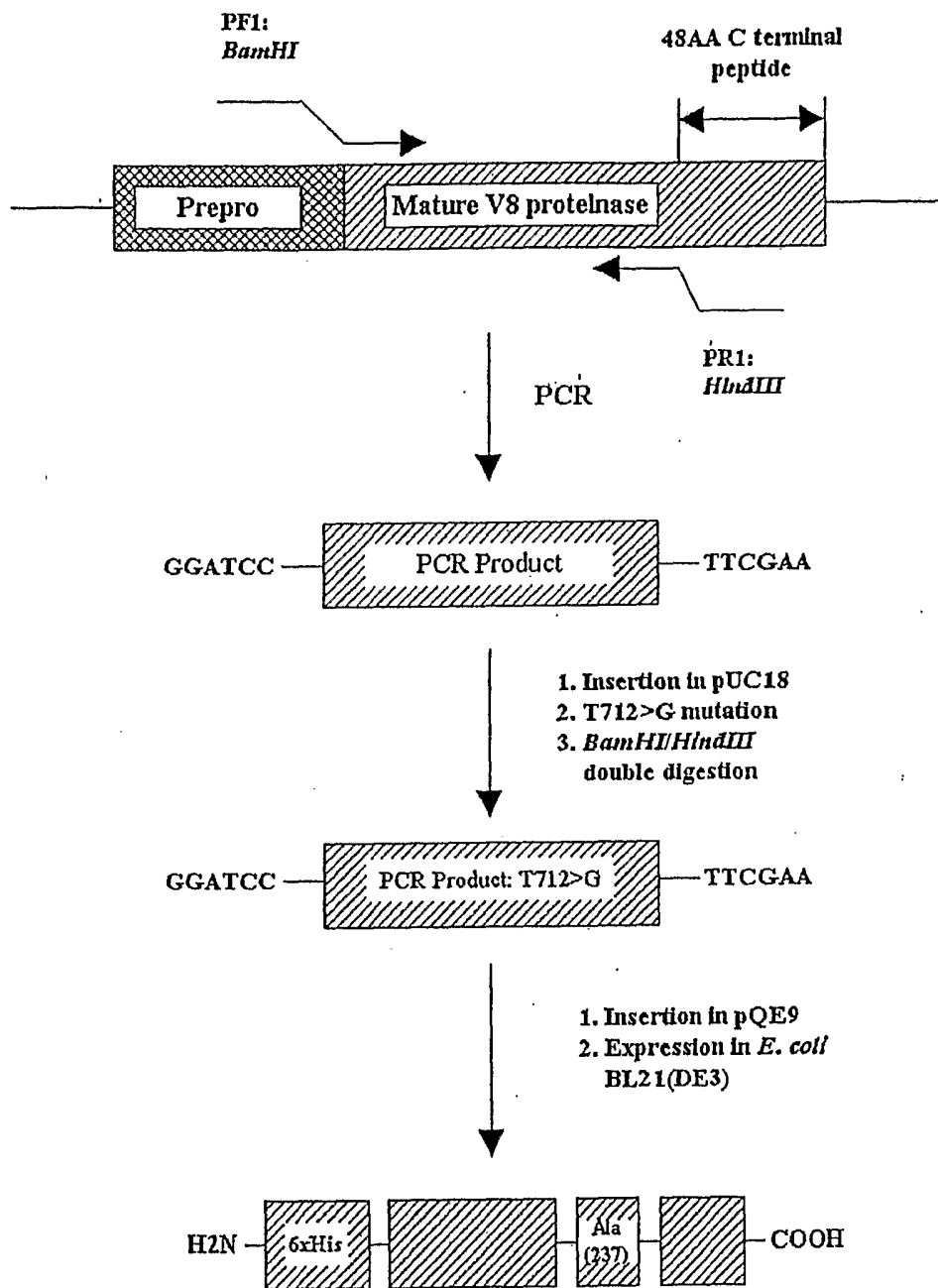


Fig. 1

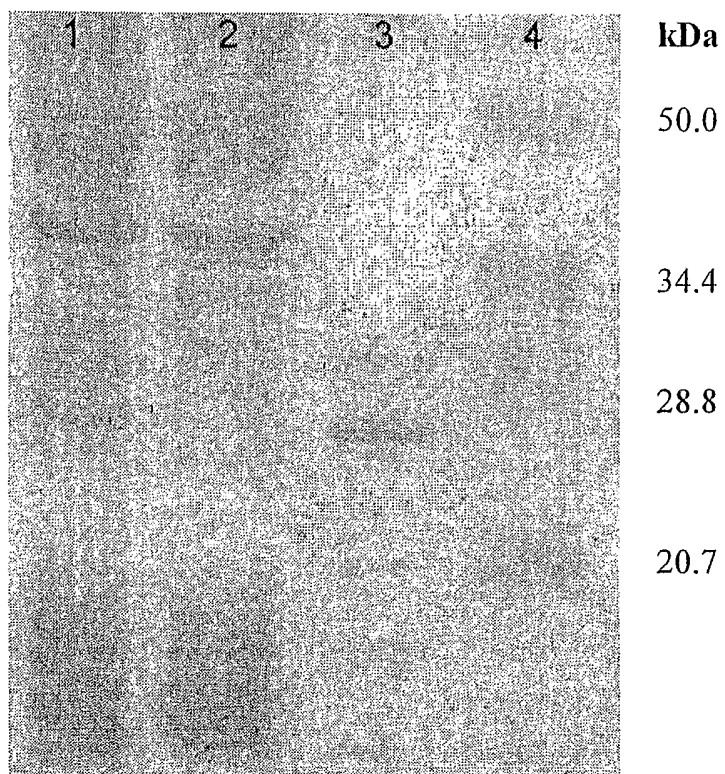


Fig. 2

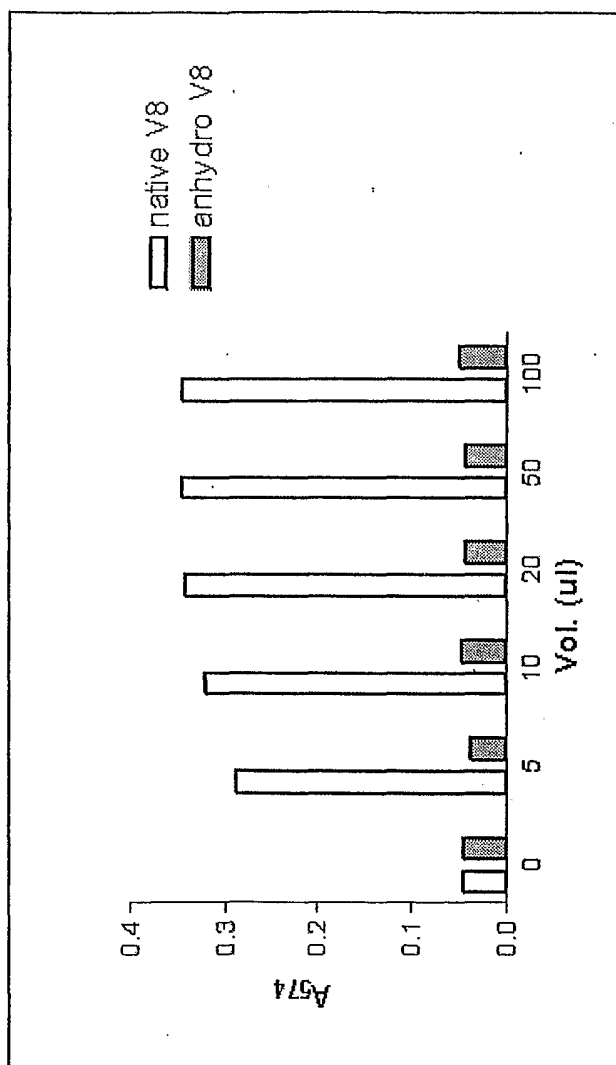


Fig. 3

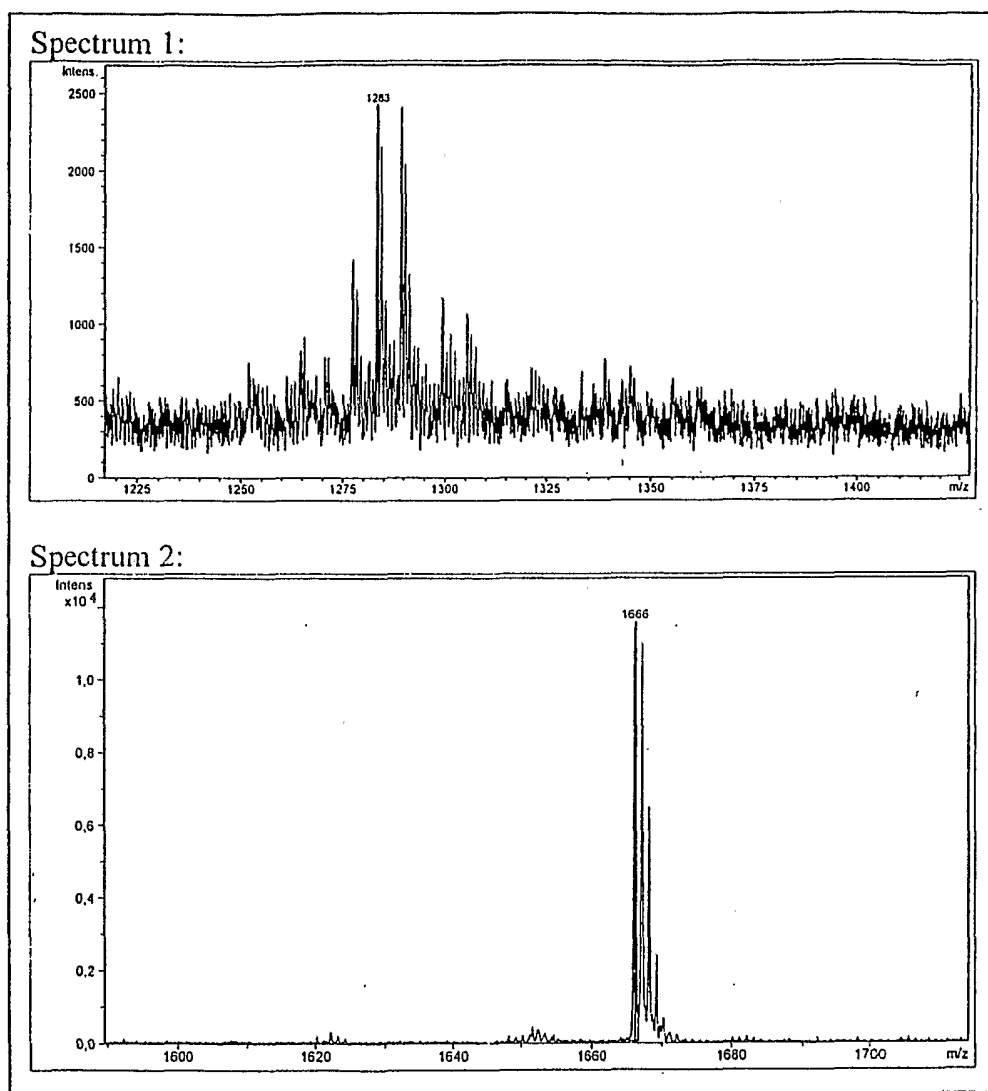
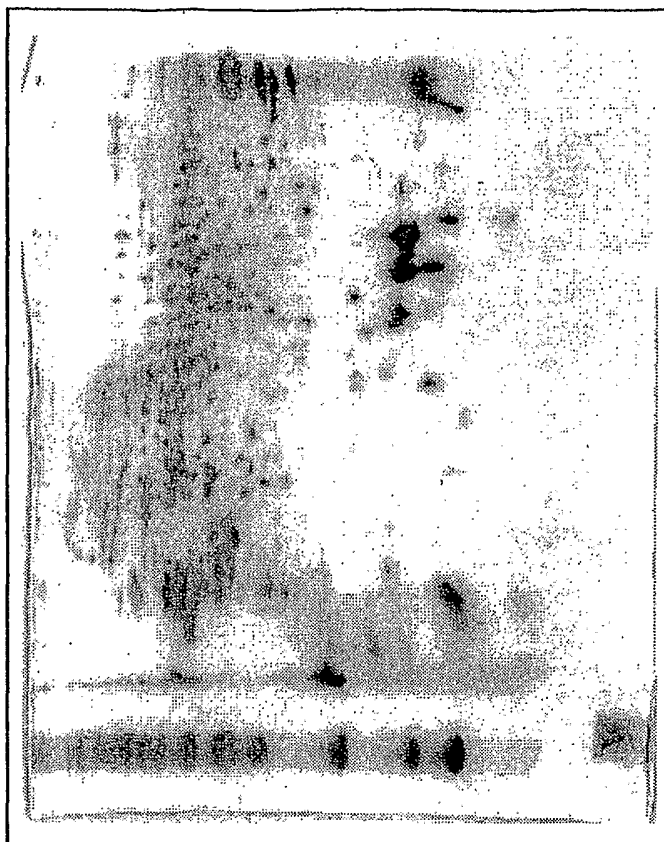


Fig. 4

Apoptose



Kontrolle

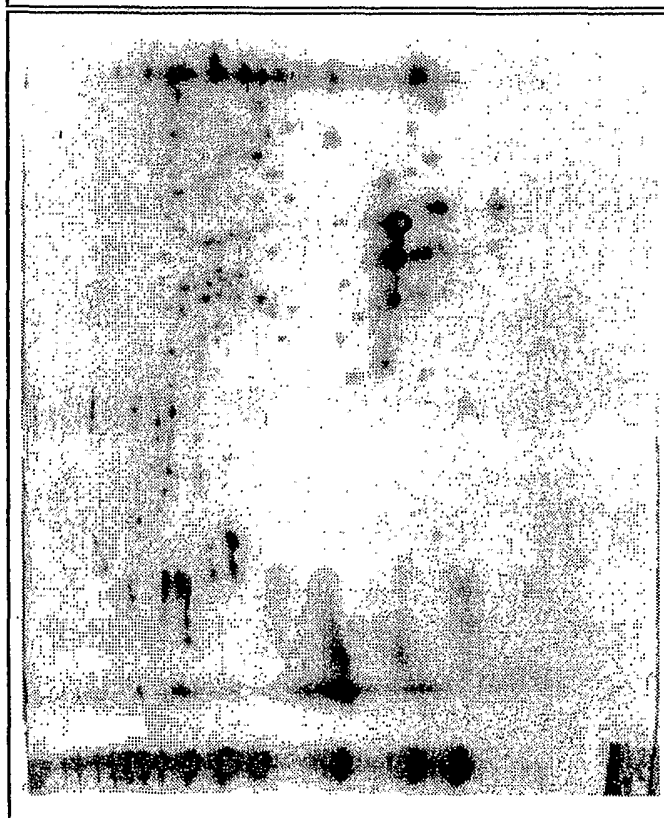


Fig. 5

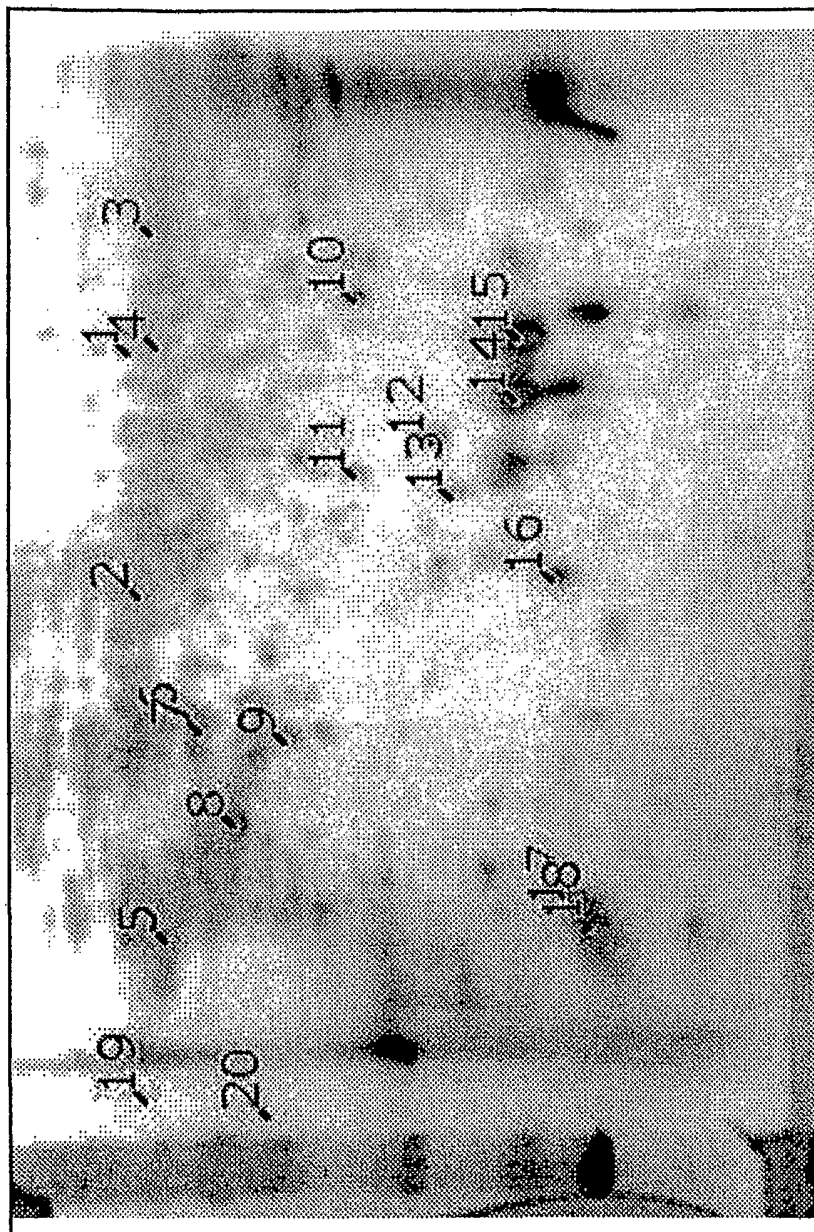


Fig. 6

Spot ID	Img	MW	pI	(x,y)	MS ID	AccNo	Protein	MW	Score
5	D157 / E05 / 5	1	0	0.0106,881	D157b / L08 / 1	gi 5174735	tubulin, beta, 2 [Homo sapiens]	50255	247
8	D157 / E08 / 8	1	0	0.0144,902	D157a / L05 / 1	gi 49868	put. beta-actin (aa 27-375) [Mus musculus]	39446	68
16	D157 / F04 / 16	1	0	0.0222,1008	D157b / K09 / 4	gi 1709242	Nucleoside diphosphate kinase NBR-A (NDK NBR-A) (NDP kinase NBR-A)	17364	78
3	D157 / D11 / 3	2	0	0.0722,917	D157b / M02 / 1	gi 809561	gamma-actin [Mus musculus]	41335	94

Fig. 7

A) Aminosäuresequenz der 6 x His-Ser237Ala V8Δ48-Mutante:

MRGSHHHHHHGSVILPNNDRHQITDITNGHYAPVTYIQVEAPTGTFIASGVVVVGKDT
 LLTNKHVVDATHGDPHALKAFPSAINQDNYPNGGFTAQITKYSGEDLAIVKFSPN
 EQNKHIGEVVKPATMSNNAETQVNQNITVTGYPGDKPVATMWESK GKITYLKGEA
 MQYDLSTTGGNA^uGSPVFNEKNEVIGIHWGGVPNEFN GAVFINENVRNFLKQNIEDIHF
 ANDDQKLN

B) Kodierende Nukleotidsequenz inklusiv 6 x His-Linker und Stop-Codon aus dem Vektor pQE9:

atgagaggatcgcacaccatcaccatcacggatccggttatattaccgaataacgatcgtcaccaaatcacagat
 acaacgaatggtcattatgcacccgtaacttatattcaagttgaagcacctactggtacatttattgcttccggt
 gtagttgtaggtaaagatactcttttaacaaataaacacgctcgtagatgctacgcacggatgatcctcatgcttta
 aaagcattcccttctgcaattaaccaagacaattatccaaatgggtggtttcactgctgaacaaatcactaaatat
 tcaggcgaaggtagtttagcaatagttaaattctcccctaatgagcaaaaacaaacatatgggtgaagtagttaaa
 ccagcaacaatgagtaataatgctgaaacacaagttaacccaaatattactgtaacaggatatacctgggtgataaa
 cctgtagcaacaatgtgggaaagtaaaggaaaaatcacttacctcaaaggcgaagctatgcaatatgatttaagt
 acaactgggtggtaacgcagggtcacctgtatttaataaaaaaatgaagtgatcggaattcattggggcgggtgta
 ccaaatgaatttaatgggtgcggtatttattaatgaaaatgtacgcaacttcttaaaacaaaatattgaagatatac
 cattttgccaacgatgacccaaaagccttaattaa

C) Nukleotidsequenz-Insert für die Klonierung in den Vektor pQE9:

ggatccggttatattaccgaataacgatcgtcaccaaatcacagatacaacgaatggtcattatgcacccgtaact
 tatattcaagttgaagcacctactggtacatttattgcttccggtgtagttgtaggtaaagatactcttttaaca
 aataaacacgctcgtagatgctacgcacggatgatcctcatgctttaaagcattcccttctgcaattaaccaagac
 aattatccaaatgggtggtttcactgctgaacaaatcactaaatattcaggcgaaggtagtttagcaatagttaaa
 ttctcccctaatgagcaaaaacaaacatatgggtgaagtagttaaacagcaacaatgagtaataatgctgaaaca
 caagttaacccaaatattactgtaacaggatatacctgggtgataaacctgtagcaacaatgtgggaaagtaaagga
 aaaatcacttacctcaaaggcgaagctatgcaatatgatttaagtacaactgggtggtaacgcagggtcacctgta
 ttttaataaaaaaatgaagtgatcggaattcattggggcgggtgtacccaaatgaatttaatgggtgcggtatttatt
 aatgaaaatgtacgcaacttcttaaaacaaaatattgaagatatacattttgccaacgatgacccaaaagcctt

Sequenzprotokoll

<110> ProteoSys AG

<120> Anreicherung von enzymatischen Spaltprodukten

<130> P 42 770 WO

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Ser Val Ile Leu Pro
1 5 10 15

Asn Asn Asp Arg His Gln Ile Thr Asp Thr Thr Asn Gly His Tyr Ala
20 25 30

Pro Val Thr Tyr Ile Gln Val Glu Ala Pro Thr Gly Thr Phe Ile Ala
35 40 45

Ser Gly Val Val Val Gly Lys Asp Thr Leu Leu Thr Asn Lys His Val
50 55 60

Val Asp Ala Thr His Gly Asp Pro His Ala Leu Lys Ala Phe Pro Ser
65 70 75 80

Ala Ile Asn Gln Asp Asn Tyr Pro Asn Gly Gly Phe Thr Ala Glu Gln
85 90 95

Ile Thr Lys Tyr Ser Gly Glu Gly Asp Leu Ala Ile Val Lys Phe Ser
100 105 110

Pro Asn Glu Gln Asn Lys His Ile Gly Glu Val Val Lys Pro Ala Thr
 115 120 125

Met Ser Asn Asn Ala Glu Thr Gln Val Asn Gln Asn Ile Thr Val Thr
 130 135 140

Gly Tyr Pro Gly Asp Lys Pro Val Ala Thr Met Trp Glu Ser Lys Gly
 145 150 155 160

Lys Ile Thr Tyr Leu Lys Gly Glu Ala Met Gln Tyr Asp Leu Ser Thr
 165 170 175

Thr Gly Gly Asn Ala Gly Ser Pro Val Phe Asn Glu Lys Asn Glu Val
 180 185 190

Ile Gly Ile His Trp Gly Gly Val Pro Asn Glu Phe Asn Gly Ala Val
 195 200 205

Phe Ile Asn Glu Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Gln Asn Ile Glu Asp
 210 215 220

Ile His Phe Ala Asn Asp Asp Gln Lys Leu Asn
 225 230 235

<210> 2

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2
 atgagaggat cgcacacacca tcaccatcac ggatccggtta tattaccgaa taacgatcgt 60
 caccaaatca cagatacaac gaatgggtcat tatgcacccg taacttatat tcaagttgaa 120
 gcacctactg gtacatttat tgcttccgggt gtagttgtag gtaaagatac tcttttaaca 180
 aataaacacg tcgtagatgc taogcacgggt gatcctcatg ctttaaaagc attcccttct 240
 gcaattaacc aagacaatta tccaaatggt ggtttcactg ctgaacaaat cactaaatat 300
 tcaggcgaag gtgatttagc aatagttaaa ttctccccta atgagcaaaa caacatatt 360
 ggtgaagtag ttaaaccagc aacaatgagt aataatgctg aaacacaagt taacccaaat 420
 attactgtaa caggatatcc tgggtgataaa cctgtagcaa caatgtggga aagtaaagga 480
 aaaatcactt acctcaaagg cgaagctatg caatatgatt taagtacaac tgggtggtaac 540
 gcaggttcac ctgtatttaa tgaaaaaat gaagtgatcg gaattcattg gggcgggtgta 600

ccaaatgaat ttaatgggtgc ggtatatttatt aatgaaaatg tacgcaactt cttaaacaac 660
aatattgaag atatccattt tgccaacgat gaccaaagc ttaattaa 708

<210> 3

<211> 672

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3

ggatccgtta tattaccgaa taacgatcgt caccaaatca cagatacaac gaatggcat 60
tatgcacccg taacttatat tcaagttgaa gcacctactg gtacatttat tgcttccggg 120
gtagttgtag gtaaagatac tcttttaaca aataaacacg tcgtagatgc tacgcacggg 180
gatcctcatg ctttaaaagc attcccttct gcaattaacc aagacaatta tccaaatggg 240
ggtttcactg ctgaacaaat cactaaatat tcaggcgaag gtgatttagc aatagttaaa 300
ttctccccta atgagcaaaa caaacatatt ggtgaagtag ttaaaccagc aacaatgagt 360
aataatgctg aaacacaagt taaccaaatt attactgtaa caggatatcc tggtgataaa 420
cctgtagcaa caatgtggga aagtaaagga aaaatcactt acctcaaagg cgaagctatg 480
caatatgatt taagtacaac tgggtgtaac gcaggttcac ctgtatttaa tgaaaaaat 540
gaagtgatcg gaattcattg gggcgggtgta ccaaatgaat ttaatgggtgc ggtatattt 600
aatgaaaatg tacgcaactt cttaaacaac aatattgaag atatccattt tgccaacgat 660
gaccaaagc tt 672

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> Klonierungsprimer-PF1

<222> (1) .. (30)

<223>

<400> 4

cgcggatccg ttatattacc aaataacgat

30

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> Klonierungsprimer-PR1

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 5

cccaagcttt tggcatcgt tggcaaatg g

31

<210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> Klonierungsprimer-PF2

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 6

agtacaactg gtggtaacgc aggttcacct gta

33

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> Klonierungsprimer-PR2

<222> (1)..(33)

<223>

<400> 7

tacagtgaa cctgcgttac caccagttgt act

33