



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 24 619 T2 2004.07.01**

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 914 614 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 24 619.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP97/02444**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 923 067.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/043649**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.05.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **20.11.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.05.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **03.09.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **01.07.2004**

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: **G01N 33/68**

**C07K 14/47, C07K 1/14, A61K 38/17,  
A61K 39/395**

(30) Unionspriorität:

**96107677 14.05.1996 EP**

(73) Patentinhaber:

**Winnacker, Ernst-Ludwig, Prof., 80636 München,  
DE**

(74) Vertreter:

**Vossius & Partner, 81675 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,  
LU, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**WINNACKER, Ernst-Ludwig, D-80638 München,  
DE; WEISS, Stefan, D-80799 München, DE;  
EDENHOFER, Frank, D-80339 München, DE;  
RIEGER, Roman, D-82362 Weilheim, DE**

(54) Bezeichnung: **CHAPERONE, DIE PRIONPROTEINE BINDEN UND ZWISCHEN DEN ISOFORMEN PRPC UND PRPSC UNTERSCHIEDEN KÖNNEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren für den Nachweis oder zur Isolierung von Prionproteinen unter Verwendung von spezifisch an diese Proteine bindenden Chaperonen. Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur in-vitro-Diagnose einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie und Arzneimittel vorzugsweise für die Prävention oder die Behandlung dieser Erkrankung.

[0002] Übertragbare spongiforme Enzephalopathien (TSEs) sind neurodegenerative Erkrankungen, wie Scrapie bei Schafen, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) bei Rindern und die Creutzfeldt-Jakob Krankheit (CJD) beim Menschen (34). Aus infizierten Gehirnen stammende infektiöse Präparationen sind sowohl gegen ultravioletter und ionisierender Bestrahlung, als auch gegenüber anderen, Nukleinsäuren inaktivierenden Verfahren resistent, was darauf hindeutet, dass Nukleinsäuren für die Infektiosität nicht erforderlich sein mögen. Die Reinigung von infektiösen Gehirnpräparationen zeigte die Anwesenheit eines für die Infektiosität benötigten Proteins (36). Diese experimentellen Beobachtungen führten zur „nur Protein“ Hypothese, die vorschlägt, dass proteinartige infektiöse Partikel („Prionen“) für die Übertragung von TSEs verantwortlich sind (3, 4, 36). Prionen bestehen hauptsächlich aus einem als PrP<sup>Sc</sup> (Prionprotein, „Sc“ für Scrapie) bezeichneten, Protease resistenten Protein, einer posttranslational modifizierten Form des Proteinase K-sensitiven, vom Wirt codierten PrP<sup>C</sup> („c“ für cellular) (8, 9, 11, 34). Beide Isoformen teilen die gleiche Aminosäuresequenz, aber unterscheiden sich in ihrer Sekundärstruktur (31, 42). Kreisförmige Zweifarben (CD)- und Fourier Infrarot-Umwandlungs (FTIR)-Spektroskopie zeigten einen signifikant höheren  $\beta$ -Faltblatt Gehalt für PrP<sup>Sc</sup> im Vergleich zu einem hohen  $\alpha$ -Helix Gehalt in PrP<sup>C</sup> (17, 31, 38). Strukturvorhersagen von PrP<sup>C</sup> führten zu einem Modell, dass vier Domänen zwischen den Aminosäureresten 109 bis 122, 129 bis 141, 178 bis 191 und 202 bis 218  $\alpha$ -Helices bilden (24). Es wurde angenommen, dass die Prionvermehrung die Umwandlung der  $\alpha$ -helikalen Domänen in PrP<sup>C</sup> in  $\beta$ -Faltblätter in PrP<sup>Sc</sup> umfasst (26, 30, 31). Die in vitro Umwandlung von PrP<sup>C</sup> in PrP<sup>Sc</sup> wurde unter Verwendung einer Proteinase K-Resistenz-Untersuchung gezeigt (28). Kürzlich wurde ein modifiziertes Modell vorgeschlagen, demzufolge PrP<sup>C</sup> teilweise entfaltet und der Führung eines oligomeren PrP<sup>Sc</sup> Keimes in PrP<sup>Sc</sup> rückgefaltet werden muss (29). Dieses Modell liefert Erklärungen für die Spezies-Barrieren bei Scrapie (27) und die Stamm-spezifischen Eigenschaften von Prionen (7). Außerdem führten Experimente unter der Verwendung von transgenen Mäusen zu dem Vorschlag, dass die Prionvermehrung ein Spezies-spezifisches, als „Protein X“ bezeichnetes Makromolekül erfordert (43).

[0003] Bisher existiert kein beschriebenes Verfahren, das den einfachen Nachweis oder die Isolierung

von natürlichen Prionproteinen ermöglicht. Die auf dem Fachgebiet beschriebene Isolierung von PrP<sup>C</sup> (31) ist zeitaufwendig, nicht wirkungsvoll und liefert nur minimale Proteinmengen. Die auf dem Fachgebiet beschriebene Isolierung von PrP<sup>Sc</sup> (31, 35, 64) ist ebenfalls zeitaufwendig und ineffektiv und die Reinheit von PrP<sup>Sc</sup> ist spekulativ. Außerdem ist es bislang nicht möglich, zwischen der cellulären Isoform PrP<sup>C</sup> und der Isoform PrP<sup>Sc</sup> oder PrP27-30 zu unterscheiden, was eine Vorbedingung für die Entwicklung einer einfachen und verlässlichen Untersuchung für die Diagnose einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie ist.

[0004] Tatzelt et al., PNAS USA 92 (1995), 2944–2984, untersucht Proteine, die bei der Umwandlung des cellulären Prionproteins (PrP<sup>C</sup>) in die Scrapie-Isoform (PrP<sup>Sc</sup>) bezeichnend sein könnten. Es wurde gefunden, dass in Scrapie-infizierten N2a Zellen die Expression und die subcelluläre Translokation von spezifischen Hitze-Schock-Proteinen verändert waren. Das Dokument offenbart jedoch nicht, dass Chaperone, wie die Hitze-Schock-Proteine, spezifisch an Prionproteine binden und deshalb verwendet werden können, um Prionproteine nachzuweisen oder zu isolieren.

[0005] Das der vorliegenden Erfindung zugrunde liegende technische Problem ist deshalb ein einfaches Verfahren für die effektive Isolierung von Prionproteinen und den Nachweis dieser Proteine bereit zu stellen, vorzugsweise in einer An und Weise, die eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Isoformen von PrP erlaubt.

[0006] Die Lösung dieses technischen Problems wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen beschriebenen Ausführungsformen erreicht.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft deshalb ein Verfahren zum Nachweis eines Prionproteins, umfassend die Schritte:

- a) Inkontaktbringen einer Probe, die vermutlich ein Prionprotein enthält, mit einem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann; und
- b) Bestimmen, ob ein Prionprotein an das Chaperon bindet.

[0008] Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Isolierung eines Prionproteins, umfassend die Schritte:

- a) Inkontaktbringen einer Probe, die ein Prionprotein enthält, mit einem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann; und
- b) Isolieren des an das Chaperon gebundenen Proteins von dem Chaperon.

[0009] Bei der Durchführung von Experimenten, um Proteine zu identifizieren, die fähig sind mit PrP<sup>C</sup> zu interagieren, wurde überraschend gefunden, dass Chaperone fähig sind, spezifisch an Prionproteine zu binden. Die Spezifität der beobachteten in vivo Wechselwirkungen wurde durch in vitro-Bindungsstudien unter der Verwendung von rekombinanten

Prionproteinen bestätigt. Die Kartierung der Stelle der Wechselwirkung zwischen den molekularen Chaperone und PrP<sup>c</sup> wurde unter der Verwendung von rekombinanten Prion-GST-Fusionspeptiden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein GST-PrP<sup>c</sup>-Fusionsprotein spezifisch an Hsp60 sowohl in einer *S. cerevisiae* Umgebung, als auch in vitro bindet. Die Hsp60 Familie ist eine der am besten charakterisierten Mitglieder der molekularen Chaperone, die das ATP-abhängige Falten von Polypeptid-Ketten vermitteln (13, 18, 22, 23) und die unter Prokaryonten und Säugetieren weit verbreitet und konserviert sind. Vom menschlichen Hsp60 (544 Aminosäuren) wird vorgeschlagen, dass es tetradekamer Komplexe in vivo bildet, wie sich in der kristallinen Struktur des prokaryotischen homologen Teils GroEL zeigt (10). Die durch eine zwei-Hybrid-Überprüfung in *S. cerevisiae* isolierten cDNAs (15, 19, 21), codieren N-terminal verkürzte Proteine von 399, 317 und 246 Aminosäuren Länge, die mindestens zum Teil die apikale Domäne des Hsp60 Monomers umfassen. Diese apikale Domäne enthält mehrere Aminosäurereste, die spezifisch im Fall von GroEL die Peptidbindung vermitteln (14). Die Spezifität der PrP<sup>c</sup>/Hsp60-Wechselwirkung in vivo wurde sowohl durch die Verwendung der „falschen Lockmittel (bait)“ LexA-Bicoid und LexA-NFI/CTF2, als auch durch authentisches LexA und LexA-GST bekräftigt. Die Wechselwirkung wurde in vitro sowohl durch die Verwendung von rekombinantem GST-PrP<sup>c</sup> und rekombinantem Hsp60 voller Länge, als auch GroEL bekräftigt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die PrP<sup>c</sup>/Hsp60-Wechselwirkung keine zusätzlichen Faktoren einbezieht und dass daher Chaperone für den Nachweis und die Isolierung von Prionproteinen verwendet werden können. Das rekombinante rPrP27-30 (47) stellt die Proteinase K-sensitive Isoform des Proteinase K-resistenten, aus Scrapie-Präparationen isolierten, Kerns PrP27-30 dar. Die Ergebnisse der in vitro Wechselwirkung zwischen rPrP27-30 und Hsp60 enthüllen, dass die Kernregion von PrP (Aminosäuren 90 bis 231) ausreichend für die Bindung an Hsp60 ist.

[0010] Die Identifizierung der Stelle der Wechselwirkung zwischen Aminosäure 180 und Aminosäure 210 durch die Kartierung von PrP<sup>c</sup>-Peptiden zeigte, dass die Bindung von Hsp60 an PrP<sup>c</sup> sich innerhalb eines hoch konservierten Bereichs des Prionproteins, der die Aminosäuren 180, 198, 200 und 210 enthält, ereignet. Mutationen dieser Reste menden mit erbten Prionerkrankungen im Menschen (33). Außerdem enthält das Chaperon-bindende Fragment GST::P180-210 zumindest teilweise die zwei mutmaßlichen  $\alpha$ -helikalen Domänen H3 (Aminosäuren 178 bis 191) und H4 (Aminosäuren 202 bis 218) (24). Die Umwandlung von  $\alpha$ -helikalen Bereichen in  $\beta$ -Faltblätter von PrP wurde als verantwortlich für die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung erachtet. Es gibt mehrere Möglichkeiten, die auf eine mögliche physiologische Bedeutung der Hsp60/PrP-Wechselwirkung schließen lassen. (i) Hsp60 könnte an der Verbreitung von PrP<sup>Sc</sup> beteiligt

sein, wie für die Wechselwirkung des Prion-ähnlichen Faktors [psi<sup>+</sup>] von Hefe mit dem molekularen Chaperon Hsp104 gezeigt werden ist (12, 50). Basierend auf Untersuchungen mit transgenen Mäusen wurde kürzlich vermutet, dass ein Spezies-spezifisches, als „Protein X“ bezeichnetes Makromolekül an der Prionbildung beteiligt ist (43). Von Protein X wurde vorgeschlagen, als ein molekulares Chaperon zu fungieren, das die Umwandlung von PrP-Isoformen erleichtert. Dieser unbekannte Faktor „X“ könnte tatsächlich Hsp60 sein. (ii) Alternativ könnte Hsp60 die Anhäufung von PrP<sup>c</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>-Amyloiden z. B. durch das Abfangen von falsch gefalteten Formen von PrP<sup>c</sup> verhindern.

[0011] Neuere Daten legen nahe, dass sogenannte „chemische Chaperone“ wie Glycerin, Trimethylamin N-Oxid (TMAO) und Dimethylsulfoxid (DMSO) die PrP<sup>Sc</sup>-Bildung durch Stabilisierung der  $\alpha$ -helikalen Umwandlung von PrP<sup>c</sup> beeinträchtigen (67).

[0012] Der Nachweis oder die Isolierung von Prionproteinen durch die Verfahren der Erfindung betrifft rekombinant hergestellte Prionproteine oder Prionproteine aus natürlichen Quellen. Prionproteine können aus natürlichen Quellen z. B. durch das in (31, 64) beschriebene Verfahren extrahiert werden; anfassend das Suspendieren von Gewebe in Sukrose, das Homogenisieren und die Klärung durch Zentrifugation.

[0013] Das Inkontaktbringen einer Probe, die vermutlich ein Prionprotein enthält, mit einem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann, kann nach bekannten Verfahren durchgeführt werden, z. B. mit dem in Lösung befindlichen oder z. B. auf einer Matrix wie einem Gel oder einem Chromatographie-Harz, immobilisierten Chaperon (66).

[0014] Das Inkontaktbringen der Probe mit dem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann, kann auch wie in den nachstehenden Beispielen beschrieben durchgeführt werden.

[0015] Geeignete Chaperone, die spezifisch an Prionproteine binden, können unter anderem durch den Fachmann durch die Untersuchung der Bindung eines besonderen Chaperons an Prionproteine, wie in den nachstehend Beispielen beschrieben, bestimmt werden.

[0016] In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung, wird ein Fragment, Analog oder Derivat dieses Chaperons verwendet, dass noch fähig ist, an das Prionprotein zu binden.

[0017] Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „Derivat“ auf solche Abkömmlinge, die von den funktionellen Gruppen, die an Seitenketten an den Resten oder den N- oder C-terminalen Gruppen vorkommen, durch auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren hergestellt werden können.

[0018] Der Begriff „Fragment“ betrifft jedes Fragment des Chaperons, das noch die Fähigkeit besitzt, mit dem Prionprotein Wechselzuwirken und solch ein Fragment kann durch den Fachmann durch bekannte Techniken hergestellt werden.

[0019] In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, ist das in dem Verfahren zum Nachweis und/oder der Isolierung eines Prionproteins verwendete Chaperon Hsp60 oder GroEL.

[0020] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Chaperon ein rekombinantes Protein, d. h. das Chaperon wird durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt, nämlich durch die Expression einer clonierten DNA-Sequenz.

[0021] In einer noch weiter bevorzugten Ausführungsform ist das Chaperon Teil eines Fusionsproteins, das neben dem Chaperon ein Protein oder vorzugsweise eine Proteindomäne beinhaltet, die dem Fusionsprotein eine spezifische Bindungskapazität verleiht. Das rekombinante Chaperon wird bevorzugt mit Glutathion-S-Transferase fusioniert.

[0022] Jedes Prionprotein, Isoform, Fragment oder Derivat eines solchen Prionproteins oder Gemische von diesen Substanzen können durch das Verfahren der Erfindung nachgewiesen oder isoliert werden, solange es fähig ist, durch das Chaperon gebunden zu werden. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das nachzuweisende oder zu isolierende Prionprotein das Prionprotein PrP<sup>c</sup> und/oder eine Isoform von PrP<sup>c</sup>. Die Prionprotein Isoform ist bevorzugt die Isoform PrP<sup>Sc</sup> oder ein Fragment oder Derivat davon.

[0023] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist das Prionprotein die prozessierte Form PrP<sup>c</sup>23-231, die die Aminosäuren 23 bis 231 von PrP<sup>Sc</sup> enthält und/oder die Isoform PrP<sup>Sc</sup> ist das N-terminal verkürzte Derivat PrP27-30 oder ein Fragment davon.

[0024] Wie bereits vorstehend dargestellt, kann sich das Chaperon für die Bestimmung, ob ein Prionprotein an ein Chaperon gebunden wurde, in Lösung befinden oder mit einer festen Phase verbunden sein.

[0025] Nach Inkubation beider Teilnehmer in Lösung, kann die Wechselwirkung durch Co-Immunopräzipitation (51), gefolgt von einem Western-Blot (44) unter Verwendung eines PrP spezifischen Antikörpers, wie z. B. in (20) beschrieben, einem Chaperon-spezifischen Antikörper oder einem Antikörper, der gegen eine der Markierungen gerichtet ist, d. h. GST-Antikörper, FLAG-Antikörper, BTag-Antikörper, Antikörper gerichtet gegen das Calmodulin bindende Protein, das S-Peptid, das Maltose-bindende Protein, Oligohistidin und das grüne Fluoreszenzprotein (GFP). Außerdem kann die Wechselwirkung z. B. durch (i) die Verwendung von kreuzvernetzenden Reagenzien wie Dimethylsuberimidat nachgewiesen werden (52), (ii) durch Affinitätschromatographie (66) durch Zugabe des immobilisierten, gegen eine der Markierungen gerichteten Liganden, der mit einem der beiden Partner fusioniert ist (kreuzweise Wechselwirkungen); oder (iii) durch die Analyse des Komplexes durch ein nicht denaturierendes Polyacrylamid-Gel (53) oder durch Größen-Ausschluß-Chromatographie, meist HPLC/FPLC (54).

[0026] In einer bevorzugten Ausführungsform, liegt das Chaperon in Lösung vor und ist nachweisbar

markiert. Der Fachmann wird geeignete Markierungen kennen oder wird in der Lage sein, solche Markierungen unter der Verwendung von Routineexperimenten zu ermitteln. Vorzugsweise ist die nachweisbare Markierung aus einem Radioisotop, einer fluoreszierenden Verbindung, einem kolloidalen Metall, einer Chemolumineszenzverbindung, einer Biolumineszenzverbindung, einer phosphoreszierenden Verbindung oder einem Enzym ausgewählt.

[0027] Alternativ ist das Chaperon für den Nachweis und/oder die Isolierung eines Prionproteins an eine feste Phase gebunden. Geeignete Stoffe sind dem Fachmann bekannt und schließen z. B. ein Gel oder ein Harz (Sephrose, Agarose, Nitrocellulose, Dynabeads, Polystyrol etc.) ein.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die feste Phase eine Glutathion enthaltende Matrix, wie Glutathion-Sephrose. Die Proteindomäne, die für das Binden des Chaperons an eine Matrix verwendet wird, kann auch ein Oligohistidin (55), Calmodulin bindendes Peptid (CBP) (56), S-Peptid (Ribonuklease A) (57), FLAG (58), grün fluoreszierendes Protein (GFP; 65), BTag (59) oder Maltose-bindendes-Protein (MBP; 61) sein. Das markierte Chaperon kann an Glutathion, IMAC-Ni<sup>2+</sup>, Calmodulin, S-Protein 104 As (57), Anti-FLAG-Antikörper, Anti GFP-Antikörper, BTag-Antikörper (59) oder Maltose (60) immobilisiert werden.

[0029] Alternativ kann das Koppeln des Chaperons selbst durch ein Fusionsprotein mittels Thiol-Gruppen nicht oxidierten Cysteine oder, im anderen Falle mittels freiem Lysin oder  $\alpha$ -Aminogruppen an Cyanbromid-Agarose oder  $\alpha$ -Hydroxy-Succinimid aktivierter Agarose durchgeführt werden (63).

[0030] Hinsichtlich der Wechselwirkung des Prionproteins mit Chaperonen, wobei eine der Verbindungen immobilisiert ist, kann die Wechselwirkung durch IASYS (FISONS) bestimmt werden. Protein-Protein-Wechselwirkungen können durch Biosensoren nachgewiesen und gemessen werden, die den verschwindenden Bereich von biomolekularer Masse der Probe und Konzentration nahe der Probenoberfläche verwenden. Alternativ kann solch eine Wechselwirkung durch Western-Blot/Affinitäts Blot (62) bestimmt werden: das Prionprotein, entweder markiert, oder nicht markiert, wird auf eine Membran wie Nitrocellulose oder PVDF übertragen. Der andere Wechselwirkungspartner, entweder das markierte/nicht markierte Prionprotein oder das markierte/nicht markierte Chaperon in Lösung, wird mit der Protein-assoziierten Membran inkubiert. Die Wechselwirkung wird durch Zugabe eines gegen das Protein selbst in Lösung oder gegen das mit dem Protein fusionierten Marker gerichteten Antikörpers bekräftigt (62).

[0031] In einer noch weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung für die Isolierung von Prionproteinen, ist das Chaperon Teil einer Matrix, die innerhalb einer Affinitätschromatographie-Säule (63, 66) und Schritts (b) enthalten ist in einer Weise modifiziert ist, dass

- i) die Probe, die vermutlich das Prionprotein enthält durch die Säule geleitet wird,
- ii) das Prionprotein nach dem Waschen von der Säule wahlweise durch eine Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke eluiert und gesammelt wird; und
- iii) das gesammelte Prionprotein wahlweise weiter gereinigt wird.

[0032] Durch diese Art der Affinitätschromatographie, die z. B. in (55, 63, 66) beschrieben ist, werden in der Prionprotein-Prägaration enthaltene Unreinheiten durch die Säule geleitet. Das (die) Prionprotein(e) wird durch das Chaperon an die Säule gebunden werden. Geeignete Bedingungen, die das spezifische Binden des Prionproteins an die Säule erlauben und für das Eluieren des Prionproteins von dem Gel können durch den Fachmann bestimmt werden und werden z. B. in (47, 48) beschrieben.

[0033] In einer alternativen Ausführungsform wird die Isolierung des Prionproteins als Mengenverfahren gemäß Standardverfahren oder z. B. unter Verwendung einer modifizierten Version des in den Beispielen nachstehend beschriebenen Verfahrens durchgeführt, worin statt des Prionproteins das Chaperon an Glutathion-Sepharose Beads befestigt ist, z. B. Glutathion-Sepharose 4B Beads.

[0034] Gemäß dem Verfahren der Erfindung isolierte und gereinigte Prionproteine können z. B. als Immunogen zur Hervorrufung von Antikörpern, als aktiver Bestandteil von Arzneimitteln oder für die Entwicklung von diagnostischen Tests, wie ELISA verwendet werden.

[0035] Die Probe kann aus verschiedenen Organen erhalten werden, vorzugsweise aus Gewebe, z. B. Gehirn, Darm, Großhirnrinde, Dura mater, Purkinje-Zellen, Lymphknoten, Nervenzellen, Milz, Mandeln, Muskelzellen, Plazenta, Pankreas-Augen, Rückenmark oder Peyersche Plaques oder aus einer Körperflüssigkeit, vorzugsweise aus Blut, Spinalflüssigkeit, Samen oder Milch.

[0036] Wie aus den Ergebnissen, die in Beispiel 6 vorgelegt werden offensichtlich ist, ist die Bindung des Chaperons GroEl an rPr27-30 stärker, verglichen zu PrP<sup>c</sup> (vgl. Spur 3 von **Fig. 2B** versus Spur 2 von **Fig. 2C**). Diese Ergebnisse wurden durch weitere Titrationsversuche mit GroEl und Hsp60 (Daten nicht gezeigt) bekräftigt. Daher erlaubt die Bestimmung der Bindungsstärke eines Chaperons mit dem Prionprotein in einer Probe durch deren Vergleich mit der Bindungsstärke des gleichen Chaperons mit PrP<sup>Sc</sup> (oder rPr27-30) und PrP<sup>c</sup>-Standards die Ermittlung, ob ein Prionprotein, das auf eine übertragbare spongiforme Enzephalopathie (TSE) hinweist, in einer Probe enthalten ist.

[0037] Folglich betrifft eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ein Verfahren für die in-vitro-Diagnostik einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie, worin Schritt (b) in einer Art und Weise modifiziert ist, dass die Unterschiede in der

Bindung des Chaperons an PrP<sup>c</sup> und an die Isoform von PrP<sup>c</sup>, beziehungsweise bevorzugt PrP<sup>Sc</sup> verwendet werden, um zu bestimmen, ob eine Isoform von PrP<sup>c</sup> in der Probe vorliegt oder nicht.

[0038] Die vorliegende Erfindung stellt darüber hinaus einen Komplex des Chaperons und eines Prionproteins bereit.

[0039] Seit von z. B. Chaperonen, wie Hsp60 angenommen wurde, dass sie fähig sind, die Aggregation von PrP<sup>c</sup> an PrP<sup>Sc</sup> zu verhindern, könnte es möglich sein, die Umwandlung von der Isoform PrP<sup>c</sup> in die Prion-assoziierte Isoform PrP<sup>Sc</sup> durch die Verabreichung solcher Chaperone, die spezifisch Prionproteine binden, zu blockieren und so eine übertragbare spongiforme Enzephalopathie zu verhindern oder zu behandeln.

[0040] Andererseits könnte es möglich sein, dass Chaperons an der Umwandlung von PrP<sup>c</sup> in PrP<sup>Sc</sup> beteiligt sind. Deshalb könnte die Blockierung solcher einer Umwandlung durch die Verabreichung von Agenzien, die spezifisch solche Chaperons inaktivieren, die spezifisch mit Prionproteinen Wechselwirken, ebenfalls hilfreich für die Behandlung oder die Prävention von übertragbaren spongiformen Enzephalopathien sein. Solche Substanzen können vom Fachmann durch Routine-Experimente ausgewählt werden und schließen Liganden ein, die an das Chaperon binden und somit die Wechselwirkung des Chaperons mit dem Prionprotein verhindern. Beispiele solcher Liganden sind Antikörper, bevorzugt monoklonale Antikörper oder ein Fragment eines Proteins mit einer Domäne, die für die Bindung an das Chaperon verantwortlich ist, z. B. eine Fragment von PrP<sup>c</sup>, das die Aminosäuren 180 bis 210 enthält.

[0041] Folglich betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung eines Chaperons, wie oben definiert, oder einer Substanz, die dieses Chaperon inaktiviert, bevorzugt einen Antikörper, wobei ein monoklonaler Antikörper sogar mehr bevorzugt wird, für die Präparation eines Medikamentes für die Prävention oder die Behandlung von übertragbarer spongiformer Enzephalopathie.

[0042] In einer bevorzugten Anwendung handelt es sich bei dieser übertragbaren spongiformen Enzephalopathie um Scrapie, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Creutzfeldt-Jacob-Erkrankung (CJD), Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom (GSS), Kuru, fatale familiäre Insomnie (FFI) oder übertragbare Mink-Enzephalopathie (TME).

**Fig. 1:** Identifizierung der PrP<sup>c</sup>23-231/Hsp64-Wechselwirkung unter Verwendung des zwei-Hybrid-Systems.

[0043] Zwei verschiedene Phänotypen bekräftigen diese Wechselwirkung. Hefezellen, die das Reporter-Plasmid pSH18-34 enthalten, wurden mit dem das pJG4-5 Plasmid tragenden, Hsp60 (Aminosäuren 146–544) codierenden c-DNA-Clon und den Köder-Plasmiden pSH2-1 (Reihe 1), pSH2-1-GST (Rei-

he 2), pSH2-1-GST-PrP<sup>c</sup> (Reihe 3), pSH2-1-NFI/CTF2 (Reihe 4) (49), pEG202-Bicoid (Reihe 5) (21) und pSH2-1-PrP<sup>c</sup>-GST (Reihe 6) co-transformiert. Je fünf Transformanten wurden in TE resuspendiert, auf Galaktoseplatten, denen entweder X-Gal (A) zugesetzt war oder die Leucin-defizient waren (B) und bei 30°C für 5 Tage inkubiert.

**Fig. 2:** Immunoblot-Analyse von „pull-down“-Untersuchungen, um die in vitro Wechselwirkung von Hsp60 und GroEL in der Anwesenheit von mit GST fusioniertem PrP zu zeigen.

[0044] Die Zahlen auf der linken Seite geben die Größe in kDa an. (A) rekombinantes GST (1 mg), sowohl GST-rPrP27-30 (2 mg), als auch GST-PrP<sup>c</sup> (2 mg), an Glutathion-Sepharose immobilisiert, wurden mit 10 mg Hsp60 inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Beads gewaschen und in Probenpuffer resuspendiert. Je 4 ml GST-PrP<sup>c</sup> (Spur 2), sowohl GST-rPrP27-30 (Spur 3) und GST (Spur 4), als auch 200 ng Hsp60 als Kontrolle (Spur 1) wurden mittels SDS-PAGE (12,5%) und Immunoblot (PVDF) unter Verwendung eines monoklonalen Maus anti-Hsp60 Antikörpers und Nachweis durch Chemolumineszenz (B) analysiert. Sowohl rekombinantes GST (1 mg) und GST-PrP<sup>c</sup> (2 mg), an Glutathion-Sepharose immobilisiert, als auch Glutathion-Sepharose allein wurden mit 25 mg GroEL inkubiert. Nach dem Waschen, wurden die Beads in Probenpuffer resuspendiert, je 4 ml einer 1 : 1 Aufschlammung von Beads (Spur 2), sowohl GST-PrP<sup>c</sup> (Spur 3) und GST (Spur 4), als auch 2 mg GroEL als Kontrolle (Spur 1) auf einem 12,5% SDS-Gel analysiert und auf eine NC-Membran übertragen. Der Proteinnachweis wurde unter Verwendung eines anti-GroEL Antikörpers und Chemolumineszenz durchgeführt. (C) Sowohl rekombinantes GST (1 mg), als auch, an Glutathion-Sepharose immobilisiertes GST-rPrP27-30 (2 mg) wurden mit 25 mg GroEL inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Beads in Probenpuffer resuspendiert. Je 4 ml sowohl GST-rPrP27-30 (Spur 2) und GST (Spur 3), als auch 1 mg GroEL als Kontrolle (Spur 1) wurden durch SDS-PAGE und Immunoblot unter Verwendung eines anti-GroEL Antikörpers und Chemolumineszenz analysiert.

**Fig. 3:** Kartierung der Stelle der PrP<sup>c</sup>/GroEL-Wechselwirkung unter Verwendung von PrP<sup>c</sup> als Fusionen mit GST.

[0045] Es wurden sechs Fragmente von PrP<sup>c</sup> auf der Basis von biochemischen Vorhersagen, wie Hydrophilizität, Antigenizität, und Sekundärstrukturen, entworfen; sie stellen die Aminosäuren 23 bis 52, die Aminosäuren 53 bis 93, die Aminosäuren 90 bis 109, die Aminosäuren 129 bis 175, die Aminosäuren 180 bis 210 und die Aminosäuren 218 bis 231 (48) dar. (B) Kartierungsanalyse der Stelle der PrP/Hsp60-Wechselwirkung unter der Verwendung

der sechs GST fusionierten PrP Fragmente. Je 2 mg der Fragmente, gebunden an Glutathion-Sepharose wurden mit 10 mg Hsp60 inkubiert. Die Beads wurden gewaschen und in Probenpuffer resuspendiert. Je 4 ml jedes Fragmentes GST::P23-52 (Spur 1), GST::P53-93 (Spur 2), GST::P90-109 (Spur 3), GST::P129-175 (Spur 4), GST::P218-231 (Spur 5) und GST::P180-210 (Spur 6) wurden auf einem, 12,5% SDS-Gel analysiert und auf eine PVDF-Membran übertragen, gefolgt von einer Entwicklung unter Verwendung eines anti-Hsp60 Antikörpers und Chemolumineszenz. (C) Kartierungsanalyse der Stelle der PrP/GroEL-Wechselwirkung. 2 mg jeden an Glutathion-Sepharose gebundenen Fragmentes wurden mit 10 mg GroEL inkubiert. Die Beads wurden gewaschen und in Probenpuffer resuspendiert. 4 ml jeden Fragmentes GST::P23-52 (Spur 1), GST::P53-93 (Spur 2), GST::P90-109 (Spur 3), GST::P129-175 (Spur 4), GST::P218-231 (Spur 5) und GST::P180-210 (Spur 6) wurden auf einem 12,5% SDS-Gel analysiert und übertragen (PVDF), GroEL wurde durch Chemolumineszenz unter Verwendung eines anti-GroEL Antikörpers nachgewiesen.

**Fig. 4:** Co-Expression von PLAG-markierten Hsp60 und GST-markierten Prionproteinen vom syrischen Goldhamster im Baculovirus System

[0046] Zell-Lysate wurden auf einem 12,5% SDS Gel analysiert. Eine Western-Blot-Analyse unter Verwendung eines anti-Hsp60 Antikörpers (Sigma Katalog # H 4149) zeigt verminderte Spiegel von FLAG::Hsp60 bei Co-Expression mit GST::haPrP<sup>c</sup>23-231 (Spur 3) und GST::haPrP<sup>c</sup>90-231 (Spur 4) verglichen mit FLAG::Hsp60 Expression (Spur 1) und Co-Expression von GST-Kontrolle (Spur 2).

[0047] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung:

#### Beispiel 1: Konstruktion von Vektoren

[0048] Konstruktion von Hefevektoren. Die Clonierungsverfahren wurden wie vorher beschrieben durchgeführt, es sei denn, es ist anderweitig angegeben (40). Die Shuttle-Vektoren pSH2-1 und pEG202, die die Synthese von verschiedenen LexA-Hybriden (Aminosäuren 1-87 und Aminosäuren 1-202) (19, 21) lenken, wurden verwendet, um die LexA Fusion-„Köder“ zu konstruieren.

- i) Konstruktion von pSH2-1/pEG202-GST. Ein 666 Bp DNA-Fragment, das die Glutathion S-Transferase (GST) codiert, wurde durch PCR (39) vom cDNA-Clon pAcSG2T::PrP<sup>c</sup>23-231 amplifiziert (48). Das Fragment wurde in die Plasmide pSH2-1 und pEG202 unter Verwendung der EcoRI/BamHI-Restriktionsstellen subcloniert und ergab die Vektoren pSH2-1/pEG202-GST.
- ii) Konstruktion von pSH2-1/pEG202-PrP<sup>c</sup>. Ein

646 Bp DNA-Fragment, das die die Aminosäuren 23 bis 231 des PrP<sup>c</sup> des syrischen Goldhamsters codierenden Nukleotide enthält, wurde durch PCR von dem c-DNA-Clon pAcSG2T::PrP<sup>c</sup>23-231 amplifiziert. Die PrP<sup>c</sup>-Kassette wurde über EcoRI/BamHI-Restriktionsstellen in die Vektoren pSH2-1 und pEG202 cloniert und lieferte pSH2-1/pEG202-PrP<sup>c</sup>.

iii) Konstruktion von pSH-1/pEG202-GST-PrP<sup>c</sup>. Ein 646 Bp DNA-Fragment, das die Aminosäuren 23 bis 231 des PrP<sup>c</sup>-Proteins codiert, wurde durch PCR von dem c-DNA-Clon pAcG2T::PrP<sup>c</sup>23-231 amplifiziert. Das PrP<sup>c</sup>-Fragment wurde über BamHI/Sall-Restriktionsstellen in den Vektor pSH2-1-GST cloniert und ergab pSH2-1-GST-PrP<sup>c</sup>. Die GST-PrP<sup>c</sup>-Kassette wurde aus diesem Vektor unter der Verwendung von EcoRI- und Sall-Restriktionsstellen ausgeschnitten und in pEG202 cloniert und ergab pEG202-GST-PrP<sup>c</sup>.

iv) Konstruktion von pSH2-1-PrP<sup>c</sup>-GST. Die PrP<sup>c</sup>23-231-Kassette wurde durch PCR von pAcSG2T::PrP<sup>c</sup>23-231 amplifiziert und in pSH2-1-GST über die EcoRI-Restriktionsstelle cloniert und ergab pSH2-1-PrP<sup>c</sup>-GST.

Die korrekte Orientierung, Leserahmen und Sequenz der PCR-amplifizierten Fragmente wurde durch Didesoxy-Sequenzierung bekräftigt. (41).

Beispiel 2: Expression des „Köder (bait)“-Proteins LexA-GST-PrP<sup>c</sup> im *S. cerevisiae* Stamm EGY48.

[0049] Für „zwei-Hybrid“-Überprüfungen wurde ein „Köder (bait)“-Fusionsprotein, das aus der bakteriellen Repressor-LexA-Bindungsdomäne (19, 21) und dem Prionprotein PrP<sup>c</sup>23-231 (As = Aminosäuren 23 bis 231, als PrP<sup>c</sup> bezeichnet) (5) des syrischen Goldhamsters, fusioniert mit Glutathion-S-Transferase (GST), getestet. Wie kürzlich berichtet, erhöht die Fusion mit GST signifikant die Löslichkeit und die Stabilität von rekombinantem PrP<sup>c</sup> (47, 48). Zellen des Hefestammes EGY48 wurden mit dem Reporterplasmid pSH18-34 und den Köderplasmiden cotransformiert und auf ihre innere Fähigkeit überprüft, das Reportersystem zu aktivieren. Das pSH-GST-PrP<sup>c</sup>-Konstrukt zeigte einen niedrigen Spiegel innerer Aktivierung. Die Expression des LexA-GST-PrP<sup>c</sup>-Fusionsproteins in *S. cerevisiae* wurde durch Immunoblot unter Verwendung eines polyclonalen, gegen die As 95 bis 110 gerichteten anti-PrP-Antikörpers (20) bekräftigt (Daten nicht gezeigt).

Beispiel 3: Identifizierung von PrP<sup>c</sup>/Hsp60-Wechselwirkung durch die zwei-Hybrid-Überprüfung.

[0050] Detaillierte Verfahren für die Verwendung des Hefe zwei-Hybrid-Systems wurden früher beschrieben (1, 6, 19, 21). Als Empfängerwirt wurde der *S. cerevisiae* Stamm EGY48 (MATa ura3 his3 trp1 LEU2::LexAop6-LEU2), der eine chromosomale In-

sertion von LexA-Bindungsstellen stromaufwärts des LEU2-Genes trägt, verwendet (19, 21). Kurz gesagt wurde der Hefestamm EGY48 mit dem Reporterplasmid pSH18-34, das ein LexA kontrolliertes lacZ-Gen als zweiten Reporter enthält, transformiert. *S. cerevisiae* Zellen wurden mit dem „Köder (bait)“-Plasmid und pJG-5, die eine HeLa cDNA-Bibliothek, fusioniert an die saure B42 Transaktivierungsdomäne enthalten, cotransformiert (19, 21). Die cDNA-Insertion des pJG4-5 Plasmids wird durch einen Galaktose-induzierbaren Promotor kontrolliert. Deshalb ereignet sich die Wechselwirkung zwischen den zwei Hybriden nur in Anwesenheit von Galaktose. 2000 Kolonien, die in Abwesenheit von Leucin wachsen konnten (erstes Reporter-Gen) wurden auf Galaktoseplatten, denen 5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-b-D-Galaktopyranosid (X-Gal) zugesetzt war, übertragen und auf ihre b-Galaktosidase-Produktion überprüft (blaue Färbung, zweites Reportergen).

[0051] cDNAs von 55 positiven Clonen wurden aus 5 ml *S. cerevisiae* Zellkulturen gewonnen. Die Zellen wurden bei 30°C für 2 Tage inkubiert, durch Zentrifugation (3000 UpM, 10 Min. und 4°C) geerntet und gewaschen (1 M Sorbit, 0,1 M EDTA, pH 8,0). Nach Resuspension in SCE (1 M Sorbit, 0,1 M Natriumcitrat, pH 5,8, 10 mM EDTA, 0,1 M b-Mercaptoethanol) wurden die Zellen mit 40 ml Lyticase (5 U/ml, Sigma) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in TE-Lyse-Puffer (50 mM/HCl, pH 7,4, 1% SDS e, 20 mM EDTA, 1% SDS enthaltend) resuspendiert und für 30 Min. bei 65°C inkubiert. Das Lysat wurde mit Phenol extrahiert, die DNA mit Ethanol präzipitiert und in TE resuspendiert. Die DNA wurde in den *E. coli* Stamm KC8 transformiert, der die Selektion von pJG4-5 Plasmiden durch Ampizillin-Resistenz und Komplementation seiner Tryptophan-Auxotrophizität (19, 21) ermöglicht. Als Kontrollexperimente wurden die Plasmide in EGY48 rücktransformiert und die Transformanten auf ihre b-Galaktosidase-Produktion und ihnen Leu<sup>+</sup>-Phänotyp überprüft. Fünf Transformanten wurden auf entsprechende Platten übertragen, für 5 Tage bei 30°C inkubiert und schließlich sequenziert. C-DNA-Insertionen wurden mit dem, auf der Didesoxy-Methode basierenden T7-Sequenzeer-Kit (Pharmacia) sequenziert (41). Die Suche nach Homologien für die cDNA-Sequenzen wurden am National Center for Biotechnology Information unter Verwendung des BLAST Netzwerkservice ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Recipon/bs\\_seq.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Recipon/bs_seq.html)) durchgeführt. Annähernd 20% (entsprechend 9 cDNAs) codierten das Hitzeschock-Protein 60 (Hsp60). Die isolierten Hsp60 cDNAs codieren für drei N-terminal verkürzte Proteine verschiedener Längen, beginnend an Position As 146, beziehungsweise As 228 und As 298 (EMBL M34664). Alle von ihnen enthalten Teile der mutmaßlichen Bindungsdomäne von Hsp60 (14).

#### Beispiel 4: Test auf Spezifität der PrP<sup>c</sup>/Hsp60-Wechselwirkung.

[0052] Die Spezifität der in vivo beobachteten Wechselwirkung zwischen PrP<sup>c</sup> und Hsp60 (**Fig. 1**, Reihe 3) wurde durch mehrere Rückclonierungs-Experimente gezeigt. Insbesondere wurde gezeigt, dass sowohl die inverse Fusion PrP<sup>c</sup>::GST (**Fig. 1**, Reihe 6), als auch authentisches PrP<sup>c</sup>, dem GST fehlt (Daten nicht gezeigt) stark mit Hsp60 Wechselwirken. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl LexA-GST (**Fig. 1**, Reihe 2), authentisches LexA (**Fig. 1**, Reihe 1), als auch die zwei „falschen Köder (bait)“ LexA-NFI/CTF2 (47) (**Fig. 1**, Reihe 4) und LexA-Bicoid (**Fig. 1**, Reihe 5) keine Wechselwirkung mit Hsp60.

#### Beispiel 5: Rekombinantes Hsp60 bindet spezifisch an PrP<sup>c</sup>23-231 und rPrP27-30 in vitro.

[0053] PrP<sup>c</sup>23-231 stellt die reife Form des zellulären Prionproteins dar. Scrapie-Prionisolate bestehen hauptsächlich aus dem Protease-resistenten Kern, der 27 30 kDa groß ist (bezeichnet als PrP27-30) (35, 42) und die Aminosäuren 90 bis 231 enthält. Wir verwendeten rekombinantes GST-Fusionsprotein, gebunden an Glutathion-Sepharose-Beads, um die Wechselwirkung in vitro mit rekombinanten Hsp60 voller Länge zu bekräftigen. Sowohl GST, als auch PrP<sup>c</sup>23-231 und rPrP27-30 fusioniert mit GST (47, 48) wurden immobilisiert und mit Hsp60 inkubiert. Hsp60 wurde in Anwesenheit von GST-PrP<sup>c</sup> (**Fig. 2A**, Spur 2) und GST-rPrP27-30 (**Fig. 2A**, Spur 3) nachgewiesen, jedoch nicht mit GST allein (**Fig. 2A**, Spur 4). Ein anderes menschliches Chaperon, Hsp70 interagiert mit keinem dieser Proteine (Daten nicht gezeigt), was veranschaulicht, dass die Wechselwirkung von PrP<sup>c</sup> mit Hsp60 hoch spezifisch ist.

[0054] Proteine und Antikörper. Sowohl GST, GST::PrP<sup>c</sup>23-231, als auch die GST::PrP<sup>c</sup>-Fragmente GST::P23-52, GST::P53-93, GST::P90-109, GST::P129-175, GST::P180-210 und GST::P218-231 wurden wie beschrieben hergestellt (48). GST::pPrP27-30 (As 90 bis 231 des Prionproteins des syrischen Goldhamsters) wurden in *E. coli* und dem Baculovirus-Expressionssystem expremiert und daraus gereinigt (47). Sowohl GroEL und anti-Kaninchen-IgG-POD, als auch anti-Maus-IgG-POD wurden von Boehringer Mannheim erworben. Rekombinantes Hsp60 wurde von StressGen bereitgestellt und das monoclonale anti-Maus-Hsp60 wurde von Sigma erworben.

[0055] SDS PAGE und Immunoblot. Proteinproben wurden auf 12,5% SDS-Phastgelen (Pharmacia) wie vorher beschrieben (48) analysiert. Als Größenstandard wurde ein Regenbogen-Marker (RPN 756, Amersham) verwendet. Nach Elektrophorese, wurden die Gele auf Nitrocellulose (NC, Schleicher & Schuell) oder Polyvinylidendifluorid-Membranen (PVDF, Minipore) (40 Min. bei 70°C) übertragen. Die Blots

wurden mit einem polyclonalen anti-GroEL oder anti-PrP-Antikörper bei Verdünnungen von 1 : 800/1 : 400 inkubiert. Die Inkubationsschritte wurden wie vorher beschrieben durchgeführt (44). Der Antikörpernachweis wurde durch Chemolumineszenz (ECL-System, Amersham) oder in Anwesenheit von DAB (Sigma) durchgeführt.

#### Beispiel 6: Bindung des bakteriellen GroEL an PrP<sup>c</sup>23-231 und rPrP27-30 in vitro

[0056] Um zu untersuchen, ob GroEL, das prokaryotische Homolog der Hsp60 Familie ebenso fähig ist, an PrP<sup>c</sup>, zu binden, wurden rekombinantes GroEL in entsprechenden in vitro-Bindungsstudien verwendet. „Pull-down“- (Affinitäts-) Untersuchungen wurden durch das Equilibrieren von, mit GST oder dem GST-Fusionsprotein beladenen Glutathion-Sepharose-4B-Beads (Pharmacia) in 0,5% Triton-X-100 enthaltendem Rückfaltung-Puffer (RF) (32) durchgeführt. Die equilibrierten Beads wurden mit einem bis zu 10 fachen molaren Überschuss an GroEL oder Hsp60 (Monomer) bei Raumtemperatur in Anwesenheit von RF, der 0,5% Triton-X-100 enthält, inkubiert. Nach Zentrifugation (2500 UpM, 10 Minuten) wurden die Beads mit RF gewaschen und auf einem 12,5% SDS Phastgel analysiert, einem Blot unterzogen und auf die Anwesenheit von GroEL oder Hsp60 geprüft. [0057] Für GroEL wurde gefunden, dass es in der Wechselwirkung mit PrP<sup>c</sup> (**Fig. 2B**, Spur 3) und rPrP27-30 (**Fig. 2C**, Spur 2), fusioniert mit GST Spezifität zeigte, wohingegen sich keine Bindung in der Anwesenheit von GST allein ereignete (**Fig. 2B**, Spur 4 und **Fig. 2C**, Spur 3). Die Bindung ist jedoch für rPrP27-30 stärker verglichen mit PrP<sup>c</sup>.

#### Beispiel 7: Kartierung der Stelle der Wechselwirkung für Hsp60 und GroEL innerhalb PrP.

[0058] Um eine umfassende Karte der mit PrP<sup>c</sup>-Bindungsstelle auf den molekularen Chaperons zu erhalten, wurden sechs mit GST fusionierte Fragmente von PrP verwendet und ihre Fähigkeit an Hsp60 und GroEL zu binden wurde geprüft. Diese Peptide wurden auf der Basis von biochemischen Vorhersagen bezüglich Hydrophilizität, Antigenizität und Sekundärstruktur (48) entworfen und stellen die As 23 bis 52, As 53 bis 93, die As 90 bis 109, die As 129 bis 175, die As 180 bis 210 und die As 218 bis 231 (**Fig. 3A**) dar. Die immobilisierten Peptide wurden mit Hsp60 beziehungsweise GroEL inkubiert. Die Kartierungs-Analyse identifizierte Hsp60 (**Fig. 3B**, Spur 6) und GroEL (**Fig. 3C**, Spur 6) nur in Anwesenheit von GST::P180-210, was zeigt, dass es nur der PrP-Bereich ist, der durch die Aminosäuren 180 bis 210 dargestellt wird, der mit dem molekularen Chaperon interagiert.



Beispiel 8: Herunterregulierung von Hsp60 in Anwesenheit von Hamster PrP<sup>C</sup>23-231 in Fusion mit GST.

[0059] FLAG markiertes Hsp60 wurde als ein 61 kDa Protein im Baculovirussystem (**Fig. 4**, Spur 1) synthetisiert. Co-Expression von GST::rPrP<sup>C</sup> (rPrP23-231) (Spur 3) und GST::rPrP27-30 (rPrP90-231) (Spur 4) reguliert die FLAG::Hsp60-Expression herunter, wohingegen die Co-Expression von GST die Expression von FLAG::Hsp60 (Spur 2) nicht beeinträchtigt.

[0060] Es wurde eine Co-Infektion gefolgt von einer Western-Blot-Analyse durchgeführt. Von mit dem Baculovirus infizierten Insektenzellen wurde Gesamtprotein durch Standardverfahren geerntet und durch SDS-PAGE analysiert. Für die folgende Western-Blot-Analyse wurde ein anti-Hsp60-Antikörper (Sigma # 4149) verwendet.

[0061] Das Herunterregulieren von Hsp60 in der Anwesenheit von mit PrP<sup>C</sup> kann sich entweder auf der Transkriptions- oder der Translations-Ebene ereignen. Alternativ könnte PrP den proteolytischen Abbau von Hsp60 auslösen. Schließlich könnte PrP<sup>C</sup> zu einem erhöhten Sekretions-Prozess von Hsp60 führen. Die Anwesenheit von Hsp60 im Kulturmedium würde diese Hypothese beweisen. Das Herunterregulieren von Hsp60 in Anwesenheit von PrP kann eine direkte PrP/Hsp60-Wechselwirkung begründen, die zu einer erhöhten Herunterregulation von Hsp60 führt. Die Anwendung von PrP-Peptiden, die Teile des Prionproteins umspannen kann den Bereich des Prionproteins identifizieren, der für das Herunterregulieren der Hsp60-Expression verantwortlich ist.

1. Altmann, H., W. Wendler and E.-L. Winnacker. Transcriptional activation by CTF proteins is mediated by a bipartite low-proline domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 (1994), 3901–3905.
2. Alken, J. M., J. L. Williamson and R. F. Marsh. Evidence for Mitochondrial Involvement in Scrapie Infection. *J. Virol.* 63 (1989), 1686–1694.
3. Alper, T., D. A. Haig and M. C. Clarke. The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 22 (1966), 278–284.
4. Alper, T., W. A. Cramp, D. A. Haig and M. C. Clarke. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 214 (1967), 764–766.
5. Basier, K., B. Oesch, M. Scott, D. Westaway, M. Wälchli, D. F. Groth, M. P. McKinley, S. B. Prusiner and C. Weissmann. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell* 46 (1986), 417–428.
6. Benson, J. D. and P. M. Howley. Amino-Terminal Domains of the Bovine Papillomavirus Type 1 E1 and E2 Proteins Participate in Complex Formation. *J. Virol.* 69 (1995), 4364–4372.
7. Bessen, R. A., D. A. Kocisko, G. J. Raymond, S. Nandan, P. T. Lansbury and B. Caughey. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 375 (1995), 698–700.
8. Borchelt, D. R., A. Taraboulos and S. B. Prusiner.

Evidence for synthesis of scrapie prion proteins in the endocytic pathway. *J. Biol. Chem.* 257 (1992), 16188–16199.

9. Borchelt, D. R., M. Scott, A. Taraboulos, N. Stahl and S. B. Prusiner. Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J. Cell Biol.* 110 (1990), 743–752.
10. Braig, K., Z. Otwinowski, R. Hedge, D. C. Boisset, A. Joachimiak, A. L. Horwich and P. B. Sigler. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* 371 (1994), 578–586.
11. Caughey, B. and G. J. Raymond. The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 18217–18223.
12. Chernoff, Y. O., S. L. Lindquist, B.-I. Ono, S. G. Inge-Vechtomov and S. W. Liebman. Role of the Chaperons Protein Hsp104 in Propagation of the Yeast Prion-Like Factor [ps<sup>+</sup>]. *Science* 268 (1995), 880–884.
13. Ellis J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* 328 (1987), 378–379.
14. Fenton, W. A., Y. Kashi, K. Furtak and A. L. Horwich. Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. *Nature* 371 (1994), 614–619.
15. Fields, S. and K.-O. Song. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (1989), 245–246.
16. Ganea, E. and J. J. Harding. Molecular chaperones protect against glycation-induced inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 231 (1995) 181–185.
17. Gasset, AR., M. A. Baldwin, R. J. Fletterick and S. B. Prusiner. Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90 (1993), 1–5.
18. Gething, M.-J. and J. Sambrook. Protein folding in the cell. *Nature* 355 (1992), 33–45.
19. Golemis, E. A., J. Gyuris and R. Brent. Interaction Trap/Two-Hybrid System to identify interacting proteins. In *Current Protocols in Mol. Biol.*, (Ausubel et al. Ed.) (1994) pp 13.14.1–13.14.17, Wiley & Sons.
20. Groschup, M. H., J. Langeveld and E. Pfaff. The major species specific epitope in prion proteins of ruminants. *Arch. Virol.* 136 (1994), 423–431.
21. Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov and R. Brent. Cdi1, a Human G1 and S Phase Protein Phosphatase That Associates with Cdk2. *Cell* 75 (1993), 791–803.
22. Hartl, F. U. and J. Martin. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5 (1995), 92–102.
23. Hartl, F. U., J. Martin and W. Neupert. Protein Folding in the Cell: The Role of Molecular Chaperones Hsp70 and Hsp60. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21 (1992), 293–322.
24. Huang, Z., J.-M. Gabriel, M. A. Baldwin, R. J. Fletterick, S. B. Prusiner and F. E. Cohen. Proposed three-dimensional structure for the cellular prion pro-

- tein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 (1994), 7139–7143.
25. Itoh, H., R. Kobayashi, N. Wakui, A. Komatsuda, N. Ohtani, A. B. Miura, M. Otaka, O. Masamune, N. Andoh, K. Koyama, Y. Sato and Y. Tashima. Mammalian 60-kDa-Stress Protein (Chaperonin Homolog). Identification, Biochemical Properties and Localization. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), 13429–13435.
  26. Kazmirski, S. L., D. O. V. Alonso, F. E. Cohen, S. B. Prusiner and V. Daggett. Theoretical studies of sequence effects on the conformational properties of a fragment of the prion protein: implications for scrapie formation. *Chemistry & Biology* 2 (1995), 305–315.
  27. Kocisko, D. A., S. A. Priola, G. J. Raymond, B. Chesebro, P. T. Jr. Lansbury and B. Caughey. Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: A model for the scrapie species barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92 (1995), 3923–3927.
  28. Kocisko, D. A., J. H. Come, S. A. Priola, B. Chesebro, G. J. Raymond, P. T. Lansbury and B. Caughey. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature* 370 (1994), 471–474.
  29. Lansbury, P. T. Jr, and B. Caughey. The chemistry of scrapie infection: implications of the 'ice 9' metaphor. *Chemistry & Biology* 2 (1995), 1–5.
  30. Nguyen, J., M. A. Baldwin, F. E. Cohen and S. B. Prusiner. Prion Protein Peptides Induce  $\alpha$ -Helix to  $\beta$ -sheet Conformational Transitions. *Biochemistry* 34 (1995), 4186–4192.
  31. Pan, K.-M., M. Baldwin, J. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z. Huang, R. J. Fletterick, P. E. Cohen and S. B. Prusiner. Conversion of  $\alpha$ -helices into  $\beta$ -sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993), 10962–10966.
  32. Phadtare, S., M. T. Fisher and L. R. Yarbrough. Refolding and release of tubulins by a functional immobilized groEL column. *Biochim. et Biophys. Acta* 1208 (1994), 189–192.
  33. Prusiner, S. B. and K. K. Hsiao. Human prion diseases. *Ann. Neurol.* 35 (1994), 385–396.
  34. Prusiner, S. B. Molecular biology of prion disease. *Science* 252 (1991), 1515–1522.
  35. Prusiner, S. B., D. F. Groth, D. C. Bolton, S. B. Kent and L. E. Hood. Purification and structural studies of a major scrapie prion protein. *Cell* 38 (1984), 127–134.
  36. Prusiner, S. B. Novel proteinaceous infectious particle cause Scrapie. *Science* 216 (1982), 136.
  67. Ross, W. R., W. S. Bertrand and A. R. Morrison. Identification of a processed protein related to the human chaperonins (hsp 60) protein in mammalian kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 (1992), 683–687.
  38. Safar, J. P. P. Roller, D. C. Gajdusek and C. J. Jr. Gibbs. Conformational transitions, dissociation, and unfolding of scrapie amyloid (prion) protein. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), 20276–20284.
  39. Salki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1998), 487–491.
  40. Sambrook, J. E. F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
  41. Sanger, F., Nicklen and A. R. Coulson. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977), 5463–5467.
  42. Stahl, N. M. A. Baldwin, D. B. Teplow, L. Hood, B. W. Gibson, A. L. Burlingame and S. B. Prusiner. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing. *Biochemistry* 32 (1993), 9991–2002.
  43. Telling, G. C. M. Scott, J. Mastranni, R. Gabizon, M. Torchia, F. E. Cohen, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner. Prion Propagation in Mice Expressing Human and Chimeric PrP Transgenes Implicates the Interaction of Cellular PrP with Another Protein. *Cell* 83 (1995), 79–90.
  44. Towbin, H. T. Staehelin and J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979+), 4350–4354.
  45. Velez-Granell, C. S., A. E. Arlas, J. A. Torres-Ruiz and M. Bendayan. Molecular chaperones in pancreatic tissue: the presence of cpn10, cpn60 and hsp70 in distinct compartments along the secretory pathway of the acinar cells. *J. Cell. Sci.* 107 (1994), 539–549.
  46. Vitek, M. P., K. Bhattacharya, J. M. Glendening, E. Stopa, H. Vlassara, R. Bucala, K. Manogue and A. Cerami. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91 (1995), 4766–4770.
  47. Weiss, S., R. Rieger, F. Edenhofer, E. Fisch and E.-L. Winnacker. Recombinant prion protein rPrP27-30 from the Syrian Golden Hamster reveals protease K sensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 219 (1996), 173–179.
  48. Weiss, S., M. Famulok, F. Edenhofer, Y.-H. Wang, I. M. Jones, M. Groschup and E.-L. Winnacker. Overexpression of Active Syrian Golden Hamster Prion Protein PrP<sup>c</sup> as a Glutathione S-Transferase Fusion in Heterologous Systems. *J. Virol.* 69 (1995), 4776–4783.
  49. Wendler, W., H. Altmann and E.-L. Winnacker. Transcriptional activation of NF1/CTF1 depends on a sequence motif strongly related to the carboxyterminal domain of RNA polymerase II. *Nucl. Acids Res.* 22 (1994), 2601–2603.
  50. Wickner, R. B. Prions of yeast and heat-shock protein 104: "coprion" and cure. *Trends in Microbiol.* 3 (1995), 367–369.
  59. Sambrook J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1969). Cold Spring Harbour, N.Y.

52. Redl, B., Walleczek, J., Stoffler-Meilicke, M. and Stoffler, G. Immunoblotting analysis of protein-protein crosslinks within the 50S ribosomal subunit of E. coli: A study using dimethylsuberimidate as crosslinking reagent. *Eur. J. Biochem.* 181 (1989), 354–356.
53. Maurer, H. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis. Walter de Gruyter (1971), Berlin/New York.
54. Hummel, J. P. and Dreyer, W. J. Measurement of protein binding phenomenon by gel filtration. *Biochem. Biophys. Acta* 63 (1962), 530–532.
55. Le-Grice, S. F. and Gruninger-Leitch, F. Rapid purification of homodimer and heterodimer HIV-1 reverse transcriptase by metal chelate affinity chromatography. *Eur. J. Biochem.* 187 (1990), 307–314.
16. Carr, D. W., Stofko-Hahn, R. E., Fraser, I. D. C., Bishop, S. M., Acott, T. S., Brennan, R. G. and Scott, J. D. Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif. *J. Biol. Chem.* 266 (1991), 14188–14192.
57. Kim, J. S. and Raines, R. T. Ribonuclease S-peptide as a carrier in fusion proteins. *Protein Sci.* 2 (1993), 348–356.
56. Kawase, M., Mornoeda, M., Young, N. S. and Kijagaya, S. Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology* 211 (1995), 359–366.
59. Wang, L.-F., Yu, M., White, J. R. and Eaton, B. T., BTag: a novel sixresidue epitope tag for surveillance and purification of recombinant proteins. *Gene* 169 (1996), 53–58.
60. Aitken, R., Gilchrist, J. and Sinclair, M. C. Vectors to facilitate the creation of translational fusions to the maltase-binding protein of Escherichia coli. *Gene* 144, (1994) 69–73.
61. Richards, F. M. and Wyckoff, H. W. in "The Enzymes" Vol. IV (Boyer, P. D., Ed.) (1971), 647–806, Academic Press, New York.
62. Carr, D. W. and Scott, J. D. Blotting and band-shifting: Techniques for studying protein-protein interactions. *Trends Biochem. Sci.* 17, (1992) 246–249.
63. Dean, P. D. G., Johnson, V. S. and Middle, F. A., Eds., IRL Press, Oxford, England (1985), 215
64. Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., and Glenner, G. G. Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell* 35 (1983), 349–358.
65. Hampton, R. Y. Koning, A., Wright, R. and Rine, J. In-vivo examination of membrane protein localization and degradation with green fluorescent protein. *PNAS* 93 (1996), 828–833.
66. Formosa, T., Barry, J., Alberts, B. U. and Greenblatt, J. Using protein affinity chromatography to probe structure of protein machines. *Methods Enzymol.* 208 (1991), 24–45.
67. Tatzelt, J., Prusiner, S. B., and Welch, W. J. Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *Embo J.* 15 (1988), 6363–73.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Prionproteins umfassend die folgenden Schritte:  
(a) Inkontaktbringen einer Probe, die vermutlich ein Prionprotein enthält, mit einem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann; und  
(b) Bestimmen, ob ein Prionprotein an das Chaperon bindet.
2. Verfahren zum Isolieren eines Prionproteins umfassend die folgenden Schritte:  
(a) Inkontaktbringen einer Probe, die ein Prionprotein enthält, mit einem Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann; und  
(b) Isolieren des an das Chaperon gebundenen Proteins von dem Chaperon.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei ein Fragment, Analog oder Derivat des Chaperon, das ein Prionprotein spezifisch binden kann, verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Chaperon Hsp60 oder GroEL ist.
5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei das Chaperon Teil eines Fusionsproteins ist.
6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Chaperon Teil eines Fusionsproteins mit Glutathion-S-Transferase, FLAG, Oligohistidin, GFP, CBP, MBP, BTag oder S-Peptid ist.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Prionprotein PrP<sup>c</sup> und/oder eine Isoform von PrP<sup>c</sup> ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei die Prionproteinisoform die Isoform PrP<sup>sc</sup> oder ein Fragment, Analog oder Derivat davon ist.
9. Verfahren nach Anspruch 7 oder 8, wobei das Prionprotein die prozessierte Form PrP<sup>c</sup>23-231 und/oder die Isoform PrP<sup>sc</sup> das Derivat PrP27-30 oder ein Fragment davon ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Chaperon eine nachweisbare Markierung hat.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Chaperon an eine feste Phase gebunden ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die feste Phase Glutathion-Sepharose, ein Anti-FLAG-Antikörper, IMAC-Ni<sup>2+</sup>, ein Anti-GFP-Antikörper, ein Anti-BTag-Antikörper, Calmodulin, S-Protein 104 aa oder Maltose ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei das Chaperon Teil einer Matrix ist, die in einer Affinitätschromatographiesäule enthalten ist und wobei Schritt (b) in einer Weise modifiziert ist, dass

- (i) die Probe, die vermutlich ein Prionprotein enthält, durch die Säule läuft,
- (ii) das Prionprotein nach dem Waschen von der Säule gegebenenfalls durch eine Änderung des pH-Werts oder der Ionenstärke eluiert und gesammelt wird; und
- (iii) gegebenenfalls das gesammelte Prionprotein weiter gereinigt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13 für die in-vitro-Diagnose einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie, wobei Schritt (b) in einer Weise modifiziert ist, dass die Unterschiede der Bindestärken des Chaperons an PrP<sup>c</sup> bzw. eine Isoform von PrP<sup>c</sup>, vorzugsweise PrP<sup>sc</sup>, verwendet werden, um zu bestimmen, ob eine Isoform von PrP<sup>c</sup> in der Probe vorhanden ist oder nicht.

15. Komplex aus einem Chaperon und einem wie in einem der Ansprüche 1 bis 14 definierten Prionprotein.

16. Verwendung eines wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definierten Chaperons oder eines Stoffes, der ein wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiertes Chaperon inaktiviert, für die Herstellung eines Medikaments zur Prävention oder Behandlung einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei der Stoff ein Antikörper, vorzugsweise ein monoklonaler Antikörper ist.

18. Verwendung nach Anspruch 16 oder 17, wobei die übertragbare spongiforme Enzephalopathie Scrapie, bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung (CJD), Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom (GSS), Kuru, fatale familiäre Insomnie (FFI) oder übertragbare Mink-Enzephalopathie (TME).

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen







