

Aus der Klinik für Neurologie  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. W.H. Oertel

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

## **Humane Autoantikörper bei Prionerkrankungen**

Kumulative Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Yvonne Röttger**

geboren am 16.02.1985 in Groß-Gerau

Marburg an der Lahn, Mai 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
30.10.2013

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

**Dekan:** Prof. Dr. H. Schäfer

**Referent:** Prof. Dr. med. Richard Dodel

**Korreferent:** Prof. Dr. Gerhard Schratt

*Für meine Oma*

## Anmerkung

Diese Doktorarbeit wurde in Form einer „kumulativen Dissertation“ verfasst. Nach der „Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereiches für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.7.2009 (§9)“ ist es möglich, gesammelte Publikationen als Dissertationsleistung anzuerkennen. Die Arbeit besteht aus einer gemeinsamen Einleitung, einer kurzen Beschreibung der Ergebnisse, einer gemeinsamen Diskussion sowie den im Anhang aufgeführten Publikationen.

Publikationen dieser Arbeit:

**1. Wei, X., Y. Roettger, B. Tan, Y. He, R. Dodel, H. Hampel, G. Wei, J. Haney, H. Gu, B. H. Johnstone, J. Liu, M. R. Farlow, Y. Du (2012).** Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity.

J Biol Chem 287(16): 12858-66

**2. Roettger Y., I. Zerr, R. Dodel, J. P. Bach (2013).** Prion peptide uptake in microglial cells-the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein.

PLoS One 8(6): e67743

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	<i>Prionerkrankung</i> .....	1
1.1.1	Hypothesen zur Pathogenese von Prionerkrankungen.....	3
1.1.2	Physiologisches Vorkommen und Funktion von PrP <sup>C</sup> .....	3
1.1.3	Vergleich von PrP <sup>C</sup> und PrP <sup>Sc</sup> .....	4
1.1.4	Neurotoxizität von PrP <sup>Sc</sup> .....	5
1.1.5	PrP106-126 und PrP106-126 A117V.....	6
1.1.6	Diagnose und Therapiemöglichkeiten.....	6
1.2	<i>Natürlich vorkommende Autoantikörper</i> .....	8
1.2.1	nAbs bei AD und PD.....	8
1.2.2	nAbs bei Prionerkrankungen.....	9
1.3	<i>Die Rolle von Mikrogliazellen bei Prionerkrankungen</i> .....	9
<b>2</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>11</b>
2.1	<i>Detektion von nAbs-PrP in humanem Serum, CSF und IVIg</i> .....	11
2.2	<i>nAbs-PrP erkennen das N-terminale Epitop PrP106-110</i> .....	12
2.3	<i>nAbs-PrP hemmen die Fibrillation und Neurotoxizität von PrP106-126 A117V</i> . 12	
2.4	<i>nAbs-PrP verstärken die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen</i> 13	
2.5	<i>Untersuchung des Aufnahmemechanismus in Mikrogliazellen</i> .....	14
<b>3</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>16</b>
3.1	<i>Nachweis von nAbs-PrP in Serum, CSF und IVIg</i> .....	16
3.2	<i>nAbs-PrP hemmen die Fibrillation und Neurotoxizität von PrP106-126 A117V</i> . 17	
3.3	<i>nAbs-PrP verstärken die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen</i> 18	
3.4	<i>Der Aufnahmemechanismus von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen</i> .....	20
3.5	<i>Untersuchung des nAbs-PrP Bindemotivs</i> .....	23
<b>4</b>	<b>Referenzen</b> .....	<b>26</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>34</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>I</b>
7.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	I
7.2	<i>Abbildungsverzeichnis</i> .....	III

7.3	<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>III</i>
7.4	<i>Verzeichnis der akademischen Lehrer .....</i>	<i>IV</i>
7.5	<i>Danksagung.....</i>	<i>V</i>
7.6	<i>Publikationen.....</i>	<i>VI</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Prionerkrankung

Prionerkrankungen gehören neben der Alzheimer-Erkrankung (AD) und der Parkinson-Erkrankung (PD) zu den neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), die durch eine Ablagerung fehlgefalteter Proteine im Gehirn gekennzeichnet sind (Taylor et al. 2002). Im Gegensatz zur AD und PD sind Prionerkrankungen durch lange Inkubationszeiten und einen akuten Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Darüber hinaus sind Prionerkrankungen übertragbar und werden aufgrund ihrer Transmissibilität und dem typischen histopathologischen Erscheinungsbild des Hirngewebes in Form von schwammartiger Vakuolenbildung auch Transmissible Spongiforme Enzephalopathien (TSE) genannt. Charakteristisch ist die Fehlfaltung eines physiologisch vorkommenden Proteins, des zellulär exprimierten Prionproteins PrP<sup>C</sup> (englisch: **cellular prion protein**).

Prionerkrankungen treten sowohl bei Tieren als auch beim Menschen auf. Die bekanntesten Formen im Tier sind die Bovine Spongiforme Encephalopathie (BSE) beim Rind und Scrapie beim Schaf (siehe Tabelle 1). Letztere ist seit über 200 Jahren bekannt und namensgebend für die pathogene Form des Prionproteins, PrP<sup>Sc</sup> (englisch: **scrapie prion protein**). Neben der hereditären Gerstmann-Sträussler-Scheinker Erkrankung (GSS) und der Fatalen Familiären Insomnie (FFI) ist die im Menschen bekannteste Prionerkrankung die Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD), die 1920 erstmals beschrieben wurde (Creutzfeldt 1920; Jakob 1921). Die CJD wird unterschieden in eine sporadische (sCJD), familiäre (fCJD), iatrogene (iCJD) und neue Variante (vCJD), wovon sCJD die häufigste Form ist und weltweit gleichmäßig verteilt auftritt.

Insgesamt zählen die CJDs mit einer Inzidenz von eins zu einer Million pro Jahr und Einwohner zu den seltenen Erkrankungen. Der Krankheitsbeginn und die Krankheitsdauer variieren je nach Form der CJD. Der durchschnittliche Krankheitsbeginn reicht von einem Alter von 26 Jahren (vCJD) bis 65 Jahren (sCJD) mit einer Krankheitsdauer von 4 Monaten (sCJD) bis 13 Monaten (vCJD) (Macfarlane et al. 2007). Als Ursache für hereditäre Prionerkrankungen (GSS, fCJD, FFI) sind derzeit über 20 verschiedene Mutationen des Prion-Protein-Gens (PRNP) bekannt, die autosomal dominant vererbt werden und in zwei verschiedene Gruppen unterteilt werden können: Punktmutationen oder Insertionen (Collinge 2001). Die durch Infektion erworbene vCJD trat erstmals 1996 auf und wird in engem Zusammenhang mit der 1986 aufkommenden BSE Krise in Großbritannien gesehen.

<b>Prionerkrankungen beim Menschen</b>		
<b>Krankheitsbezeichnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>Wahrscheinliche Ätiologie</b>
sCJD	Mensch	Spontane Konversion von PrP <sup>C</sup> in PrP <sup>Sc</sup> oder somatische Mutation
fCJD	Mensch	Mutation im PRNP Gen
iCJD	Mensch	Erworben durch Infektion mit Prionen humaner Herkunft
vCJD	Mensch	Erworben durch Infektion mit BSE
FFI	Mensch	Mutation im PRNP Gen
GSS	Mensch	Mutation im PRNP Gen
<b>Prionerkrankungen im Tier</b>		
<b>Krankheitsbezeichnung</b>	<b>Wirt</b>	<b>Wahrscheinliche Ätiologie</b>
BSE	Rind	Erworben durch Infektion mit Prionen unbekannter Herkunft
Scrapie	Schaf	Erworben durch Infektion mit Prionen unbekannter Herkunft

**Tabelle 1: Ätiologie wichtiger Prionerkrankungen beim Menschen und in Tieren.**

Sporadische (s), familiäre (f), iatrogene (i) und variante (v) Creutzfeldt-Jakob Erkrankung (CJD), Fatale Familiäre Insomnie (FFI), Gerstmann-Sträussler-Scheinker Erkrankung (GSS), Bovine Spongiforme Enzephalopathie (BSE), Prionprotein Gen (PRNP). [modifiziert nach (Imran et al. 2011)]

Alle Formen der Prionerkrankungen zeichnen sich durch eine lange Inkubationszeit aus, welche im Tiermodell sowie in der vCJD und in einigen Fällen der sCJD durch eine PrP<sup>Sc</sup> Akkumulation im lymphatischen Gewebe, insbesondere der Milz, gekennzeichnet sind (Roettger et al. 2012). Diese lymphatische Akkumulation geht mit keinerlei erkennbarer Symptomatik einher. Klinisch manifestiert wird die Erkrankung erst nach Invasion des ZNS (Roettger et al. 2012).

Charakteristische neuropathologische Merkmale der Prionerkrankungen sind eine schwammartige Vakuolisierung des ZNS, ein starker neuronaler Zelluntergang verbunden mit einer Gliazell-Aktivierung (Astrogliose) und der pathologischen Ablagerung des Prionoproteins (Budka 2003). Das klinische Bild wird bestimmt durch einen rasch progredienten Abbau der kognitiven Fähigkeiten und Störungen des motorischen Systems (Ataxien und Myoklonien).



### 1.1.1 Hypothesen zur Pathogenese von Prionerkrankungen

Nach der „Protein-Only“-Hypothese von J. S. Griffith wird die Prionerkrankung, nicht wie zuerst angenommen, durch ein „langsameres Virus“, sondern durch ein sich replizierendes Protein verursacht (Griffith 1967). Dass es sich beim Prionprotein um ein körpereigenes Protein handelt, wurde nicht zuletzt durch das Fehlen einer Immunantwort während der Erkrankung bestätigt. Nach dem heutigen Wissensstand wird die Krankheit durch das Fehlfalten und die anschließende Akkumulation des körpereigenen Prionproteins PrP<sup>C</sup> in die pathogene Form PrP<sup>Sc</sup> verursacht (Cohen 1999). Der genaue Mechanismus des Umfaltungsprozesses von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Auf Grundlage verschiedener Studien haben sich jedoch drei Modelle für diesen Umwandlungsprozess entwickelt. Das sogenannte Umwandlungsmodell besagt, dass die Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> kinetisch kontrolliert ist und sehr hohe Aktivierungsenergien für diesen Prozess benötigt werden. Dadurch findet die Umwandlung zunächst nicht spontan statt. Erst die direkte Interaktion mit exogen eingeführtem PrP<sup>Sc</sup> induziert die Umwandlung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> (Caughey et al. 1995; Rigter et al. 2010). Bei dem Modell der Keimbildung geht man davon aus, dass sich PrP<sup>C</sup> in geringem Maße spontan zu PrP<sup>Sc</sup> umformt und ein thermodynamisches Äquilibrium entsteht, mit einer starken Favorisierung in Richtung von PrP<sup>C</sup> (Weissmann 2004). Erst wenn die zunächst instabilen monomeren PrP<sup>Sc</sup> Moleküle sich in Form von kristallähnlichen Keimen zusammenlagern, werden sie stabilisiert. Die so entstehenden Keime können dann wiederum erneut PrP<sup>C</sup> rekrutieren und in PrP<sup>Sc</sup> konvertieren, wodurch das Gleichgewicht in Richtung des pathogenen Konformers verschoben wird. Ein weiteres Modell besagt, dass ein noch unbekannter Ko-Faktor (Ko-Faktor X, zum Beispiel Chaperone) an dem Umwandlungsprozess beteiligt ist, um die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> zu begünstigen (Soto 2004; Diaz-Espinoza et al. 2012).

Der genaue Mechanismus des Umfaltungsprozesses ist bis heute noch nicht abschließend geklärt.

### 1.1.2 Physiologisches Vorkommen und Funktion von PrP<sup>C</sup>

Das physiologische zelluläre Prionprotein PrP<sup>C</sup> ist ein unter Säugetieren hoch konserviertes 33-35 kDa großes endogenes Glykoprotein, welches durch einen C-terminalen Glykosyl-Phosphoinositol (GPI) Anker an der Zelloberfläche befestigt und dort an sogenannten „Lipidrafts“ lokalisiert ist (Taylor et al. 2006). Die PrP<sup>C</sup> Expression ist im Körper weit verbreitet: das Protein wird in der Skelettmuskulatur, den Nieren, dem Herz, den sekundär lymphatischen Organen sowie im ZNS exprimiert (Aguzzi et al. 2006). Im ZNS sind besonders hohe PrP<sup>C</sup>-Expressionslevel an synaptischen Endplat-

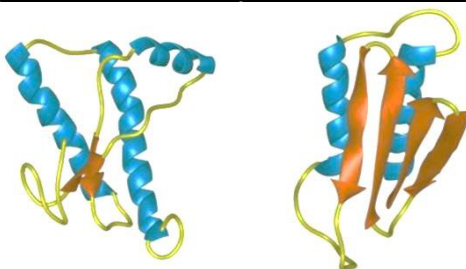
ten zu finden. In peripheren Regionen ist PrP<sup>C</sup> in Lymphozyten und in hohem Maß in folliculären dendritischen Zellen (FDSs) exprimiert (Mabbott et al. 2006).

Die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup> ist bis heute nicht vollständig geklärt. Die unterschiedliche Verteilung der Expressionslevel geben jedoch erste Hinweise auf die physiologische Funktion von PrP<sup>C</sup>. Demnach scheint PrP<sup>C</sup> an der Regulation von Ionenkanälen und neuronaler Erregbarkeit beteiligt zu sein (Biasini et al. 2012). Darüber hinaus wird PrP<sup>C</sup> eine regulatorische Funktion in der präsynaptischen Kupfer-Konzentration, der intrazellulären Kalzium-Homöostase, der Aktivierung und Proliferation von Lymphozyten und Astrozyten sowie der Signaltransduktion zugeschrieben (Forloni et al. 1994; Whatley et al. 1995). Des Weiteren scheint PrP<sup>C</sup> eine neuroprotektive Rolle einzunehmen und interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen (Roettger et al. 2012). PrP<sup>C</sup> wird darüber hinaus mit einer Vielzahl von möglichen physiologischen Funktionen in Verbindung gebracht (siehe Übersichtsarbeit von (Westergard et al. 2007)). Versuche mit Prion-Knockoutmäusen (PrP<sup>-/-</sup>) sollten weitere Aufschlüsse zur physiologischen Funktion von PrP<sup>C</sup> geben, zeigten überraschenderweise jedoch zunächst keinen auffälligen Phänotyp (Bueler et al. 1992). Nach weiteren Studien konnten allerdings subtile phänotypische Abnormalitäten, wie Veränderungen im zirkadianen Rhythmus, der synaptischen Transmission und hippokampaler Morphologie in PrP<sup>-/-</sup> Mäusen nachgewiesen werden (Tobler et al. 1996; Colling et al. 1997).

### 1.1.3 Vergleich von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>

Die Konformationsänderung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> ist durch fundamentale Veränderungen der biochemischen Eigenschaften des Proteins gekennzeichnet (siehe Abbildung 1).

PrP <sup>C</sup>	PrP <sup>Sc</sup>
α-Helix	β-Faltblatt
Monomer	Aggregation
löslich	unlöslich
PK-sensitiv	PK-resistent
<b>nicht infektiös</b>	<b>infektiös</b>



**Abbildung 1: Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.** Proteinkinase K (PK).  
[modifiziert nach (Cohen 1999)]

PrP<sup>C</sup> weist eine Tertiärstruktur auf, die aus einer ungeordneten N-terminalen Region (Aminosäuren 23 bis 128) sowie einer strukturierten, globulären C-terminalen Region besteht. Letztere setzt sich aus drei α-Helices und einem kurzen doppelsträngigen antiparallelen β-Faltblatt zusammen (Aguzzi et al. 2006; Pastore et al. 2007; Biasini et al. 2012). PrP<sup>C</sup> ist löslich und liegt als Monomer vor. Die Tertiärstruktur von PrP<sup>Sc</sup> besteht aus einem erhöhten Anteil an β-Faltblattstrukturen, wodurch sich PrP<sup>Sc</sup> Moleküle zusammenlagern und unlösliche Aggregate ausbilden können (Riesner

2003). Durch das Ausbilden von Aggregaten ist PrP<sup>Sc</sup> im Gegensatz zu PrP<sup>C</sup> resistent gegen einen Proteinkinase K (PK) Verdau: während PrP<sup>C</sup> durch eine Behandlung mit PK komplett verdaut wird, wird von PrP<sup>Sc</sup> nur ein ca. 90 Aminosäuren großes N-terminales Teilstück abgeschnitten. Es entsteht ein PK resistentes, C-terminales Protein mit einer Größe von 27-30 kDa, auch PrP<sup>27-30</sup> oder PrP<sup>res</sup> (*englisch: resistant prion protein*) genannt. Dieses besitzt die Tendenz zu aggregieren und hat infektiösen Charakter.

#### 1.1.4 Neurotoxizität von PrP<sup>Sc</sup>

Es wird angenommen, dass die Fehlfaltung von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> und die damit verbundene Aggregation von PrP<sup>Sc</sup> die Hauptursache des neuronalen Zelluntergangs im Verlauf der Prionerkrankung ist. Der genaue Mechanismus über den PrP<sup>Sc</sup> dabei neurotoxisch wirkt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Zunächst scheinen nicht die fibrillären Endprodukte der PrP<sup>Sc</sup>-Aggregation (PrP<sup>Sc</sup> Fibrillen, Plaqueablagerungen), sondern ein Gemisch aus oligomeren Zwischenstufen des Aggregationsprozesses die neurotoxischen Komponenten zu sein (Aguzzi et al. 2012). Diese sind jedoch nicht an sich, sondern nur in Verbindung mit einer endogenen PrP<sup>C</sup> Expression toxisch auf Neurone. So konnte gezeigt werden, dass PrP<sup>-/-</sup> Mäuse selbst nach intrazerebraler Inokulation mit PrP<sup>Sc</sup> resistent gegen eine Prioninfektion sind (Bueler et al. 1993). Dabei scheint explizit das neuronal exprimierte PrP<sup>C</sup> für die Vermittlung der Toxizität verantwortlich zu sein: eine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in neuronalem PrP<sup>-/-</sup> Gewebe zeigte keinen degenerativen Einfluss, weder auf die Neurone noch auf das PrP<sup>C</sup> exprimierende umliegende Gewebe (Mallucci et al. 2003). Diese Entkopplung der PrP<sup>Sc</sup> Akkumulation von der neurotoxischen Wirkung wurde von mehreren Gruppen untersucht und bestätigt (Race et al. 1995; Brandner et al. 1996; Hill et al. 2003). Darüber hinaus wurde im Tiermodell gezeigt, dass durch ein Entfernen des GPI Ankers von PrP<sup>C</sup>, wodurch PrP<sup>C</sup> nicht mehr membranständig, sondern extrazellulär in Form von löslichen Monomeren zu finden ist, die neurotoxische Wirkung von PrP<sup>Sc</sup> aufgehoben wird (Chesebro et al. 2005). Dies unterstützt den Befund, dass für eine neurotoxische Wirkung von PrP<sup>Sc</sup> eine neuronale, membranständige Expression von PrP<sup>C</sup> essentiell ist. Der genaue Mechanismus über den die Toxizität vermittelt wird, wird derzeit verschieden diskutiert. Eine häufig erwähnte Möglichkeit ist, dass PrP<sup>C</sup> als Rezeptor für die Weiterleitung eines durch extrazelluläres PrP<sup>Sc</sup> vermittelten toxischen Signals dient (Aguzzi et al. 2012). Des Weiteren wurde diskutiert, dass eine durch PrP<sup>Sc</sup> Oligomere vermittelte Dimerisierung von PrP<sup>C</sup> eine toxische intrazelluläre Kaskade auslösen kann (Solfrosi et al. 2004).

### 1.1.5 PrP106-126 und PrP106-126 A117V

Zur Erforschung der Neurodegeneration und Pathologie von Prionerkrankungen werden häufig synthetische Prionprotein-Fragmente als Modell herangezogen. Das Peptid PrP106-126 umfasst die Aminosäuren 106-126 des Prionproteins und eignet sich auf Grund verschiedener Eigenschaften als gutes Modell: zunächst liegen die Aminosäuren 106-126 in einer stark konservierten Region des Prionproteins, die zudem maßgeblich an der Konformationstransition von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> beteiligt ist. Darüber hinaus weist PrP106-126 eine hohe Tendenz auf,  $\beta$ -Faltblatt Strukturen auszubilden. Auch seine toxische Eigenschaft auf kultivierte Neurone, die, wie bei PrP<sup>Sc</sup>, abhängig von der endogenen Expression von PrP<sup>C</sup> und der Anwesenheit aktivierter Mikroglia ist, machen dieses Peptid zu einem geeigneten Modell (Forloni et al. 1993; Brown et al. 1996).

Der Austausch der Aminosäure Alanin (A) an Position 117 des Prionproteins zu Valin (V) entspricht einer Mutation, die zur GSS-Erkrankung führen kann. Dieselbe Mutation, eingeführt in das Peptid PrP106-126, verstärkt dessen fibrillogene Eigenschaften und wirkt sich zusätzlich verstärkend auf die Neurotoxizität in Zellkulturexperimenten aus (Brown 2000). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit für alle Experimente PrP106-126 A117V als Modell für PrP<sup>Sc</sup> verwendet.

### 1.1.6 Diagnose und Therapiemöglichkeiten

Die Symptomatik von sCJD ist klinisch durch die Kombination von rasch progredienter Demenz und weiteren früh im Krankheitsstadium auftretenden klinischen Symptomen (z.B. Myoklonien) relativ gut von anderen neurodegenerativen Demenzen abzugrenzen (Robillard 2007). Zur Diagnostik gehören neben der Anamnese (mit Erfassen von möglichen, der Erkrankung vorhergegangenen Hormonsubstitutionen und Bluttransfusionen sowie der familiären Belastung) und der körperlichen Untersuchung eine Reihe von Zusatzuntersuchungen, wie die Lumbalpunktion (LP) und Magnetresonanztomographie (MRT) des ZNS. Auch kann die Diagnose durch ein charakteristisches, periodisches Elektroenzephalogramm (EEG) unterstützt werden. Routinemäßig werden mittels der LP bestimmte Biomarker in der Zerebrospinalflüssigkeit (*englisch: cerebrospinal fluid*, CSF) bestimmt, die im Normalfall beim Vorliegen einer Prionerkrankung pathologisch erhöht sind, wie z.B. das 14-3-3 Protein, welches ein Marker für den neuronalen Zelltod darstellt. Hierbei zeigen sich allerdings Unterschiede zwischen den einzelnen Formen der CJDs, da in vCJD und einigen genetischen Formen der Prionerkrankung das 14-3-3 Protein nicht spezifisch erhöht ist (Hsich et al. 1996; Will et al. 2000). Eine definitive Diagnose ist für sCJD über eine Hirnbiopsie und für vCJD, auf Grund der frühen Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in lymphatischem Gewebe, auch über eine Tonsillenbiopsie mög-

lich. Diese Methoden sind jedoch invasiver Natur und ermöglichen eine Diagnose erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung. Es bedarf dringend einer weiteren Diagnosemöglichkeit, insbesondere da vermehrt die Gefahr einer horizontalen Transmission von vCJD durch Bluttransfusionen diskutiert wurde (Foster 2000). Nach heutigem Wissensstand wird die Erkrankung allein durch die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> verursacht. Da weitere messbare Komponenten zur spezifischen Diagnose der Erkrankungen fehlen, ist die Messung von PrP<sup>Sc</sup>-Leveln bisher die einzig denkbare Methode, um die Erkrankung auch frühzeitig schon zu erkennen. PrP<sup>Sc</sup> ist jedoch nur in sehr geringen Mengen in peripheren Geweben, wie z.B. Blut, von asymptomatischen Patienten nachweisbar und auch nach klinischer Manifestation der Erkrankung erreichen die PrP<sup>Sc</sup>-Level kein mit gängigen Methoden detektierbares Niveau. In den letzten Jahren wurden jedoch verschiedene Technologien, wie die Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) und Real-Time Quaking-Induced Conversion (RT-QUIC) entwickelt, die die *in vitro* Amplifikation von PrP<sup>Sc</sup> bis auf detektierbare Mengen ermöglichen (Castilla et al. 2006; Atarashi et al. 2011). Diese Methoden sind jedoch sehr aufwändig und derzeit noch nicht zu diagnostischen Zwecken im Routinebetrieb einsetzbar.

Eine frühe Diagnostik ist nicht nur wichtig, um der Gefahr der horizontalen Transmissionen entgegenzuwirken, sondern auch essentiell für die Entwicklung wirksamer Therapiemöglichkeiten. Dabei liegt der Fokus auf der Detektion von präklinischen Stadien. Derzeit gibt es keine Therapie, die Prionerkrankungen aufhalten beziehungsweise heilen kann. Die bislang eingesetzten und untersuchten Therapeutika zielen zum Großteil darauf ab, die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> auf unterschiedliche Weisen zu unterbinden (Rigter et al. 2010). Einige der bisher getesteten Therapeutika umfassen Amphotericin B, schwefelhaltige Polyanionen, Congo Rot, Anthracyclin, Quinacrin, Flupirtin, Doxyzyklin, Pentosan Polyphosphat,  $\beta$ -sheet breaker Peptide, Memantin, Porphyrin und Phthalocyanin (Dormont 2003; Zerr 2009). Einige dieser Therapeutika wurden sowohl *in vitro* als auch im Tiermodell getestet, manche auch in Einzelfällen an CJD Patienten. Bislang zeigte keines dieser Medikamente einen positiven klinischen Effekt in der Therapie von Prionerkrankungen.

Als weitere Therapiemöglichkeit wurden Immunisierungsstrategien in Betracht gezogen. So zeigten aktive und passive Immunisierungen im Tiermodell positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf, wenn diese frühzeitig, noch vor Ausbruch der Erkrankung, eingesetzt werden (Roettger et al. 2012). Aktive Immunisierungen bergen jedoch ein höheres Risiko für Nebenwirkungen, unter anderem durch den Umstand, dass es sich bei PrP<sup>Sc</sup> um ein Protein mit infektiösem Potential handelt. Darüber hinaus wurde eine Studie zur aktiven Immunisierung bei AD auf Grund von schweren Nebenwirkungen abgebrochen (Schenk 2002). Passive Immunisierungen werden daher zur

Behandlung von Prionerkrankungen bevorzugt in Betracht gezogen. Bislang konnten jedoch keine der passiven Immunisierungsstrategien im Tiermodell positive Effekte verzeichnen, wenn erst nach Auftreten erster Symptome und nicht schon prophylaktisch mit der Behandlung begonnen wurde (Roettger et al. 2012).

## **1.2 Natürlich vorkommende Autoantikörper**

Als passive Immunisierungsstrategie bei Prionerkrankungen und anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der AD und PD, wurden natürlich vorkommende Autoantikörper in Form von intravenösen Immunglobulinen (IVIg) diskutiert (Neff et al. 2008). Natürlich vorkommende Autoantikörper sind ein grundlegender Teil des angeborenen Immunsystems und erfüllen eine Vielzahl immunologischer Aufgaben, da sie einen frühen angeborenen Schutz darstellen. Sie stammen vermutlich von B1-Zellen, die hauptsächlich im Peritonealraum angesiedelt sind und sind normalerweise vom IgM-Isotyp mit einer eher niedrigen Antigen-Bindeaffinität (Baumgarth 2011; Gold et al. 2012). Es wurden jedoch auch Autoantikörper des IgG-Isotyps gefunden, wobei noch nicht geklärt ist, welcher B-Zelle diese Antikörper entstammen (Gold et al. 2012). Natürlich vorkommende Autoantikörper machen etwa zwei Drittel des humanen Immunglobulinpools aus und haben viele Funktionen, die bislang aber bei Weitem nicht vollständig verstanden sind (Shoenfeld et al. 2006). Intravenöse Immunglobuline (IVIg) stellen einen Pool humaner Immunglobuline (hauptsächlich des IgG-Isotyps) dar, der aus Serum von mehreren tausend gesunden Blutspendern gewonnen wird. IVIg wurde initial als Substitutionstherapie für die Behandlung von Immundefizienz-Erkrankungen und später für eine Vielzahl anderer Autoimmunerkrankungen verwendet.

### **1.2.1 nAbs bei AD und PD**

Ein histopathologischer Marker der AD ist die pathologische Ablagerung von Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) im Gehirn erkrankter Patienten. Interessanterweise konnten natürlich vorkommende Autoantikörper gegen A $\beta$  (nAbs-A $\beta$ ) in IVIg festgestellt werden (Dodel et al. 2002) und es wurde gezeigt, dass diese im CSF von AD-Patienten reduziert sind (Du et al. 2001). Daher wurde IVIg als mögliches Therapeutikum zur Behandlung der AD untersucht und diskutiert. In der Tat konnte eine geringfügige Verbesserung in der Kognition von AD-Patienten nach einer Behandlung mit IVIg in zwei unabhängigen Pilotstudien nachgewiesen werden (Dodel et al. 2004; Relkin et al. 2009). Des Weiteren konnte an transgenen CRND8-Mäusen, die auf Grund einer Doppelmutation des Amyloid-Vorläuferproteins eine frühe A $\beta$ -Ablagerung im Gehirn aufweisen, gezeigt

werden, dass eine Behandlung mit nAbs-A $\beta$  nicht nur eine Verbesserung der Pathologie, sondern auch der Kognition bewirkte (Dodel et al. 2011). Nach einer vier-wöchigen Behandlung mit nAbs-A $\beta$  in jungen Tieren wurden neben einer verringerten Anzahl der A $\beta$ -Plaques im Gehirn auch verminderte A $\beta$ -Level im CSF gemessen. Gleichzeitig stiegen die A $\beta$ -Level im Plasma der Mäuse. Dies unterstützt die sogenannte „Peripheral Sink Hypothese“, die besagt, dass durch eine passive Immunisierung das Equilibrium von zentralem und peripherem A $\beta$  gestört wird (DeMattos et al. 2002). Dadurch kommt es nach dieser Hypothese in Folge einer passiven Immunisierung zu einem A $\beta$ -Abfluss von zentral nach peripher. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass nAbs-A $\beta$  in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke, zumindest zu einem geringen Teil, zu überwinden (Bacher et al. 2009). Demnach könnte eine weitere Wirkungsweise von nAbs-A $\beta$  die direkte Interaktion mit schädlichen A $\beta$ -Spezies im Gehirn darstellen. Auch gegen  $\alpha$ -Synuclein, einem pathologisch gefalteten und abgelagerten Protein bei der PD, konnten natürlich vorkommende Autoantikörper (nAbs- $\alpha$ -syn) aus IVIg isoliert werden (Papachroni et al. 2007). In PD-Patienten wurde ebenfalls - verglichen mit gesunden Patienten - ein geringerer Gehalt an nAbs- $\alpha$ -syn in Serum nachgewiesen, wodurch auch hier eine Therapie mit IVIg sinnvoll erscheint (Besong-Agbo et al. 2012).

### **1.2.2 nAbs bei Prionerkrankungen**

Natürlich vorkommende Autoantikörper wurden auch gegen das Prionprotein gefunden (nAbs-PrP) (Wei et al. 2012). Inwieweit nAbs-PrP einen positiven Einfluss auf den Verlauf der Prionerkrankungen haben oder aber diese begünstigen, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht und diskutiert werden.

### **1.3 Die Rolle von Mikrogliazellen bei Prionerkrankungen**

Bei Prionerkrankungen ist in Hirnregionen der Plaquebildung, Vakuolisierung und des Neuronenuntergangs eine starke Aktivierung von Mikrogliazellen zu beobachten (Rezaie et al. 2001). Mikrogliazellen stellen die residenten Immunzellen des Gehirns dar und sind auf Grund ihrer immunmodulatorischen Funktion das Pendant zu Makrophagen in der Peripherie (Walter et al. 2009). Die genaue Funktion der Mikrogliazellen im Verlauf der Prionerkrankung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Zunächst konnten Zellkulturexperimente zeigen, dass Mikrogliazellen sich um fibrilliertes PrP106-126 ansammeln (Ciesielski-Treska et al. 2004) und bei einer kontinuierlichen Behandlung mit PrP106-126 in hohen Konzentrationsbereichen Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO) freisetzen (Giese et al. 1998; Brown 2000). Des Weiteren scheint die

neurotoxische Wirkung von PrP106-126 abhängig von der Anwesenheit von Mikrogliazellen zu sein (Brown et al. 1996). Diese Ergebnisse deuten auf eine inflammatorische Reaktion der Mikrogliazellen hin, die den neuronalen Zelluntergang eher begünstigen. Auf der anderen Seite wurden Mikrogliazellen in Zusammenhang mit einer sogenannten „Clearance“-Funktion, dem Aufräumen von toxischen PrP<sup>Sc</sup> gebracht (Aguzzi et al. 2012; Aguzzi et al. 2012). So konnte eine Internalisierung von PrP106-126 bei Mikrogliazellen, Astrozyten und Neuronen festgestellt werden (McHattie et al. 1999). Darüber hinaus zeigten organotypische Hirnschnitte des Zerebellums einen 15-fachen Anstieg des Prion-Titers nach Depletion von Mikrogliazellen (Falsig et al. 2008). Auch wurde eine insuffiziente Prion-„Clearance“ als mögliche Ursache für das pathologische Anhäufen von PrP<sup>Sc</sup> diskutiert (Hughes et al. 2010). Im Gegensatz zur Notwendigkeit einer endogenen PrP<sup>C</sup> Expression für die toxische Wirkung von PrP106-126 auf Neurone, scheint die Phagozytose von PrP106-126 durch Mikrogliazellen nicht durch PrP<sup>C</sup> vermittelt zu werden (McHattie et al. 1999). Der genaue Mechanismus der Phagozytose ist jedoch noch weitgehend unbekannt und wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.



## 2 Ergebnisse

### Eigene Anteile an den Publikationen

**1. Roettger Y.**, I. Zerr, R. Dodel, J. P. Bach (2013). Prion peptide uptake in microglial cells-the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein.

PLoS One 8(6): e67743

Dieses Projekt wurde von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Jan-Philipp Bach geplant. Ich habe alle Experimente durchgeführt und ausgewertet. Das Manuskript wurde von mir geschrieben und von Prof. Inga Zerr, Dr. Jan-Philipp Bach und Prof. Richard Dodel überarbeitet.

**2. Wei, X., Y. Roettger**, B. Tan, Y. He, R. Dodel, H. Hampel, G. Wei, J. Haney, H. Gu, B. H. Johnstone, J. Liu, M. R. Farlow, Y. Du (2012). Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity.

J Biol Chem 287(16): 12858-66

Dieses Projekt ist in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Dr. Yansheng Du während meines Aufenthaltes an der Indiana University School of Medicine, Indianapolis, USA entstanden. Ich habe die Versuche für die Abbildungen 1, 3, 4a, 4c, 4e, 4f und 5b durchgeführt und das Manuskript zusammen mit Dr. Xing Wei verfasst.

### **2.1 Detektion von nAbs-PrP in humanem Serum, CSF und IVIg**

Natürlich vorkommende Autoantikörper wurden bereits gegen A $\beta$  und  $\alpha$ -Synuclein in humanen Seren und CSF detektiert (Neff et al. 2008). Um zu untersuchen, ob Seren und CSF auch Autoantikörper gegen das Prionprotein enthalten, wurde ein indirekter Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) entwickelt. Zu diesem Zwecke wurden 96-Well Mikrotiterplatten mit dem Peptid PrP106-126 A117V beschichtet. Die optimalen Assay-Bedingungen wurden mit Hilfe verschiedener Beschichtungspuffer, unterschiedlichen Peptid-Konzentrationen sowie einer Vielzahl von Blockierungspuffern zum Blockieren der unspezifischen Bindestellen nach gängigen Methoden bestimmt. Nach Festlegung des optimalen Protokolls wurde die untere Nachweisgrenze, die Verdün-

nungslinearität einzelner Serumproben, die Inter- und Intraassayvarianzen sowie die sogenannte Spike Recovery bestimmt (Daten nicht publiziert). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl humane Seren und CSF als auch IVIg nAbs-PrP enthalten. Diese konnten mittels Affinitätschromatografie unter Verwendung von PrP106-126 A117V aus IVIg aufgereinigt werden. Die negative Fraktion des IVIg wurde als Kontrolle verwendet und im Folgenden als ft-PrP bezeichnet (*englisch: flowthrough*, Durchfluss). nAbs-PrP, ft-PrP und IVIg wurden mittels ELISA auf ihre Affinität zu PrP106-126 A117V getestet (Wei et al. 2012, Fig. 1). Erwartungsgemäß konnte für nAbs-PrP eine hohe, für IVIg eine mittlere und für ft-PrP eine niedrige Affinität zu PrP106-126 A117V gemessen werden (Wei et al. 2012, Fig. 1).

## **2.2 nAbs-PrP erkennen das N-terminale Epitop PrP106-110**

Um das spezifische Epitop von nAbs-PrP einzugrenzen, wurde ein Peptid-Microarray durchgeführt. Hierzu wurden modifizierte Peptide der Sequenz 106-126 des Prionproteins auf einer Zellulosemembran synthetisiert und diese einer Immunfärbung mit nAbs-PrP unterzogen. Es wurden Peptide mit einer Länge von 11 Aminosäuren, die durch Leserasterverschiebungen die gesamte Spanne des Peptides PrP106-126 widerspiegeln, untersucht (Wei et al. 2012, Fig. 3a und b). Hierbei zeigte sich, dass nAbs-PrP das Peptid im N-terminalen Bereich erkennen. Um zu untersuchen, welche der N-terminalen Aminosäuren für die Bindung essentiell sind, wurden einzelne Aminosäuren des Peptides deletiert (Wei et al. 2012, Fig. 3c und d). Hierbei stellte sich das Peptid PrP106-110 mit der Aminosäuren Abfolge KTNMK (K für Lysin, T für Threonin, N für Asparagin und M für Methionin) als das kleinstmögliche Peptid heraus, welches von nAbs-PrP erkannt wird. Des Weiteren scheinen die beiden Lysine in diesem Motiv kritisch für das Erkennen der nAbs-PrP zu sein, da eine Substitution oder Deletion dieser Aminosäuren die Bindung komplett verhinderte (Wei et al. 2012, Fig. 3d).

## **2.3 nAbs-PrP hemmen die Fibrillation und Neurotoxizität von PrP106-126 A117V**

Die Tendenz zur Fibrillenbildung wurde bereits für die Peptide PrP106-126 und PrP106-126 A117V beschrieben (Brown 2000). Um den Einfluss von nAbs-PrP auf die Fibrillenbildung zu untersuchen, wurden fluorometrische Messungen (Thioflavin-T Färbung), Elektronenmikroskopie und Massenspektrometrie durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Fibrillation von PrP106-126 A117V dosisabhängig von

nAbs-PrP gehemmt wird (Wei et al. 2012, Fig. 4a). ft-PrP konnte die Fibrillation nicht signifikant hemmen (Wei et al. 2012, Fig. 4c). Diese Ergebnisse wurden mittels Elektronenmikroskopie und Massenspektrometrie verifiziert (Wei et al. 2012, Fig. 4e und f). Um die Toxizität des fibrillierten Peptides auf primäre granuläre zerebelläre Neurone (*englisch: cerebellar granule neurons*, CGNs) zu untersuchen, wurden diese mit den fibrillierten Peptiden und einem Peptid, welches aus einer vertauschten Sequenz von PrP106-126 besteht und als Negativkontrolle diente (sogenanntes scrambled PrP), behandelt. Es konnte eine signifikante Toxizität von PrP106-126 A117V festgestellt werden. Scrambled PrP war nicht toxisch auf CGNs (Wei et al. 2012, Fig. 5b). Die toxische Eigenschaft des fibrillierten Peptides PrP106-126 A117V konnte durch eine zeitgleiche Behandlung mit nAbs-PrP, nicht jedoch mit ft-PrP aufgehoben werden (Wei et al. 2012, Fig. 6).

#### **2.4 nAbs-PrP verstärken die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen**

Die Aufnahme von PrP106-126 durch Neurone, Mikroglia und Astrozyten wurde bereits beschrieben (McHattie et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von nAbs-PrP auf die Aufnahme von PrP106-126 A117V in primären Mikrogliazellen untersucht. Eine Kinetik zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Phagozytose zeigte, dass nach drei Stunden ca. 50% der maximalen Peptidaufnahme erreicht war (Roettger et al. 2013, Fig. 2a). Auf Grundlage dieser Inkubationszeit wurde der Einfluss von nAbs-PrP, ft-PrP und einem monoklonalen anti-Prion-Antikörper (3F4) auf die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen untersucht. Die Behandlung mit nAbs-PrP und dem Antikörper 3F4 führte zu einer signifikanten Mehraufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen, wohingegen ft-PrP kaum einen Einfluss auf die Peptidaufnahme hatte (Roettger et al. 2013, Fig. 2b und c). Neben der Aufnahme des Peptides wurde außerdem die Aufnahme der Antikörper (nAbs-PrP und ft-PrP) in Mikrogliazellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen sowohl mit den Antikörpern alleine als auch mit einer Kombination aus Peptid und Antikörper behandelt. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass Mikrogliazellen sowohl nAbs-PrP als auch ft-PrP per se in einer vergleichbaren Menge aufnehmen. Durch die Ko-Inkubation mit PrP106-126 A117V nahm jedoch die intrazelluläre Aufnahme von nAbs-PrP im Vergleich zu ft-PrP stark zu (Roettger et al. 2013, Fig. 2d).

Um zu untersuchen, ob die Aufnahme von PrP106-126 A117V mit und ohne Antikörper schädliche Auswirkungen auf Mikrogliazellen hat, beziehungsweise eine Entzündungsreaktion induziert, wurden verschiedene Entzündungsfaktoren und die Vitalität der Zel-

len bestimmt. Als Negativkontrolle dienten in allen Versuchen Mikrogliazellen, die unter sonst vergleichbaren Bedingungen lediglich mit Verdünnungspuffer behandelt wurden. Es konnte nach einer Behandlung der Mikrogliazellen mit den verschiedenen Peptidpräparationen keine Ausschüttung der Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) sowie von NO festgestellt werden (Roettger et al. 2013, Fig. 3c und d). Zur weiteren Untersuchung sowie zum Vergleich der Reaktion der Mikrogliazellen auf die Behandlung mit PrP106-126 A117V alleine, PrP106-126 A117V mit und ohne Antikörper (nAbs-PrP, ft-PrP) sowie Antikörper alleine (nAbs-PrP, ft-PrP), wurde ein MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay durchgeführt. Dieser kann Aufschluss über die mitochondriale Aktivität von Zellen geben. Nach Behandlung der Mikrogliazellen mit PrP106-126 A117V konnte im Vergleich zu der Negativkontrolle eine leichte Reduktion im MTT-Assay festgestellt werden. Diese wurde durch die Ko-Inkubation mit nAbs-PrP noch etwas verstärkt (Roettger et al. 2012, Fig. 3a). nAbs-PrP und ft-PrP alleine hatten keinerlei Auswirkungen auf die Zellen. Da der MTT-Assay bezüglich amyloidogener Peptide in seiner Aussagekraft limitiert ist (Liu et al. 1997), wurde eine weitere Methode angewandt und die Zellen mit Fluoreszeindiazetat/ Propidium-Iodid (FDA/PI) gefärbt, um anschließend die Zahl der lebendigen Zellen zu bestimmen. Es konnte kein Zelltod nach Behandlung der Zellen festgestellt werden, es zeigte sich hingegen eine leichte Proliferation der Mikrogliazellen (Roettger et al. 2012, Fig. 3b). Darüber hinaus wurden primäre Neurone mit sogenannten „konditioniertem Mikroglia-medium“ behandelt. Dieses entspricht dem Medium von Mikrogliazellen, die mit den unterschiedlichen Peptidpräparationen behandelt wurden. Die Behandlung von primären Neuronen mit konditioniertem Mikroglia-medium hatte keinerlei schädigende Wirkung auf die Viabilität der Neuronenkulturen (Roettger et al. 2013, Fig. 3e).

## **2.5 Untersuchung des Aufnahmemechanismus in Mikrogliazellen**

Um zu untersuchen, über welchen Mechanismus PrP106-126 A117V von Mikrogliazellen aufgenommen wird, wurden verschiedene Phagozytose-Inhibitoren eingesetzt. Cytochalasin D, welches die Depolymerisation von Aktin und damit allgemein die phagozytotische Aktivität von Zellen weitgehend hemmt (Axline et al. 1974; Drevets et al. 1991), führte zu einer fast vollständigen Inhibition der Aufnahme von PrP106-126 A117V. Dies war unabhängig davon, ob das Peptid den Zellen alleine, mit oder ohne nAbs-PrP und ft-PrP präsentiert wurde (Roettger et al. 2013, Fig. 4a). Die Behandlung mit Wortmannin, einem Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) Inhibitor (Powis et al. 1994), führte zu einer starken Inhibition der Aufnahme von PrP106-126 A117V, wenn

dies den Zellen zusammen mit nAbs-PrP verabreicht wurde. Die Aufnahme von PrP106-126 A117V allein und zusammen mit ft-PrP war nur leicht reduziert (Roettger et al. 2013, Fig. 4b). Die Behandlung mit Fucoïdan, einem Inhibitor der Scavenger Rezeptoren A und B (Husemann et al. 2002), führte zu einer signifikanten Reduktion der Aufnahme von PrP106-126 A117V, wohingegen die Aufnahme von PrP106-126 A117V zusammen mit nAbs-PrP und ft-PrP weniger stark vermindert wurde (Roettger et al. 2013, Fig. 4c). Diese konnte jedoch durch eine gleichzeitige Behandlung der Mikrogliazellen mit Fucoïdan und Wortmannin drastisch reduziert werden. Hierbei hatte die Behandlung mit den beiden Inhibitoren stärkeren Einfluss auf die Aufnahme der Ko-Präparation von PrP106-126 A117V mit nAbs-PrP als auf die Ko-Präparation mit ft-PrP (Roettger et al. 2013, Fig. 4d).

Es wurde außerdem der Einfluss der Phagozytose-Inhibitoren auf die Aufnahme von nAbs-PrP und ft-PrP in Mikrogliazellen untersucht. Alle eingesetzten Inhibitoren hatten eine generelle inhibitorische Wirkung auf die Aufnahme von nAbs-PrP, nicht aber auf ft-PrP, wenn diese zusammen mit PrP106-126 A117V zu den Zellen gegeben wurde. Die Aufnahme von nAbs-PrP und ft-PrP ohne PrP106-126 A117V wurde nur durch Wortmannin gehemmt (Roettger et al. 2013, Fig. 5).

## 3 Diskussion

### 3.1 Nachweis von nAbs-PrP in Serum, CSF und IVIg

Immunisierungsstrategien zur Behandlung von Prionerkrankungen werden schon seit einiger Zeit diskutiert (White et al. 2003). In Zellkulturexperimenten und Maus-Modellen zeigten sowohl aktive als auch passive Immunisierungsstrategien einen positiven Effekt auf den Verlauf der Krankheit (Roettger et al. 2012). Aktive Immunisierungen bringen jedoch häufig die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen mit sich. Im Falle der Prionerkrankung sind sie von besonderer Schwierigkeit gekennzeichnet, da die Erkrankung durch ein körpereigenes Protein ausgelöst wird und eine Immunisierung mit dem Prionprotein zu keiner Immunantwort führt. Daher muss zunächst durch potente Immunisierungsstrategien die sogenannte Selbsttoleranz überwunden werden. Passive Immunisierungen erscheinen somit als sinnvoller.

Aktive und passive Immunisierungsstrategien wurden schon zur Behandlung von AD und PD in Betracht gezogen (Benner et al. 2004; Citron 2004). Darüber hinaus wurden natürlich vorkommende Autoantikörper gegen A $\beta$  und  $\alpha$ -Synuclein beschrieben und als mögliche Therapeutika diskutiert (Neff et al. 2008).

Bei der AD und PD konnte festgestellt werden, dass Patientenserum geringere Level an nAbs verglichen mit Serum von Gesunden enthält (Du et al. 2001; Weksler et al. 2002). Es wird vermutet, dass durch niedrige nAbs-Level die „Clearance“ der Aggregate eingeschränkt ist und somit der Ausbruch bzw. Fortschritt der Erkrankung begünstigt wird (Neff et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnten nAbs-PrP in Serum und CSF von gesunden Probanden nachgewiesen werden und diese aus IVIg mittels Affinitätschromatografie isoliert werden (Wei et al. 2012). Der Nachweis von nAbs-PrP in humanem Serum und CSF von gesunden Spendern deutet darauf hin, dass die Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup> im Körper möglicherweise durch das Abfangen von fehlgefalteten Konformeren streng geregelt ist. So könnten nAbs-PrP einen wichtigen Beitrag zur Homöostase der Prionproteinkonformere leisten und das Äquilibrium in Richtung PrP<sup>C</sup> stabilisieren. Es ist jedoch bisher unbekannt, ob erkrankte Patienten im Gegensatz zu Gesunden eine veränderte Menge an nAbs-PrP in Serum und CSF aufweisen. Diese Untersuchungen werden gerade in unserem Labor weiter verfolgt.

Der Nachweis von nAbs-PrP in IVIg und die Möglichkeit, diese aufzureinigen und anzureichern, könnte zur Entwicklung einer passiven, auf humanen Autoantikörper basierenden Immuntherapie bei Prionerkrankungen beitragen.

IVIg wurde schon erfolgreich in Pilotstudien zur Behandlung von AD getestet (Dodel et al. 2004; Relkin et al. 2009; Dodel et al. 2013) und die Behandlung von transgenen

CRND8 Mäusen mit nAbs-A $\beta$  zeigten vielversprechende Ergebnisse (Dodel et al. 2011). Eine passive Immunisierung mit IVIg oder nAbs hat im Gegensatz zu passiven Immunisierungen mit monoklonalen Antikörpern den Vorteil eines verringerten Risikos von gefährlichen Nebenwirkungen. Die Behandlung von AD-Patienten mit IVIg zeigte eine gute Verträglichkeit des Präparates, führte jedoch in dem kurzen Untersuchungsintervall von sechs Monaten zu keiner Verbesserung der Kognition bei den behandelten Patienten (Dodel et al. 2013). Es wurde diskutiert, dass ein therapeutisches Eingreifen zu einem früheren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf hätte stattfinden müssen. Daher erscheint eine Früherkennung der Erkrankung von großer Wichtigkeit zu sein. Dies ist auch für die Behandlung von Prionerkrankungen von besonderer Bedeutung. Durch die frühe Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> in peripheren Geweben bei vielen Prionerkrankungen erscheinen Immunisierungsstrategien zusätzlich sinnvoll.

### **3.2 nAbs-PrP hemmen die Fibrillation und Neurotoxizität von PrP106-126 A117V**

Die Toxizität von PrP106-126 und PrP106-126 A117V auf Neurone wurde bereits mehrfach beschrieben (Forloni et al. 1993; Brown 2000; Hanan et al. 2001). Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass PrP106-126 in gleicher Weise wie PrP<sup>Sc</sup> die Fehlfaltung von PrP<sup>C</sup> bewirken kann (Gu et al. 2002; Singh et al. 2002). Es wird jedoch seit einiger Zeit angenommen, dass nicht PrP<sup>Sc</sup> Aggregate, sondern mutmaßliche oligomere Zwischenprodukte für die Toxizität verantwortlich sind (Radford et al. 2010). Es wurde weiterhin diskutiert, dass eine, durch PrP<sup>Sc</sup> Oligomere vermittelte, Dimerisierung von PrP<sup>C</sup> eine toxische intrazelluläre Kaskade auslösen kann (Solforosi et al. 2004).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zunächst, dass nAbs-PrP die Fibrillation von PrP106-126 A117V hemmen. Des Weiteren wird die Toxizität von fibrilliertem PrP106-126 A117V auf primäre Neurone durch nAbs-PrP drastisch vermindert. Dies konnte auch schon mit monoklonalen anti-PrP Antikörpern gezeigt werden (Hanan et al. 2001). In den vorliegenden Versuchen wurde die Toxizität durch eine Behandlung der Zellen mit fibrilliertem PrP106-126 A117V erreicht. Dies widerspricht zunächst der Annahme, dass oligomere Zwischenprodukte und nicht fibrilläre Aggregate die eigentliche toxische Spezies bei Prionerkrankungen sind (Radford et al. 2010) und lässt vermuten, dass PrP106-126 A117V-Fibrillen an sich neurotoxisch sind. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass zum Zeitpunkt der Behandlung der Zellen der Oligomerisations- und Fibrillationsprozess von PrP106-126 A117V vollständig beendet ist. Es ist wahrscheinlicher, dass ein Gemisch aus Fibrillen und oligomeren Zwischenprodukten vorliegt. Es konnte in der vorliegenden Arbeit zwar gezeigt werden, dass nAbs-PrP während des

Fibrillationsprozesses eingreifen, jedoch ist der genaue Mechanismus noch weitgehend unklar. nAbs-PrP könnten demnach entweder nur die Zusammenlagerung von PrP106-126 A117V in Fibrillen durch Interkalation verhindert, oder aber direkt kleine Oligomere dauerhaft binden und abfangen. Letzteres erscheint wahrscheinlicher und wurde durch die Ergebnisse aus den Versuchen zur Aufnahme in Mikrogliazellen unterstützt (siehe dazu Diskussionsteil 3.3). Darüber hinaus ist weiter unklar, durch welchen Mechanismus nAbs-PrP die Toxizität von PrP106-126 A117V auf Neurone verhindern. Zum einen könnte dies durch das direkte Binden und Abfangen kleiner Oligomere vermittelt werden, wodurch diese nicht mehr toxisch auf die Zellen wirken können. Auf der anderen Seite könnten nAbs-PrP auch direkt auf die Zellen wirken, z.B. in dem sie eine Interaktion der toxischen Oligomere mit PrP<sup>C</sup> an Rezeptoren der Zellmembran verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Versuche mit dem Peptid PrP106-126 A117V durchgeführt. Vorläufige eigene Daten konnten jedoch auch ein Binden von nAbs-PrP an das rekombinante humane Prionprotein der Länge 23-231 (PrP<sup>23-231</sup>) zeigen (eigene Arbeiten, nicht publiziert). Darüber hinaus konnte Wei et al. zeigen, dass mittels nAbs-PrP PrP(A117V) aus transgenen Mäusen per Immunopräzipitation aufgereinigt werden kann (Wei et al. 2012). Dies lässt darauf schließen, dass nAbs-PrP in der Lage sind, PrP<sup>Sc</sup> zu erkennen und zu binden. Es wäre daher interessant, die Auswirkungen von nAbs-PrP auch auf die Fibrillenbildung von PrP<sup>Sc</sup> und dessen Neurotoxizität weiter zu untersuchen.

### **3.3 nAbs-PrP verstärken die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen**

In der Pathologie der Prionerkrankung spielen Mikrogliazellen eine wichtige, aber bisher kontrovers diskutierte Rolle. Zunächst wurde gezeigt, dass Mikrogliazellen in Prionerkrankungen in Bereichen der Vakuolisierung und Plaquebildung stark aktiviert sind (Rezaie et al. 2001). Darüber hinaus konnte das Mitwirken von Mikrogliazellen bei der Vermittlung der neurotoxischen Wirkung von PrP106-126 in Zellkulturexperimenten gezeigt werden (Brown et al. 1996). Auf der anderen Seite wird Mikrogliazellen eine wichtige Rolle in der Prion-„Clearance“ zugeschrieben (Aguzzi et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen PrP106-126 phagozytieren können und diese Aufnahme unabhängig von der endogenen PrP<sup>C</sup> Expression in Mikrogliazellen ist (McHattie et al. 1999).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Vermutung, dass Mikrogliazellen in die Prion-„Clearance“ involviert sind. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt



werden, dass nAbs-PrP die Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen drastisch steigern. Dieser Effekt war spezifisch für nAbs-PrP und nicht mit ft-PrP zu erreichen. Die Aufnahme von 10  $\mu$ M PrP106-126 A117V führte weder zu einer Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen noch von NO und lässt darauf schließen, dass die Aufnahme von PrP106-126 A117V physiologisch vorteilhaft ist. Auch nAbs-PrP und ft-PrP alleine führten zu keiner inflammatorischen Reaktion von Mikrogliazellen. Besonders für den potentiellen Einsatz von nAbs-PrP als passive Immunisierungstherapie ist das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion essentiell. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Gegensatz zu anderen Studien, die eine Aktivierung der Mikrogliazellen nach kontinuierlicher Gabe hoher Peptid-Konzentrationen (80  $\mu$ M) messen konnten (Peyrin et al. 1999; Fabrizi et al. 2001). Diese abweichenden Effekte könnten auf die unterschiedlich eingesetzten Peptid-Mengen zurückzuführen sein. Dabei scheinen erst hohe PrP106-126 A117V-Konzentrationen eine Entzündungsreaktion in Mikrogliazellen zu induzieren. In der vorliegenden Arbeit wurde mittels eines MTT-Assays zur Messung der mitochondrialen Aktivität zunächst die Reaktion der Mikrogliazellen auf die Behandlung mit PrP106-126 A117V alleine, PrP106-126 A117V zusammen mit nAbs-PrP und ft-PrP, sowie nAbs-PrP und ft-PrP alleine untersucht und verglichen. Es konnte eine Reduktion im MTT-Assay bei einer Behandlung mit PrP106-126 A117V festgestellt werden, die zusätzlich durch eine Ko-Inkubation mit nAbs-PrP leicht verstärkt wurde. Die Behandlung mit nAbs-PrP und ft-PrP alleine hatte keinerlei Auswirkungen auf die Zellen. Da amyloidogene Peptide direkt in den funktionalen Ablauf von MTT-Assays eingreifen und somit deren Ergebnisse verfälschen können (Liu et al. 1997), wurde eine weitere Methode zur Messung der Vitalität der Zellen nach Behandlung mit PrP106-126 A117V durchgeführt. Anhand einer Färbung mit FDA/PI konnte eine leicht erhöhte Zellzahl nach Behandlung mit PrP106-126 A117V festgestellt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit Studien von Brown et al. überein, die eine Prionpeptid-induzierte Proliferation von Mikrogliazellen beschreiben (Brown et al. 1996). Auch die Behandlung von Mikrogliazellen mit nAbs-PrP alleine resultierte nicht in einer Entzündungsreaktion oder Vitalitätseinschränkung der Mikrogliazellen. Darüber hinaus hatte die Behandlung von Neuronen mit konditioniertem Mikroglia-medium keinerlei schädliche Auswirkungen auf deren Viabilität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nAbs-PrP zu der Funktion von Mikrogliazellen in der Prion-„Clearance“ beitragen können, ohne dabei schädliche Entzündungsreaktionen hervorzurufen. Dies scheint besonders für geringe Peptidkonzentrationen zu gelten. Demnach könnten nAbs-PrP gerade frühen Prion-Akkumulationen entgegen wirken. Eine Akkumulation von PrP<sup>Sc</sup> ist erst zu späten Krankheitsstadien im ZNS detektierbar, was auf geringe PrP<sup>Sc</sup>-Mengen bei Krankheitsbeginn im ZNS schließen lässt. In diesem Zeitraum könnten nAbs-PrP, den vorliegen-

den Ergebnissen zufolge, unterstützend auf die Prion-„Clearance“ wirken. Bei hoher PrP<sup>Sc</sup>-Akkumulation im ZNS, begleitet von einer Mikrogliaaktivierung zu späteren Stadien der Erkrankung, könnte sich dieser Effekt jedoch umkehren.

Es wurde weiterhin untersucht, inwieweit nAbs-PrP bzw. ft-PrP selbst von Mikrogliazellen aufgenommen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass nAbs-PrP (allein verabreicht) unwesentlich mehr aufgenommen werden als ft-PrP. Werden Mikrogliazellen jedoch mit nAbs-PrP bzw. ft-PrP und PrP106-126 A117V als Ko-Präparation behandelt, werden nAbs-PrP sehr viel stärker aufgenommen, verglichen mit einzeln verabreichten nAbs-PrP und ft-PrP. nAbs-PrP scheinen also im Gegensatz zu ft-PrP gemeinsam mit dem Peptid aufgenommen zu werden. Dies lässt vermuten, dass nAbs-PrP während der Ko-Inkubation mit PrP106-126 A117V die Fibrillenbildung des Prionpeptids nicht nur hemmen, sondern kleine Oligomere binden und mit diesen zusammen von Mikroglia phagozytiert werden. Dies wäre von besonderem Vorteil, betrachtet man die Annahme, dass kleine Intermediate des Fibrillationsvorganges für die Neurotoxizität bei Prionerkrankungen verantwortlich sind (Radford et al. 2010). Demnach scheinen nAbs-PrP hemmend auf die pathologischen Fibrillation von PrP106-126 A117V zu wirken und, nicht zuletzt durch die Aufnahme in Mikrogliazellen, der Toxizität auf Neurone entgegenzuwirken.

### ***3.4 Der Aufnahmemechanismus von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen***

Der genaue Aufnahmemechanismus von Prionpeptiden in Mikrogliazellen ist bisher noch weitgehend unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser durch den Einsatz verschiedener Blocker untersucht. Es wurden drei einzeln verabreichte Inhibitoren (Cytochalasin D, Fucoïdan, Wortmannin) und eine Kombination aus zwei Inhibitoren (Fucoïdan und Wortmannin) eingesetzt und die Phagozytose der Peptid-Präparationen (fibrilliertes PrP106-126 A117V alleine, PrP106-126 A117V zusammen mit nAbs-PrP und ft-PrP) sowie der Antikörper (nAbs-PrP und ft-PrP) untersucht. Die verschiedenen Inhibitoren wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: Cytochalasin D wurde auf Grund seiner generellen inhibitorischen Eigenschaften auf die Aktinpolymerisation sowie die Scavenger-, Komplement-, und Fcγ-Rezeptor-vermittelten Phagozytose ausgewählt (Axline et al. 1974; Drevets et al. 1991). Demnach konnte durch den Einsatz von Cytochalasin D zunächst ermittelt werden, ob die Aufnahme von PrP106-126 A117V generell durch Phagozytose und im speziellen durch einen oder mehrerer dieser Mechanismen vermittelt wird. Die inhibitorische Wirkung von Fucoïdan auf die Aufnahme von fibrilliertem Aβ wurde bereits beschrieben (Husemann et al. 2002; Koenigs-

knecht et al. 2004) und sollte in dieser Arbeit bezüglich fibrilliertem PrP106-126 A117V untersucht werden. Durch die inhibitorische Wirkung von Fucoïdan auf die Scavenger Rezeptoren A und B sollte somit eine mögliche Phagozytose über diesen Aufnahmemechanismus untersucht werden. Um den Einfluss von nAbs-PrP auf die Phagozytose von PrP106-126 A117V zu untersuchen, wurde Wortmannin, ein bekannter Inhibitor der PI3K, welche in Zusammenhang mit der Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose steht, eingesetzt (Powis et al. 1994; Araki et al. 1996; Garcia-Garcia et al. 2002).

Es konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Cytochalasin D die Phagozytose aller drei Peptid-Präparationen inhibiert. Dies lässt sich durch die oben genannte Cytochalasin D-induzierte Blockade der Aktinpolymerisation erklären (Axline et al. 1974; Drevets et al. 1991). Eine funktionelle Polymerisation des Aktins stellt eine, für die Phagozytose wichtige Grundvoraussetzung für die Umstrukturierung des Zytoskeletts dar (Newman et al. 1991; Sulahian et al. 2008). Des Weiteren war die Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V nach einer Behandlung mit Fucoïdan stark vermindert. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch Studien zur Aufnahme von A $\beta$  in Mikrogliazellen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass fibrilliertes A $\beta$  ebenfalls über Scavenger Rezeptoren von Mikrogliazellen phagozytiert wird (Husemann et al. 2002; Koenigsknecht et al. 2004). Die Behandlung mit Fucoïdan führte, verglichen mit der Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V, nur zu einer leicht abgeschwächten Aufnahme der Ko-Präparation von PrP106-126 A117V mit nAbs-PrP und ft-PrP. Die Phagozytose der Ko-Präparation von PrP106-126 A117V mit nAbs-PrP konnte jedoch mit Wortmannin stark vermindert werden. Da die durch Wortmannin gehemmte PI3K während des phagozytotischen Prozesses bei dem Ausbilden von Pseudopodien eine Rolle spielt und in Zusammenhang mit Fc-Rezeptor-vermittelter Phagozytose gebracht wird (Araki et al. 1996; Garcia-Garcia et al. 2002), lässt dieses Ergebnis auf eine Fc-Rezeptor-vermittelte Aufnahme schließen. Da die Aufnahme von fibrilliertem Peptid hauptsächlich durch Fucoïdan inhibiert wird, die Aufnahme von PrP106-126 A117V mit nAbs-PrP jedoch stark durch Wortmannin beeinflusst wird, scheinen hier zwei verschiedene Mechanismen eine Rolle zu spielen. Diese Annahme wird unterstützt durch die Ergebnisse einer Doppelbehandlung mit Fucoïdan und Wortmannin. Vergleicht man die Peptidaufnahme nach einer Fucoïdan Behandlung mit der Aufnahme nach einer Doppelbehandlung mit Fucoïdan und Wortmannin, so erkennt man, dass eine zusätzliche Gabe von Wortmannin nur die Aufnahme der Ko-Präparation von PrP106-126 A117V und nAbs-PrP deutlich reduziert. Die Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V wird durch zusätzlich verabreichtes Wortmannin nicht beeinflusst. Dies lässt weiter darauf schließen, dass der durch nAbs-PrP vermittelten Aufnahme von PrP106-

126 A117V ein anderer oder zusätzlicher Mechanismus zugrunde liegt, als der Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V. Die Phagozytose der Ko-Präparation von PrP106-126 A117V mit ft-PrP verhielt sich im Falle der alleinigen Behandlung mit Wortmannin, sowie der Doppelbehandlung mit Fucoidan und Wortmannin, sehr ähnlich zu fibrilliertem PrP106-126 A117V. Dies lässt darauf schließen, dass ft-PrP wie erwartet keinen Einfluss auf die fibrilläre Struktur des Peptids und dessen Aufnahme in Mikrogliazellen hat. Die Behandlung mit Fucoidan zeigte jedoch einen stärkeren inhibitorischen Effekt auf die Aufnahme des fibrillierten Peptids als auf die Ko-Präparation mit ft-PrP, was wiederum gegen diese Hypothese spricht. Demnach müsste noch genauer untersucht werden, inwieweit ft-PrP bei der durch Scavenger Rezeptoren vermittelten Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V eine Rolle spielt oder in diesen Prozess interkaliert. Die Behandlung mit Fucoidan zeigte zwar unterschiedlich starke inhibitorische Effekte auf die Aufnahme der verschiedenen Peptidpräparationen, wirkt jedoch bei allen drei hemmend. Dies könnte nicht zuletzt darauf hinweisen, dass nAbs-PrP zwar prinzipiell hemmend auf die Fibrillenbildung wirken, diese aber nicht komplett unterbunden wird und somit fibrilläre Strukturen übrigbleiben. Diese können dann über Scavenger Rezeptoren von Mikrogliazellen aufgenommen werden.

Um diesen Fragen weiter nachzugehen, wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Auswirkung der Inhibitoren auf die Aufnahme von nAbs-PrP und ft-PrP untersucht. Dies ergab zunächst, dass nur eine Behandlung mit Wortmannin zu einer reduzierten Aufnahme von nAbs-PrP und ft-PrP führt, wenn diese der Mikroglia alleine verabreicht wurden. Wortmannin hemmt unter anderem die Fc-Rezeptor-vermittelte Phagozytose (Powis et al. 1994; Araki et al. 1996). Dies könnte bedeuten, dass Mikrogliazellen nAbs-PrP und ft-PrP per se durch Fc-Rezeptoren vermittelt phagozytieren. Wurden jedoch Mikrogliazellen mit Ko-Präparationen von PrP106-126 A117V und nAbs-PrP bzw. ft-PrP behandelt, verminderten alle drei Inhibitoren die Aufnahme von nAbs-PrP, nicht aber die von ft-PrP. Dies ließe sich wie folgt erklären: nAbs-PrP, nicht aber ft-PrP, sind in der Lage, die Fibrillation von PrP106-126 A117V zu hemmen und kleine intermediäre Zwischenprodukte (z.B. Oligomere) zu binden. Diese werden dann, zusammen mit den gebundenen nAbs-PrP, von Mikrogliazellen phagozytiert. Durch den Einsatz von Phagozytose-Inhibitoren, die hemmend auf die Aufnahme von PrP106-126 A117V wirken, wird dementsprechend auch die Aufnahme von nAbs-PrP gehemmt. Die Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass die Behandlung mit Fucoidan hauptsächlich die Aufnahme von fibrilliertem Prionpeptid inhibiert, jedoch ist dieser Effekt nicht hochspezifisch; auch die Aufnahme der Ko-Präparationen von PrP106-126 A117V mit nAbs-PrP und ft-PrP wurde durch Fucoidan teilweise reduziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben erste Hinweise auf die Mechanismen, die der Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V alleine, sowie der Aufnahme von PrP106-126 A117V in Kombination mit nAbs-PrP bzw. ft-PrP zugrunde liegen. Um detailliertere Aussagen über den genauen Aufnahmemechanismus der einzelnen Peptidpräparationen machen zu können, müssten jedoch noch eine Reihe weiterer Inhibitoren getestet werden. In Anlehnung an die Untersuchungen zur Aufnahme von fibrilliertem A $\beta$  könnten so zunächst die für die Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V verantwortlichen Rezeptoren genauer eingegrenzt werden. Neben der Aufnahme über Scavenger Rezeptoren wurden für fibrilliertes A $\beta$  noch weitere Komponenten beschrieben, die die Aufnahme in Mikrogliazellen beeinflussen. Diese sind der B-Klassen Scavenger Rezeptor CD36,  $\beta$ -1 Integrin und CD47 (Koenigsknecht et al. 2004). Für diese Rezeptoren stehen eine Reihe von Inhibitoren zur Verfügung, die auch zur Untersuchung der Aufnahme von fibrilliertem PrP106-126 A117V getestet werden könnten. Des Weiteren könnte zur Untersuchung der Antikörper-vermittelten Aufnahme von PrP106-126 A117V in Mikrogliazellen der Einfluss der Tyrosinkinasen Syk und Src untersucht werden. Diese sind wichtige Komponenten der Fc $\gamma$ -Rezeptor-vermittelten Phagozytose (Greenberg 1995) und tragen zur Antikörper-vermittelten Phagozytose von fibrilliertem A $\beta$  bei (Koenigsknecht et al. 2004).

Es ist zwar weitgehend bekannt, dass alle verfügbaren pharmakologischen Inhibitoren nicht absolut spezifisch für einen bestimmten Phagozytosemechanismus sind (Ivanov 2008), jedoch können sie, in Kombination eingesetzt, dazu beitragen, den Aufnahmemechanismus weiter zu differenzieren.

### **3.5 Untersuchung des nAbs-PrP Bindemotivs**

Antikörper erkennen im Allgemeinen relativ kurze Sequenzen eines großen Moleküls, wie z.B. eines Proteins. Diese sogenannten Epitope können entweder aus einem einzigen Segment des Proteins (kontinuierliches oder lineares Epitop) oder aus verschiedenen Teilen des Proteins, die durch Faltungsvorgänge nebeneinander zu liegen kommen (Konformations- oder diskontinuierliche Epitope), bestehen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Epitop von nAbs-PrP genauer untersucht. Es konnte zunächst gezeigt werden, dass nAbs-PrP aus IVIg mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt werden können. Hierfür wurden die Peptide PrP106-126 und PrP106-126 A117V herangezogen. Dass mit beiden Peptiden gleichermaßen nAbs-PrP aus IVIg isoliert werden konnten, zeigt, dass die Mutation an Position 117 die Bindungseigenschaften von nAbs-PrP nicht maßgeblich beeinflusst. Um das Epitop genauer einzugrenzen, wurde mit PrP106-126 ein sogenanntes Epitopmapping durchgeführt. Mit Hilfe dieses

Epitopmappings konnte die Epitopsequenz auf fünf Aminosäuren eingegrenzt werden. Das mutmaßliche Epitop liegt in der N-terminalen Region des Peptids und umfasst das Aminosäuremotiv KTNMK. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die beiden Lysine für das Erkennen der nAbs-PrP von besonderer Bedeutung sind: die Substitution eines der Lysine mit einem Alanin führte zu einer kompletten Aufhebung der Bindung. Das Ergebnis des Epitopmappings legt die Vermutung nahe, dass es sich bei der Bindung von nAbs-PrP an PrP106-126 um ein lineares Epitop von fünf Aminosäuren handelt. Die Region um die Aminosäuren 106-126 ist eine, für die Fibrillation des Prionproteins wichtige Region. Dass diese von nAbs-PrP spezifisch erkannt wird, lässt vermuten, dass nAbs-PrP, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, eine wichtige Rolle beim Prionstoffwechsel einnehmen können. Da das Binden der nAbs-PrP in einer Region des Prionproteins (106-110) stattfindet, in der keine bekannten Mutationen der hereditären Prionerkrankungen liegen, könnten nAbs-PrP als Therapiemöglichkeit für alle bekannten Prionerkrankungen wirksam sein.

Bei Bindungsstudien zu A $\beta$  konnte bereits gezeigt werden, dass A $\beta$  von nAbs-A $\beta$  C-terminal erkannt wird (Dodel et al. 2011). Es scheint sich dabei, wie bei nAbs-PrP, auch um ein lineares Epitop zu handeln, welches die Aminosäuren 28-40 umfasst. Darüber hinaus konnte jedoch gezeigt werden, dass nAbs-A $\beta$  bevorzugt dimere und trimere Formen des A $\beta$  erkennen und binden (Dodel et al. 2011). Dies wiederum legt das Erscheinen eines, vielleicht durch den Oligomerisationsprozess hinzukommenden Konformationsepitopes für nAbs-A $\beta$  nahe.

Die Generation von natürlich vorkommenden Autoantikörpern stellt für den Körper einen enormen Aufwand dar. Betrachtet man die vielen verschiedenen Erkrankungen, die durch die Fehlfaltung und Anhäufung körpereigener Proteine hervorgerufen werden können (AD, PD, Prionerkrankung), erscheint es als wenig sinnvoll, dass jede dieser Erkrankungen mit der Generation eines spezifischen natürlichen Autoantikörpers einhergeht. Dies legt die Vermutung eines gemeinsamen, konformationsspezifischen Antikörpers nahe, der ein gemeinsames Epitop in der Struktur der fehlgefalteten Aggregate erkennt. Diese Mutmaßung wurde bereits durch Versuche unterstützt, die eine Vergleichbarkeit von nAbs-PrP und nAbs-A $\beta$  nahelegen. So konnte die Fibrillation von PrP106-126 A117V sowohl mit nAbs-PrP als auch mit nAbs-A $\beta$ , nicht jedoch mit ft-PrP und ft-A $\beta$  gehemmt werden (präliminäre Versuche, nicht publiziert). Auch mittels eines Dotblots und ELISAs konnte gezeigt werden, dass nAbs-PrP neben PrP106-126 A117V auch oligomeres A $\beta$  erkennt und andersherum nAbs-A $\beta$  auch PrP106-126 A117V detektieren können (präliminäre Versuche, nicht publiziert). Diese Ergebnisse lassen in der Tat die Schlussfolgerungen zu, dass es sich möglicherweise um eine gemeinsame Epitopstruktur handelt. Inwieweit diese Hypothese stimmt oder ob nAbs-

PrP und nAbs-A $\beta$  jeweils ein lineares, spezifisches Epitop und zusätzlich ein strukturelles, gemeinsames erkennen, bedarf noch weiterer Untersuchungen.

---

## 4 Referenzen

- Aguzzi, A., J. Falsig (2012). Prion propagation, toxicity and degradation. *Nat Neurosci* 15(7): 936-9.
- Aguzzi, A., M. Heikenwalder (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol* 4(10): 765-75.
- Aguzzi, A., C. Zhu (2012). Five questions on prion diseases. *PLoS Pathog* 8(5): e1002651.
- Araki, N., M. T. Johnson, J. A. Swanson (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135(5): 1249-60.
- Atarashi, R., K. Satoh, K. Sano, T. Fuse, N. Yamaguchi, D. Ishibashi, T. Matsubara, T. Nakagaki, H. Yamanaka, S. Shirabe, M. Yamada, H. Mizusawa, T. Kitamoto, G. Klug, A. McGlade, S. J. Collins, N. Nishida (2011). Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion. *Nat Med* 17(2): 175-8.
- Axline, S. G., E. P. Reaven (1974). Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J Cell Biol* 62(3): 647-59.
- Bacher, M., C. Depboylu, Y. Du, C. Noelker, W. H. Oertel, T. Behr, G. Henriksen, M. Behe, R. Dodel (2009). Peripheral and central biodistribution of (111)In-labeled anti-beta-amyloid autoantibodies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 449(3): 240-5.
- Baumgarth, N. (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol* 11(1): 34-46.
- Benner, E. J., R. L. Mosley, C. J. Destache, T. B. Lewis, V. Jackson-Lewis, S. Gorantla, C. Nemachek, S. R. Green, S. Przedborski, H. E. Gendelman (2004). Therapeutic immunization protects dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(25): 9435-40.
- Besong-Agbo, D., E. Wolf, F. Jessen, M. Oechsner, E. Hametner, W. Poewe, M. Reindl, W. H. Oertel, C. Noelker, M. Bacher, R. Dodel (2012). Naturally occurring alpha-synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology* 80(2): 169-75.
- Biasini, E., J. A. Turnbaugh, U. Unterberger, D. A. Harris (2012). Prion protein at the crossroads of physiology and disease. *Trends Neurosci* 35(2): 92-103.



- Brandner, S., S. Isenmann, A. Raeber, M. Fischer, A. Sailer, Y. Kobayashi, S. Marino, C. Weissmann, A. Aguzzi (1996). Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity. *Nature* 379(6563): 339-43.
- Brown, D. R. (2000). Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106-126 carrying the Ala(117)-->Val mutation. *Biochem J* 346 Pt 3: 785-91.
- Brown, D. R., B. Schmidt, H. A. Kretzschmar (1996). A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* 18(1): 59-67.
- Brown, D. R., B. Schmidt, H. A. Kretzschmar (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380(6572): 345-7.
- Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull* 66: 121-30.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet, C. Weissmann (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73(7): 1339-47.
- Bueler, H., M. Fischer, Y. Lang, H. Bluethmann, H. P. Lipp, S. J. DeArmond, S. B. Prusiner, M. Aguet, C. Weissmann (1992). Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature* 356(6370): 577-82.
- Castilla, J., P. Saa, R. Morales, K. Abid, K. Maundrell, C. Soto (2006). Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies. *Methods Enzymol* 412: 3-21.
- Caughey, B., D. A. Kocisko, G. J. Raymond, P. T. Lansbury, Jr. (1995). Aggregates of scrapie-associated prion protein induce the cell-free conversion of protease-sensitive prion protein to the protease-resistant state. *Chem Biol* 2(12): 807-17.
- Chesebro, B., M. Trifilo, R. Race, K. Meade-White, C. Teng, R. LaCasse, L. Raymond, C. Favara, G. Baron, S. Priola, B. Caughey, E. Masliah, M. Oldstone (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science* 308(5727): 1435-9.
- Ciesielski-Treska, J., N. J. Grant, G. Ulrich, M. Corrotte, Y. Bailly, A. M. Haeberle, S. Chasserot-Golaz, M. F. Bader (2004). Fibrillar prion peptide (106-126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* 46(2): 101-15.
- Citron, M. (2004). Alzheimer's disease: strategies for disease modification. *Nat Rev Drug Discov* 9(5): 387-98.
- Cohen, F. E. (1999). Protein misfolding and prion diseases. *J Mol Biol* 293(2): 313-20.
- Colling, S. B., M. Khana, J. Collinge, J. G. Jefferys (1997). Mossy fibre reorganization in the hippocampus of prion protein null mice. *Brain Res* 755(1): 28-35.
- Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci* 24: 519-50.

- Creutzfeldt, H. G. (1920). Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 57(1): 1-18.
- DeMattos, R. B., K. R. Bales, D. J. Cummins, S. M. Paul, D. M. Holtzman (2002). Brain to plasma amyloid-beta efflux: a measure of brain amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 295(5563): 2264-7.
- Diaz-Espinoza, R., C. Soto (2012). High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier. *Nat Struct Mol Biol* 19(4): 370-7.
- Dodel, R., K. Balakrishnan, K. Keyvani, O. Deuster, F. Neff, L. C. Andrei-Selmer, S. Roskam, C. Stuer, Y. Al-Abed, C. Noelker, M. Balzer-Geldsetzer, W. Oertel, Y. Du, M. Bacher (2011). Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31(15): 5847-54.
- Dodel, R., H. Hampel, C. Depboylu, S. Lin, F. Gao, S. Schock, S. Jackel, X. Wei, K. Buerger, C. Hoft, B. Hemmer, H. J. Moller, M. Farlow, W. H. Oertel, N. Sommer, Y. Du (2002). Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 52(2): 253-6.
- Dodel, R., A. Rominger, P. Bartenstein, F. Barkhof, K. Blennow, S. Forster, Y. Winter, J. P. Bach, J. Popp, J. Alferink, J. Wiltfang, K. Buerger, M. Otto, P. Antuono, M. Jacoby, R. Richter, J. Stevens, I. Melamed, J. Goldstein, S. Haag, S. Wietek, M. Farlow, F. Jessen (2013). Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol* 12(3): 233-43.
- Dodel, R. C., Y. Du, C. Depboylu, H. Hampel, L. Frolich, A. Haag, U. Hemmeter, S. Paulsen, S. J. Teipel, S. Brettschneider, A. Spottke, C. Nolker, H. J. Moller, X. Wei, M. Farlow, N. Sommer, W. H. Oertel (2004). Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(10): 1472-4.
- Dormont, D. (2003). Approaches to prophylaxis and therapy. *Br Med Bull* 66: 281-92.
- Drevets, D. A., P. A. Campbell (1991). Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J Immunol Methods* 142(1): 31-8.
- Du, Y., R. Dodel, H. Hampel, K. Buerger, S. Lin, B. Eastwood, K. Bales, F. Gao, H. J. Moeller, W. Oertel, M. Farlow, S. Paul (2001). Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* 57(5): 801-5.
- Fabrizi, C., V. Silei, M. Menegazzi, M. Salmona, O. Bugiani, F. Tagliavini, H. Suzuki, G. M. Lauro (2001). The stimulation of inducible nitric-oxide synthase by the prion protein fragment 106--126 in human microglia is tumor necrosis factor-alpha-

- dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276(28): 25692-6.
- Falsig, J., C. Julius, I. Margalith, P. Schwarz, F. L. Heppner, A. Aguzzi (2008). A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* 11(1): 109-17.
- Forloni, G., N. Angeretti, R. Chiesa, E. Monzani, M. Salmona, O. Bugiani, F. Tagliavini (1993). Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362(6420): 543-6.
- Forloni, G., R. Del Bo, N. Angeretti, R. Chiesa, S. Smiroldo, R. Doni, E. Ghibaudi, M. Salmona, M. Porro, L. Verga, et al. (1994). A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur J Neurosci* 6(9): 1415-22.
- Foster, P. R. (2000). Prions and blood products. *Ann Med* 32(7): 501-13.
- Garcia-Garcia, E., C. Rosales (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72(6): 1092-108.
- Giese, A., D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist, H. A. Kretzschmar (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8(3): 449-57.
- Gold, M., R. Pul, J. P. Bach, M. Stangel, R. Dodel (2012). Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunol Rev* 248(1): 68-86.
- Greenberg, S. (1995). Signal transduction of phagocytosis. *Trends Cell Biol* 5(3): 93-9.
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature* 215(5105): 1043-4.
- Gu, Y., H. Fujioka, R. S. Mishra, R. Li, N. Singh (2002). Prion peptide 106-126 modulates the aggregation of cellular prion protein and induces the synthesis of potentially neurotoxic transmembrane PrP. *J Biol Chem* 277(3): 2275-86.
- Hanan, E., O. Goren, M. Eshkenazy, B. Solomon (2001). Immunomodulation of the human prion peptide 106-126 aggregation. *Biochem Biophys Res Commun* 280(1): 115-20.
- Hill, A. F., J. Collinge (2003). Subclinical prion infection. *Trends Microbiol* 11(12): 578-84.
- Hsich, G., K. Kenney, C. J. Gibbs, K. H. Lee, M. G. Harrington (1996). The 14-3-3 brain protein in cerebrospinal fluid as a marker for transmissible spongiform encephalopathies. *N Engl J Med* 335(13): 924-30.
- Hughes, M. M., R. H. Field, V. H. Perry, C. L. Murray, C. Cunningham (2010). Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrP<sup>Sc</sup>, even upon LPS stimulation. *Glia* 58(16): 2017-30.

- Husemann, J., J. D. Loike, R. Anankov, M. Febbraio, S. C. Silverstein (2002). Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40(2): 195-205.
- Imran, M., S. Mahmood (2011). An overview of human prion diseases. *Virology* 8: 559.
- Ivanov, A. I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol Biol* 440: 15-33.
- Jakob, A. (1921). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen Befunde (spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden. *Z Gesamte Neurol Psychiatrie* 64: 147-228.
- Koenigsknecht, J., G. Landreth (2004). Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci* 24(44): 9838-46.
- Liu, Y., D. Schubert (1997). Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem* 69(6): 2285-93.
- Mabbott, N. A., G. G. MacPherson (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol* 4(3): 201-11.
- Macfarlane, R. G., S. J. Wroe, J. Collinge, T. A. Yousry, H. R. Jager (2007). Neuroimaging findings in human prion disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78(7): 664-70.
- Mallucci, G., A. Dickinson, J. Linehan, P. C. Klohn, S. Brandner, J. Collinge (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science* 302(5646): 871-4.
- McHattie, S. J., D. R. Brown, M. M. Bird (1999). Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106-126 in vitro. *J Neurocytol* 28(2): 149-59.
- Neff, F., X. Wei, C. Nolker, M. Bacher, Y. Du, R. Dodel (2008). Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7(6): 501-7.
- Newman, S. L., L. K. Mikus, M. A. Tucci (1991). Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 146(3): 967-74.
- Papachroni, K. K., N. Ninkina, A. Papapanagiotou, G. M. Hadjigeorgiou, G. Xiromerisiou, A. Papadimitriou, A. Kalofoutis, V. L. Buchman (2007). Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101(3): 749-56.
- Pastore, A., A. Zagari (2007). A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion* 1(3): 185-97.

- Peyrin, J. M., C. I. Lasmezas, S. Haik, F. Tagliavini, M. Salmona, A. Williams, D. Richie, J. P. Deslys, D. Dormont (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* 10(4): 723-9.
- Powis, G., R. Bonjouklian, M. M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W. F. Matter, J. Dodge, G. Grindey, et al. (1994). Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54(9): 2419-23.
- Race, R. E., S. A. Priola, R. A. Bessen, D. Ernst, J. Dockter, G. F. Rall, L. Mucke, B. Chesebro, M. B. Oldstone (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron* 15(5): 1183-91.
- Radford, H. E., G. R. Mallucci (2010). The role of GPI-anchored PrP C in mediating the neurotoxic effect of scrapie prions in neurons. *Curr Issues Mol Biol* 12(2): 119-27.
- Relkin, N. R., P. Szabo, B. Adamiak, T. Burgut, C. Monthe, R. W. Lent, S. Younkin, L. Younkin, R. Schiff, M. E. Weksler (2009). 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30(11): 1728-36.
- Rezaie, P., P. L. Lantos (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* 35(1): 55-72.
- Riesner, D. (2003). Biochemistry and structure of PrP(C) and PrP(Sc). *Br Med Bull* 66: 21-33.
- Rigter, A., J. P. Langeveld, F. G. van Zijderveld, A. Bossers (2010). Prion protein self-interactions: a gateway to novel therapeutic strategies? *Vaccine* 28(49): 7810-23.
- Robillard, A. (2007). Clinical diagnosis of dementia. *Alzheimers Dement* 3(4): 292-8.
- Roettger, Y., Y. Du, M. Bacher, I. Zerr, R. Dodel, J. P. Bach (2012). Immunotherapy in prion disease. *Nat Rev Neurol* 9(2): 98-105.
- Schenk, D. (2002). Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning. *Nat Rev Neurosci* 3(10): 824-8.
- Shoenfeld, Y., M. E. Gershwin, P. L. Meroni (2006). Autoantibodies. , Elsevier Science & Technology: 872.
- Singh, N., Y. Gu, S. Bose, S. Kalepu, R. S. Mishra, S. Verghese (2002). Prion peptide 106-126 as a model for prion replication and neurotoxicity. *Front Biosci* 7: a60-71.

- Solforosi, L., J. R. Criado, D. B. McGavern, S. Wirz, M. Sanchez-Alavez, S. Sugama, L. A. DeGiorgio, B. T. Volpe, E. Wiseman, G. Abalos, E. Masliah, D. Gilden, M. B. Oldstone, B. Conti, R. A. Williamson (2004). Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science* 303(5663): 1514-6.
- Soto, C. (2004). Diagnosing prion diseases: needs, challenges and hopes. *Nat Rev Microbiol* 2(10): 809-19.
- Sulahian, T. H., A. Imrich, G. Deloid, A. R. Winkler, L. Kobzik (2008). Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respir Res* 9: 59.
- Taylor, D. R., N. M. Hooper (2006). The prion protein and lipid rafts. *Mol Membr Biol* 23(1): 89-99.
- Taylor, J. P., J. Hardy, K. H. Fischbeck (2002). Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science* 296(5575): 1991-5.
- Tobler, I., S. E. Gaus, T. Deboer, P. Achermann, M. Fischer, T. Rulicke, M. Moser, B. Oesch, P. A. McBride, J. C. Manson (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature* 380(6575): 639-42.
- Walter, L., H. Neumann (2009). Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Semin Immunopathol* 31(4): 513-25.
- Wei, X., Y. Roettger, B. Tan, Y. He, R. Dodel, H. Hampel, G. Wei, J. Haney, H. Gu, B. H. Johnstone, J. Liu, M. R. Farlow, Y. Du (2012). Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity. *J Biol Chem* 287(16): 12858-66.
- Weissmann, C. (2004). The state of the prion. *Nat Rev Microbiol* 2(11): 861-71.
- Weksler, M. E., N. Relkin, R. Turkenich, S. LaRusse, L. Zhou, P. Szabo (2002). Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol* 37(7): 943-8.
- Westergaard, L., H. M. Christensen, D. A. Harris (2007). The cellular prion protein (PrP(C)): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta* 1772(6): 629-44.
- Whatley, S. A., J. F. Powell, G. Politopoulou, I. C. Campbell, M. J. Brammer, N. S. Percy (1995). Regulation of intracellular free calcium levels by the cellular prion protein. *Neuroreport* 6(17): 2333-7.
- White, A. R., S. H. Hawke (2003). Immunotherapy as a therapeutic treatment for neurodegenerative disorders. *J Neurochem* 87(4): 801-8.
- Will, R. G., M. Zeidler, G. E. Stewart, M. A. Macleod, J. W. Ironside, S. N. Cousens, J. Mackenzie, K. Estibeiro, A. J. Green, R. S. Knight (2000). Diagnosis of new variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 47(5): 575-82.

Zerr, I. (2009). Therapeutic trials in human transmissible spongiform encephalopathies: recent advances and problems to address. *Infect Disord Drug Targets* 9(1): 92-9.

## 5 Zusammenfassung

Prionerkrankungen sind bislang nicht therapierbare, grundsätzlich tödlich verlaufende Krankheiten, die infektiösen Charakter besitzen. Dabei kommt es zur Fehlfaltung eines physiologisch vorkommenden Proteins, des zellulär exprimierten Prion Proteins PrP<sup>C</sup>. PrP<sup>C</sup> wird in eine stabile, unlösliche Form PrP<sup>Sc</sup> gefaltet, welches Aggregate bilden und sich im Gehirn in Form von Prionplaques ablagern kann. Dadurch kommt es zu einem progressiven Neuronenverlust begleitet von einer tiefen Mikrogliaaktivierung und einer Vakuolisierung der Hirnmasse. Studien in Zellkulturen und im Mausmodell haben gezeigt, dass Immunisierungsstrategien als potentielle Therapien bei Prionerkrankungen in Betracht gezogen werden können. Natürlich vorkommende Autoantikörper (nAbs) wurden schon bei der Alzheimer- und Parkinson-Erkrankung nachgewiesen und auf ihre Wirksamkeit untersucht. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkweise von Prion-spezifischen nAbs (nAbs-PrP) *in vitro* bei Prionerkrankungen.

Wir konnten erstmalig nAbs-PrP gegen das Prionproteinfragment PrP106-126 A117V im Serum und CSF gesunder Probanden detektieren. Darüber hinaus konnten nAbs-PrP aus einem kommerziell erwerblichen Pool intravenöser Immunglobuline (IVIg) mittels Affinitätschromatographie isoliert werden. Der Nachweis von nAbs-PrP in humanem Serum und CSF von gesunden Spendern impliziert eine physiologische Rolle von nAbs-PrP bei der Konversion von PrP<sup>C</sup> zu PrP<sup>Sc</sup>. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass nAbs-PrP die Fibrillenbildung des Peptids PrP106-126 A117V konzentrationsabhängig inhibieren. Auch die toxische Wirkung des Peptids auf Neurone konnte durch nAbs-PrP gehemmt werden, was vermutlich mit dem hemmenden Einfluss auf die Fibrillenbildung einhergeht. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nAbs-PrP vermutlich eine bedeutende Rolle bei der Mikroglia-vermittelten Prion-„Clearance“ spielen. Eine Behandlung der Mikrogliazellen mit nAbs-PrP führte zu einer verstärkten Phagozytose von PrP106-126 A117V, die weder in einer Induktion pro-inflammatorischer Zytokine noch in einer Einschränkung der Zellvitalität resultierte. Durch den Einsatz verschiedener Phagozytose-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass wahrscheinlich zwei unterschiedliche Mechanismen für die Phagozytose von fibrilliertem Prionpeptid einerseits und für die nAbs-PrP-vermittelte Prionaufnahme andererseits verantwortlich sind.

Zusammenfassend konnte *in vitro* gezeigt werden, dass nAbs-PrP in die pathologischen Prozesse der Prionkonversion und -toxizität eingreifen können. nAbs-PrP lösten dabei keine inflammatorische Reaktion in Mikrogliazellen aus, sondern wirkten fördernd auf die „Clearance“ von fibrillierten Prionpeptiden. Diese Ergebnisse legen nahe, den Effekt von nAbs-PrP auf den Krankheitsverlauf *in vivo* zu untersuchen.



## 6 Summary

Prion diseases are invariably fatal and infectious neurodegenerative diseases characterized by the conversion of the physiological cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) into its isoform called scrapie prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). PrP<sup>Sc</sup> has the tendency to form aggregates leading to progressive neuronal cell death, microglial activation and a spongiform degeneration of the central nervous system (CNS). Active and passive immunization strategies have been investigated in neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease and in animal models of prion diseases. For Alzheimer's- and Parkinson's disease, naturally occurring autoantibodies (nAbs) have been analyzed and hypothesized as potential treatment options. Therefore, this work aimed to investigate the mode of action of prion specific nAbs (nAbs-PrP) *in vitro* in prion diseases.

In this study, we detected nAbs-PrP in human Serum and CSF of healthy subjects. These autoantibodies could be successfully purified from intravenous immunoglobulin (IVIg) by using affinity chromatography columns conjugated with the peptide PrP106-126 A117V. The existence of those antibodies in healthy subjects implies a physiological role of nAbs-PrP with respect to the conversion of PrP<sup>C</sup> into PrP<sup>Sc</sup>. Indeed, we found nAbs-PrP to break down fibril formation of PrP106-126 A117V in a dose-dependent manner. Furthermore, nAbs-PrP were found to prevent PrP106-126 A117V induced toxicity in primary cortical neurons. We further examined the role of nAbs-PrP in microglia-mediated prion "clearance". nAbs-PrP considerably enhanced the uptake of PrP106-126 A117V in microglial cells without inducing an inflammatory response or a loss of vitality. The application of several phagocytosis inhibitors gave first insights into the possible mechanisms underlying prion uptake in microglial cells. We found at least two separate mechanisms to be responsible for the nAbs-PrP-mediated PrP106-126 A117V uptake on the one hand and the uptake of fibrillary PrP106-126 A117V alone on the other hand.

In summary, we found nAbs-PrP to interfere with the pathological processes underlying prion conversion and -toxicity *in vitro*. In our experiments, nAbs-PrP exhibited beneficial effects in terms of prion-"clearance" without inducing any detrimental side effects (e.g., inflammatory response) in microglia cells. Therefore, it might be worth to investigate the nAbs-PrP-mediated effect on the progression of prion diseases *in vivo*.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
A $\beta$	Amyloid- $\beta$
AD	Alzheimer Disease, Alzheimer-Erkrankung
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
CGN	Cerebellar Granule Neurons, zerebelläre granuläre Neurone
CJD	Creutzfeldt-Jakob Disease, Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
CSF	Cerebrospinal Fluid, Zerebrospinalflüssigkeit
EEG	Elektroenzephalogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fCJD	Familiäre Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
FDA	Fluoreszein-Diazetat
FFI	Fatal Familial Insomnia, Letale familiäre Insomnie
ft-PrP	Flowthrough-PrP, Durchfluss, negative Fraktion aus IVIg
GPI	Glykosyl-Phosphoinositol
GSS	Gerstmann-Sträussler-Scheinker Erkrankung
iCJD	Iatrogene Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
Ig	Immunglobuline
IL-6	Interleukin-6
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
K	Lysin
kDa	Kilodalton
LP	Lumbalpunktion
M	Methionin
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
N	Asparagin
nAbs	Natürlich vorkommende Autoantikörper
nAbs-A $\beta$	Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen Amyloid- $\beta$
nAbs- $\alpha$ -syn	Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen $\alpha$ -Synuclein
nAbs-PrP	Natürlich vorkommende Autoantikörper gegen das Prionprotein
PD	Parkinson's Disease, Parkinson-Erkrankung
PI	Propidium-Iodid

PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Proteinkinase K
PMCA	Protein Misfolding Cyclic Amplification
PRNP	Prionprotein Gen
PrP <sup>C</sup>	Cellular prion protein, zelluläres Prionprotein
PrP <sup>res</sup>	Prion protein resistant, resistentes Prionprotein
PrP <sup>Sc</sup>	Scrapie prion protein
RT-QUIC	Real-Time Quaking-Induced Conversion
sCJD	Sporadische Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
T	Threonin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
V	Valin
vCJD	Variante der Creutzfeldt-Jakob Erkrankung
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **7.2 *Abbildungsverzeichnis***

Abbildung 1    Eigenschaften von PrP<sup>C</sup> und PrP<sup>Sc</sup>.

Seite 4

## **7.3 *Tabellenverzeichnis***

Tabelle 1    Ätiologie wichtiger Prionerkrankungen beim Menschen  
und in Tieren.

Seite 2

#### **7.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine Akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg (Deutschland):

Aigner, Bastians, Bauer S., Bauer U., Becker, Boekhoff, Brehm, Burchert, Czubayko, Daut, Del Rey, Eilers, Elsässer, Fritz, Feuser, Garten, Glorius, Gudermann, Hasilik, Hassel, Huber, Homberg, Jacob, Jungclas, Kirchner, Knöllner, Koch, Krebber, Lill, Liss, Löffler, Lohoff, Lüers, Maisner, Matrosovich, Mühlberger, Müller, Müller-Brüsselbach, Noack, Plant, Roeper, Röhm, Schäfer, Schütz, Suske, Voigt, Weihe, Westermann

## **7.5 Danksagung**

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Richard Dodel für die Möglichkeit danken, in seiner Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm besonders für seine stete Motivation und Unterstützung bei der Anfertigung von Publikationen und für die Ermöglichung, einen Teil meiner Promotion in Indianapolis, USA zu absolvieren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. med. Jan-Philipp Bach, dessen grenzenloser Optimismus immer wieder motivierend war. Ich danke ihm für die viele Zeit, die er sich genommen hat und dass er immer für uns erreichbar war.

Ich danke Prof. Yansheng Du für die Möglichkeit, in seinem Labor zu forschen und zu lernen. Dr. Monika Burg-Roderfeld, Prof. Dr. Armin Geyer und seinen Mitarbeitern, sowie Prof. Dr. Inga Zerr und Dr. Matthias Schmitz danke ich für die gute Zusammenarbeit bei fachübergreifenden Kooperationsprojekten.

Ich danke Dr. Daniela Besong-Agbo, Silke Decher, Christine Forbach, Carola Gäckler, Andreas Kautz, David Mengel, Dr. Carmen Nölker, Charlotte Plaschka, Tanja Rausch, Dr. Stephan Röskam, Dr. Roman Sankowski, Susanne Stei, Levke Steiner und Dr. Elias Wolff für den Austausch und die gute Zusammenarbeit während der letzten 3,5 Jahre.

Darüber hinaus danke ich Prof. Dr. Michael Bacher, der immer ein offenes Ohr für Fragen jeglicher Art hatte, was selbst durch seinen Umzug nicht gestört wurde. Sein Humor und seine kreativen Vorschläge lassen mich bestimmt auch in Zukunft noch das ein oder andere Mal bei ihm durchklingeln.

Ich danke besonders Maïke Gold für die gemeinsame Zeit während des Studiums und der Promotion. Ich werde unsere zeitlich perfektionierten Mensapausen, unsere gegenseitige Beratungen und Gespräche, aber vor allem das „ihr gegenüber sitzen“ sehr vermissen.

Vielen lieben Dank an Eva, Jenny, Svenja und Maïke– jetzt haben wir doch fast 9 Jahre gemeinsam in Marburg verbracht und am Ende alle promoviert, wer von uns hätte das damals gedacht!

Ich danke von Herzen meiner Familie, die immer mit großem Interesse und Unterstützung an meiner Seite steht. Und meiner Oma, der ich diese Arbeit gewidmet habe – ich kenne keine Oma, die sich so für ihre Enkel interessiert und an ihrem Leben teilnimmt.

Zu guter Letzt danke ich Julian, nicht zuletzt für seine Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit. Durch seine Beständigkeit habe ich immer wieder den Weg zurück zum Wesentlichen gefunden.

## **7.6 Publikationen**

### Publikationen im Rahmen dieser Arbeit:

**1. Wei, X., Y. Roettger, B. Tan, Y. He, R. Dodel, H. Hampel, G. Wei, J. Haney, H. Gu, B. H. Johnstone, J. Liu, M. R. Farlow, Y. Du (2012).** Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity.  
J Biol Chem 287(16): 12858-66 (Originalarbeit)

**2. Roettger Y., I. Zerr, R. Dodel, J.P. Bach (2013).** Prion peptide uptake in microglial cells-the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein.  
PLoS One 8(6): e67743 (Originalarbeit)

### Weitere Publikationen (dieser Arbeit nicht angefügt):

**Roettger, Y., Y. Du, M. Bacher, I. Zerr, R. Dodel, J. P. Bach (2012).** Immunotherapy in prion disease.  
Nat Rev Neurol 9(2): 98-105 (Übersichtsarbeit)

Heiske, A., **Y. Roettger, M. Bacher (2012).** Cytomegalovirus upregulates vascular endothelial growth factor and its second cellular kinase domain receptor in human fibroblasts.  
Viral Immunol 25(5): 360-7 (Originalarbeit)

# Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity

Received for publication, April 28, 2011, and in revised form, February 20, 2012. Published, JBC Papers in Press, February 23, 2012, DOI 10.1074/jbc.M111.255836

Xing Wei<sup>‡</sup>, Yvonne Roettger<sup>§</sup>, Bailin Tan<sup>‡</sup>, Yongzheng He<sup>‡</sup>, Richard Dodel<sup>§</sup>, Harald Hampel<sup>¶</sup>, Gang Wei<sup>‡</sup>, Jillian Haney<sup>‡</sup>, Huiying Gu<sup>‡</sup>, Brian H. Johnstone<sup>||</sup>, Junyi Liu<sup>\*\*</sup>, Martin R. Farlow<sup>‡</sup>, and Yansheng Du<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Neurology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202, the <sup>§</sup>Department of Neurology, Philipps University, 35039 Marburg, Germany, the <sup>¶</sup>Department of Psychiatry, University of Frankfurt, 60528 Frankfurt, Germany, <sup>\*\*</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China, and the <sup>||</sup>Department of Medicine, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, Indiana 46202

**Background:** AD and prion diseases both involve conformational changes and deposition of insoluble proteins; similar to anti-A $\beta$  autoantibodies, anti-PrP autoantibodies may be present in healthy individuals.

**Results:** PrP autoantibodies (PrP-AA) purified from human IgG could significantly block PrP-(106–126) peptide fibril formation and PrP-induced neuronal death.

**Conclusion:** Human prion autoantibodies reduce prion peptide aggregation and associated neurotoxicity.

**Significance:** Purified PrP-AA may be a potential treatment for prion diseases.

Prion diseases are a group of rare, fatal neurodegenerative disorders associated with a conformational transformation of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) into a self-replicating and proteinase K-resistant conformer, termed scrapie PrP (PrP<sup>Sc</sup>). Aggregates of PrP<sup>Sc</sup> deposited around neurons lead to neuropathological alterations. Currently, there is no effective treatment for these fatal illnesses; thus, the development of an effective therapy is a priority. PrP peptide-based ELISA assay methods were developed for detection and immunoaffinity chromatography capture was developed for purification of naturally occurring PrP peptide autoantibodies present in human CSF, individual donor serum, and commercial preparations of pooled intravenous immunoglobulin (IVIg). The ratio of anti-PrP autoantibodies (PrP-AA) to total IgG was ~1:1200. The binding epitope of purified PrP-AA was mapped to an N-terminal region comprising the PrP amino acid sequence KTNMK. Purified PrP-AA potently blocked fibril formation by a toxic 21-amino acid fragment of the PrP peptide containing the amino acid alanine to valine substitution corresponding to position 117 of the full-length peptide (A117V). Furthermore, PrP-AA attenuated the neurotoxicity of PrP(A117V) and wild-type peptides in rat cerebellar granule neuron (CGN) cultures. In contrast, IgG preparations depleted of PrP-AA had little effect on PrP fibril formation or PrP neurotoxicity. The specificity of PrP-AA was demonstrated by immunoprecipitating PrP protein in brain tissues of transgenic mice expressing the human PrP(A117V) epitope and Sc237 hamster. Based on these intriguing findings, it is suggested that human PrP-AA may be useful for interfering with the pathogenic effects of pathogenic prion proteins and, thereby has the potential to be an effective means for preventing or attenuating human prion disease progression.

Prion diseases, or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs),<sup>2</sup> are rapidly progressive neurodegenerative disorders with untreatable invariably fatal outcomes. Disease caused by altered forms of prion protein (PrP) include scrapie in sheep, bovine spongiform encephalopathy in cattle, as well as the human forms Kuru, Creutzfeldt-Jakob disease (CJD and vCJD), and the Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS) syndrome (1). These diseases are most likely caused by misfolding and aggregation of the normal host protein (PrP<sup>C</sup>) into a highly insoluble form PrP<sup>Sc</sup>. In this process, a portion of the  $\alpha$ -helix and random coil structure of PrP<sup>C</sup>, which is ubiquitously expressed in neurons and leukocytes, adopts the PrP<sup>Sc</sup>  $\beta$ -pleated conformation, rendering the protein poorly soluble in water and resistant to protease digestion (1). Autopsy on the brains of prion disease patients has identified amyloid plaques comprised of insoluble PrP<sup>Sc</sup> aggregates deposited around neurons in affected brain regions, which is thought to induce neuronal dysfunction and death, thus producing the clinical symptoms of infection (1–7). The primacy of a single protein causing disease across species by diverse mechanisms is unique in biology.

To date, there are no therapeutic treatments available for prion diseases. However, recent studies in cultured cells and mice indicate that immunotherapeutic strategies employing antibodies against the cellular form of PrP<sup>C</sup> can antagonize prion infectivity and disease development. Monoclonal antibodies (mAbs) or recombinant F(ab) fragments recognizing PrP effectively prevented prion infection of susceptible mouse neuroblastoma cells and abrogated *de novo* PrP<sup>Sc</sup> formation in chronically infected cells (8–9). In addition, passive transfer of a PrP mAb into scrapie-infected mice suppressed peripheral prion replication and infectivity, and significantly delayed onset of the disease (10–12). Notably, no obvious adverse effects were observed in these studies. These findings suggest that immuno-

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: Department of Neurology, School of Medicine, Indiana University, 975 W. Walnut St. IB 457, Indianapolis, IN 46202. Tel.: 317-278-0220; Fax: 317-274-3587; E-mail: ydu@iupui.edu.

<sup>2</sup> The abbreviations used are: TSE, transmissible spongiform encephalopathies; PrP, prion protein; CJD, Creutzfeldt-Jakob disease; AD, Alzheimer disease; IVIg, intravenous immunoglobulin; PrP-AA, anti-PrP autoantibodies; CGN, cerebellar granule neuron; A $\beta$ , beta amyloid.



therapeutic strategies for human prion diseases are worth pursuing.

Recently, we and others (13–14) have suggested that an impaired or reduced ability to generate antibodies specific for beta amyloid ( $A\beta$ ) peptides may be one mechanism contributing to Alzheimer disease (AD) pathogenesis. Intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations containing natural levels of anti- $A\beta$  antibodies or purified autoantibodies against  $A\beta$  have shown beneficial effects in trials with AD patients (13, 15–17). We have demonstrated that these autoantibodies prevent or disaggregate  $A\beta$  fibril formation and block their toxic effects in primary neurons (18).

Since the pathogenic mechanisms of AD and prion diseases both involve toxic conformational changes and deposition of insoluble protein aggregates (1, 19–23) and given the early successes with natural  $A\beta$  autoantibodies for treatment of AD, we hypothesized that anti-PrP autoantibodies (PrP-AA) may also be present in blood products derived from healthy individuals. The potential for efficacy of PrP-AA is also based on results demonstrating the ability of mouse mAbs to prevent fibril formation, disaggregate already formed fibrils, and inhibit the neurotoxic effect of PrP<sup>Sc</sup> (24). A benefit of purified human PrP-AA over humanized mouse mAbs is a reduced potential for neutralizing host responses to residual mouse sequences in the chimeric antibody.

A peptide fragment spanning human PrP sequences 106–126 (PrP<sub>106–126</sub>) possesses several chemico-physical characteristics of PrP<sup>Sc</sup>, including the propensity to form  $\beta$ -sheet-rich, insoluble, and protease-resistant fibrils similar to those found in prion-diseased brains (25–26). This peptide has been widely used in an *in vitro* model to study PrP<sup>Sc</sup>-induced neurotoxicity (27–32). A mutation in the prion protein gene (PRNP) leading to a substitution of valine for alanine at peptide position 117 (A117V) is associated with GSS syndrome, an inherited prion disease (33–35) that is characterized by multi-centric amyloid plaques in the cerebellum and cortex (36). The A117V mutation lies within the PrP<sub>106–126</sub> region. The finding that a modification of PrP<sub>106–126</sub>(A117V) alters the toxic mechanism *in vitro* suggests that there may be heterogeneity in the mechanism of neurotoxicity of PrP<sup>Sc</sup>. The mechanism underlying the neurotoxic effects of PrP<sub>106–126</sub>(A117V) includes at least two components: The first is similar to that of PrP<sup>Sc</sup>, which requires the presence of microglia and neuronal PrP<sup>C</sup> expression; while the second is independent of neuronal PrP<sup>C</sup> expression or presence of microglia (36).

In this study, we have found evidence that PrP-AA are present in human CSF and serum. These autoantibodies could be successfully purified from IVIg by using affinity chromatography columns conjugated with PrP<sub>106–126</sub>(A117V) peptide. Additionally, we identified a five amino acid binding epitope for PrP-AA. Furthermore, we demonstrated that purified PrP-AA effectively protects cultured cerebral granule neurons (CGN) against wild type and mutant PrP<sub>106–126</sub> induced neurotoxicity.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Purification of PrP-AA and Autoantibodies against  $A\beta$** —The protocol was adapted from a previously described method (13). Disposable chromatography columns were packed with CNBr-

activated Sepharose 4B (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). PrP<sub>106–126</sub>(A117V) (Bachem) and  $A\beta_{1–40}$  (Invitrogen) were conjugated to Sepharose beads (0.6 mg/ml drained Sepharose) according to the manufacturer's instructions. The labeled Sepharose columns were equilibrated and washed with PBS (pH 7.4). After passing individual donor or commercial pooled human IgG (Baxter or Octapharm) through the columns and collecting the unbound (*i.e.* pass-through) fractions, bound IgG fractions were released by passing elution buffer (50 mM glycine at pH 2.5) through the column. The pH-neutralized fractions were collected and tested by ELISA.

**Epitope Mapping of Purified PrP-AA**—An array of 11 amino acid peptides, which were sequentially frame shifted by one residue or had single amino acid replacements, were synthesized on a cellulose membrane (Department of Biochemistry, Schulich School of Medicine and Dentistry, University of Western Ontario) using the spot method of multiple peptide synthesis (37–38). During the mapping study, membranes bound with peptides were prepared by washing with 100% ethanol and PBS, three times each, followed by blocking with 5% no-fat milk in PBS overnight at 4 °C. The membrane was then washed with PBS once more before adding 0.2  $\mu$ g/ml purified PrP-AA and incubating overnight at 4 °C. After incubating with anti-human IgG HRP antibody (1:2000), the blots were visualized with the Super Signal chemiluminescence substrate (Pierce).

**ELISA**—The ELISA assay for PrP-AA was modified from a previously described method (13). 96-well ELISA plates were coated with PrP<sub>106–126</sub>(A117V) that was dissolved in a coating buffer (1.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 98 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% sodium azide, pH 7.4).

**Determination of PrP-AA Isotype**—The IgG subclasses of purified antibody samples were determined using a Quantibody human Ig isotype array (Raybiotech, INC, cat QAH-ISO-1-1).

**Immunoprecipitation of PrP and PrP<sup>Sc</sup> by Purified PrP-AA**—Reaction mixtures of homogenates in buffer containing 100 mM NaCl and 25 mM Tris/HCl (pH 7.4) were prepared from the cerebellum of a PrP(A117V) transgenic mouse and the brain of a hamster inoculated with Hamster Scrapie Strain Sc237 (10% v/v, InPro Biotechnology, South San Francisco, CA) (39). After centrifuging at 11,000  $\times$  g for 30 min at 4 °C, the mouse or hamster brain homogenates (2.5 or 100 mg/ml, respectively) were incubated with or without 100  $\mu$ g/ml proteinase K (PK) at 37 °C for 2 h. PK digestion was terminated with 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and heated at 100 °C 5 min. Cooled reaction mixtures were incubated overnight at 4 °C with 1  $\mu$ g of purified human PrP-AA or purified human autoantibodies against  $A\beta$ . Protein A-agarose was added, and a second overnight incubation was performed, followed by centrifuging and washing three times with PBS. Immunoprecipitates were loaded into 4–12% NuPage Bis-Tris gel (Invitrogen NP0321) for Western blotting with diluted (1/2000) commercial anti-PrP monoclonal antibodies (3F4, Chemicon, AB1562; and 6D11, Santa Cruz Biotechnology, sc-58581) followed by horseradish-peroxidase-conjugated goat anti mouse IgG. Binding was visualized by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific, 34095). The 3F4 monoclonal antibody was raised against amino acids 109–112 of human PrP. According to the

## Autoantibodies Block Prion Neurotoxicity

manufacturer, 3F4 recognizes both protease sensitive and resistant forms of human and hamster PrP, but not mouse PrP after denaturing. Monoclonal antibody clone 6D11 was raised against amino acids 93–109 of human PrP. According to the manufacturer this antibody recognizes PrP<sup>c</sup> as well as PrP<sup>Sc</sup> of human, mouse, and hamster origin.

**Fluorometric Experiments**—Fluorometry has been previously described (18, 40). Synthetic PrP<sub>106–126</sub> was incubated with or without purified PrP-AA in PBS buffer at 37 °C overnight. Samples were added to 50 mmol/liter glycine pH 9.2, 2 μmol/liter thioflavin T (Sigma) in a final volume of 2 ml. Fluorescence was measured spectrophotometrically at excitation with emission wavelengths of 435 nm and 485 nm, respectively. Samples were run in triplicate and were plotted with the mean ± S.D.

**Electron Microscopy**—Synthetic PrP<sub>106–126</sub> was incubated with or without purified PrP-AA in PBS buffer at 37 °C overnight. 2 μl of each sample were dropped onto 300 mesh carbon/formvar-coated grids and allowed to absorb for 3 min. A drop of the negative stain (NanoVan, Nanoprobes, Inc. Yaphank, NY) was placed on the grid for 8–10 s and then wicked off for drying. Images were taken using a Tecnai G12 BioTwin transmission electron microscope (FEI, Hillsboro, OR) with an AMT CCD camera (Advanced Microscopy Techniques, Danvers, MA).

**Mass Spectrometry**—Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS, API 4000, Applied Biosystems) was used to detect the monomer of PrP. The instrument was equipped with a Z-spray ionization source. Both nebulizer and desolvation gases were nitrogen and the collision gas was argon. Mass spectrometric parameters were set as follows: collision gas (CAD) 8, curtain gas (CUR) 10, ion source gas 1 (GS1) 15, ion source gas 2 (GS2) 35, electrospray voltage 5000 in positive ion scan mode, and dry temperature at 500 °C. The mixture of methanol, water, and formic acid (90:10:0.1, v/v/v) were used as the mobile phase with a flow rate 0.2 ml/min. Synthetic PrP<sub>106–126</sub> was incubated with or without purified PrP-AA in PBS buffer at 37 °C overnight. The samples were filtered and directly infused into the mass spectrometer (10 μl) through a LC system (Agilent 1100) with an auto sampler. All data were acquired at least in triplicate to confirm the reproducibility of the results.

**Primary Rat Neuronal Culture and Neurotoxicity Assays**—CGN were prepared from 7-day-old Sprague-Dawley rats as described previously (41). Briefly, rat CGN cells were prepared and seeded into 48-well poly-L-lysine-coated culture plates at a cell density of 2 × 10<sup>5</sup> cells/well in the BME medium with 10% fetal bovine serum and 25 mM KCl (Sigma). After incubating for 24 h, 10 μM cytosine arabino-furanoside (Sigma) was added to prevent glial proliferation. These cultures contain about 95% neurons (95% granule cells) with the remaining 5% of non-neuronal cells, mainly of astrocytic type (42–43). Treatments were performed after 14 days *in vitro*. PrP<sub>106–126</sub> (A117V or 117A) or scrambled PrP<sub>106–126</sub> (NGAKALMGGHGATKVMVGA) was pre-incubated in PBS, pH 7.2 at 37 °C for 48 h in the absence or presence of purified PrP-AA *in vitro* and was then added to cells. After the exposure of the cells to these incubates for 3 days, cell viability was determined by staining neurons with fluorescein diacetate/propidium iodide.

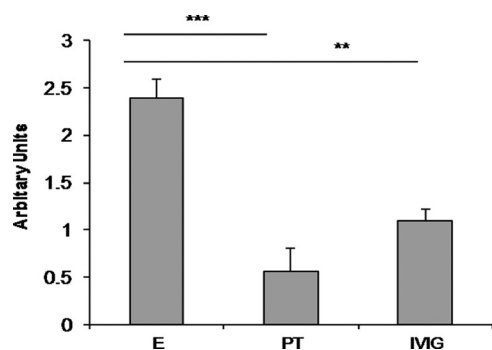
**Glial Cell Culture**—Primary cultures of rat cerebellar astroglial cells were prepared from the cerebellum of 7-day-old Sprague-Dawley rats as previously described (44–45). Cells dissociated from cerebella were plated at a density of 5 × 10<sup>5</sup>/well on 24-well plates coated with poly-L-lysine and cultured in a complete medium containing 10% FBS. After 3 days, the medium was replaced with a fresh one containing 10% FBS, and the cells were cultured for additional 3–4 days before treatment until they were more than 90% confluent. As previous reports state, these cultures are composed of up to 90% of astrocytes positive for glial fibrillary acidic protein (44, 46).

**Generation of Mice Heterozygous for the PRNP<sup>A117V</sup> Allele**—The plasmid expression vector (pProPrpHGSal) (47), containing the proximal half of genomic mouse PNRP, including the promoter and coding sequences of exon 1, intron 1, and exon 2 fused to exon 3, was used to create the chimera. We inserted the hamster open reading frame (ORF) in place of the murine ORF. The hamster ORF sequence was amplified using PCR with hamster cDNA as the template and GCTATGTGGACTGATGTCGGC; CAGGGCCCACTAGTGCCAAG as the forward and reverse primers. The PCR fragment was cloned initially into pIRESneo. An A117V mutation (A117→V) was introduced by using the Quick Change Mutagenesis Kit (Stratagene). The mutation and absence of polymerase errors were verified by sequencing. The ApaI/PshA I insert was released and inserted in place of the murine ApaI/PshA I within the pProPrpHGSal vector, leading to a construct termed SHa-Mo PrP. An 11-kb DNA fragment containing the A117V mutant allele of the PNRP gene was excised from vector pProPrpHGSal by Not/SalI digestion and injected into the pronuclei of fertilized oocytes from PNRP knock-out mice (47). Genomic DNA, isolated from tail tissue of weanling animals, was screened for the presence of incorporated mouse/hamster chimeric PRNP transgene using PCR primers. The forward primer sequence (5'-CAA CCG AGC TGA AGC ATT CTG CCTT-3') is in the mouse PrP region and the reverse primer sequence (5'-CAC GCG CTC CAT TAT CTT GAT G-3') is in the hamster PrP region.

## RESULTS

After identifying PrP-AA in all human CSF and serum samples from five normal individuals by using ELISA, we developed and used an affinity column coated with the mutant human PrP sequence encompassing residues 106–126 (KTNM-KHMAGAAVAGAVVGGGLG), which is termed PrP<sub>106–126</sub> (A117V), to isolate human PrP-AA from IVIg or serum from individual blood specimens. An intense signal was observed with antibody capture of PrP<sub>106–126</sub>(A117V) in an ELISA assay using bound PrP-AA (Fig. 1). The non-binding fraction (“pass-through” (PT)) was depleted of antibodies which bound PrP<sub>106–126</sub>(A117V) (Fig. 1). In contrast, purified PrP-AA could not be detected by ELISA coated with the unrelated Aβ<sub>1–40</sub> peptide (data not shown).

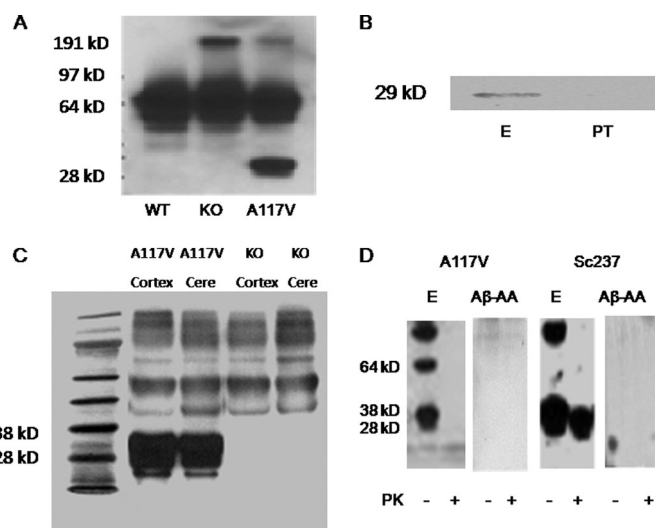
The specificity of PrP-AA was evaluated by immunoprecipitating PrP(A117V) from homogenates of brains from transgenic mice that express the human sequences encompassing residues 106–126. This was accomplished by knocking-in a hybrid mouse/hamster PNRP gene containing the A117V sub-



**FIGURE 1. Analysis of PrP<sub>106-126</sub>(A117V) binding by purified PrP-AA in an ELISA assay.** Purified PrP-AA, non-binding, pass-through IgG (PT) or original IVIg (all at 1  $\mu$ g) were added to PrP<sub>106-126</sub>(A117V) peptide-coated wells. After washing, bound antibodies were detected with horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-human IgG antibodies. Purified PrP-AA showed an enhanced signal compared with the original IVIg; whereas, the PT IgG was greatly diminished in binding capacity. E, PrP-AA; PT, pass-through IgG depleted of PrP-AA; IMG, original IVIg used to purify PrP-AA; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

stitution, which has been used previously to investigate GSS (48). It has already been established that hamster PrP binds a human single chain PrP antibody (49), suggesting that brains expressing the coding region of the hamster protein could bind to human PrP antibodies. We confirmed the expression of PrP(A117V) in transgenic mouse brain homogenates using the commercially available mouse monoclonal antibody 3F4. This antibody recognized a protein of the correct mobility ( $\sim 29$  kDa) in brain homogenates from transgenic PrP (A117V) mice, but not wild type or PNRP knock-out mice (Fig. 2A). Immunoprecipitation of  $\sim 29$  kDa proteins from brain homogenates of PrP(A117V) transgenic mice was accomplished with purified PrP-AA; whereas, no protein bands were observed after immunoprecipitation with PrP-AA-depleted IVIg (PT) (Fig. 2B). Western blotting of homogenates from brains of PrP(A117V) or PNRP knock-out mice demonstrated a major band corresponding to PrP only in the cortex and cerebella of the transgenic mice (Fig. 2C). Of note, although other minor protein species were evident upon detection of PrP-AA immunoprecipitates with the unrelated 3F4 antibody, PrP(A117V) was by far the predominant protein band observed (Fig. 2C). Taken together, these data indicate that PrP-AA binds PrP(A117V) with high specificity and affinity. Additionally, to examine whether PrP-AA could bind to protease-resistant PrP<sup>Sc</sup> conformers, brain homogenates isolated from a Sc237 hamster pretreated with or without PK were immunoprecipitated by PrP-AA or autoantibodies against A $\beta$  as a negative control. We clearly demonstrated that purified PrP-AA recognized both PrP and PK-resistant PrP<sup>Sc</sup> (27–30 kDa) (Fig. 2D).

The titer of PrP-AA in IVIg was determined to be 1:1200 within a total IgG concentration of 10 g/100 ml. The distribution of different IgG subclasses in the purified PrP-AA were as follows: IgG1 74.2%, IgG2 12%, IgG3 11.4%, and IgG4 2.4%. Thus, the IgG subclasses of purified PrP-AA are similar to the distribution of IgG subclasses in IVIg products and human serum. Furthermore, the PrP-AA binding epitope was determined using an array displaying a series of modified PrP<sub>106-126</sub> peptides (Fig. 3, A and B). Binding of PrP-AA occurs at the extreme N terminus of PrP<sub>106-126</sub> and requires, at a minimum



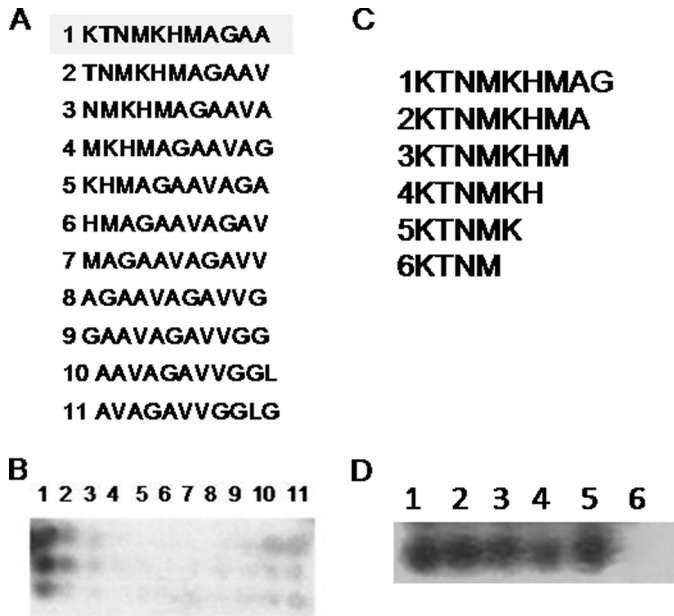
**FIGURE 2. Characterization of PrP-AA specificity for PrP.** A, A117V transgenic mice, but not wild-type (WT) nor PNRP knock-out (KO) mice, were shown to express the PrP protein, which was detectable in brain homogenates using the murine monoclonal antibody 3F4. B, visualization of PrP(A117V) in brain homogenates (500  $\mu$ g protein) of transgenic mice by immunoprecipitation with purified PrP-AA (E) or PT. Immunoprecipitated complexes were subjected to Western blot analysis with 3F4 antibody. C, purified PrP-AA recognized the PrP protein in Western blots of brain cortex and cerebellar (Cere) homogenates of A117V transgenic mice but not KO mice. Although, multiple bands were observed with overexposure, the strongest signal corresponded to the approximately band of 29 kDa PrP (A117V) observed in PrP(A117V) transgenic mice. D, Western blot analysis of immunoprecipitates from brain homogenates (1 mg transgenic mouse cerebellum and 10 mg Sc237 hamster brain) pretreated with or without proteinase K using PrP-AA or autoantibodies against A $\beta$ . An anti-PrP antibody 6D11 which detects both mouse and hamster PrP, was used for detecting antibody. Numbers adjacent to horizontal lines indicate positions of molecular mass markers (kDa). 10  $\mu$ l samples were loaded in each lane. Purified PrP-AA recognized both PrP and PK-resistant PrP<sup>Sc</sup> (27–30 kDa). Autoantibodies against A $\beta$  did not recognize PrP nor PK-resistant PrP<sup>Sc</sup> (27–30 kDa). The photo was selected from a single representative experiment that was repeated three times with similar results. PT, pass-through IgG depleted of PrP-AA. A $\beta$ -AA, autoantibodies against A $\beta$ .

residue KTNMK (106–110) as demonstrated in Fig. 3, C and D. Both lysines in this motif are critical for high affinity antibody binding since substitution or deletion of either completely abolished PrP-AA binding (Fig. 3).

Next we investigated by electron microscopy, mass spectrometry, and fluorometric measurement using a Thioflavin T (ThT) reagent that binds specifically to fibrillar structures whether purified human PrP-AA could block PrP fibril formation as well as disaggregate preformed fibrils (Fig. 4). Dose-response and kinetic studies showed that pre-incubating PrP<sub>106-126</sub> monomers or preformed peptide fibrils with purified human PrP-AA dose-dependently prevented fibril formation and disrupted preformed fibril structures in a time-dependent manner, as evidenced by a substantial decrease in ThT fluorescence (Fig. 4, A and B) compared with the control using PT. These findings were confirmed in independent experiments using various concentrations of PrP-AA and reaction time (Fig. 4, C and D).

To confirm findings obtained from the ThT fluorescence assay and to exclude interference of ThT bound with PrP fibrils by antibodies, fibrils, and monomers were visualized by electron microscopy and measured by mass spectrometry. The mass spectra of PrP monomers incubated with (Fig. 4D) or

## Autoantibodies Block Prion Neurotoxicity



**FIGURE 3. Mapping PrP-AA binding epitopes.** Domain specificities of PrP-AA were determined using a peptide microarray. Sequences of either sequentially one amino acids shifted (A) or single amino acids deletions (C) peptides within region PrP<sub>106–126</sub> which were synthesized and spotted on membranes are displayed in A and C. Membranes were then probed with PrP-AA (2  $\mu$ g/ml) and then HRP conjugated anti-human-IgG antibody (triplicate membranes were probed). The sequence motif KTNMK appeared to be highly important since only peptide 1 is bound by PrP-AA, as shown in panel B. Further validation came from experiments shown in panel D, which show strong binding only when residues 1–5 are present, implying the two lysines (KXXXX) are key elements for binding.

without (Fig. 4E) PrP-AA revealed that PrP-AA treatments significantly increased the well-resolved PrP monomer peak, indicating that PrP-AA blocked PrP fibril formation. Electron microscopic examination of these reactions confirmed the data from mass spectrometry (Fig. 4, E and F).

We next assessed whether PrP-AA could protect cultured primary rat neurons from toxicity of predominantly fibrillar PrP<sub>106–126</sub>, as determined by measuring viability using FDA/PI stains (Figs. 5 to 7). The addition of PrP<sub>106–126</sub> was allowed to form fibrils before addition induced neuronal death in a dose-dependent fashion (Fig. 5A). In contrast, a control peptide with a scrambled PrP<sub>106–126</sub> sequence showed no neurotoxicity compared with PrP<sub>106–126</sub> (Fig. 5B). These data demonstrate the specific toxicity to CGN of PrP<sub>106–126</sub>, which had been allowed to form fibers before addition.

Next we tested whether neurotoxicity of PrP<sub>106–126</sub> monomers or fibers could be blocked by pre-incubating with purified PrP-AA before adding to cultures of CGN. Human PrP-AA almost completely prevented neurotoxicity of the mutated PrP<sub>106–126</sub>(A117V) added as monomers (Fig. 6A) or preformed fibrils (Fig. 6B). In addition, PrP-AA also potentially blocked wild-type PrP<sub>106–126</sub>-induced neurotoxicity (Fig. 6C). Conversely, PrP-AA-depleted fraction of IVIg failed to protect against neurotoxicity produced by either peptide.

Previous studies reported that, unlike the wild-type peptide, PrP<sub>106–126</sub>(A117V) fibrils induce inflammation-mediated neurotoxicity (36). To confirm that purified human PrP-AA protected against inflammation related neurotoxicity of PrP<sub>106–126</sub>(A117V), we applied co-culture system of CGN combined with glia cells.

Consistent with the previous report, treatment of these mixed cultures with preformed PrP<sub>106–126</sub>(A117V) fibrils led to markedly greater CGN death (Fig. 7) compared with treatment of CGN monocultures (Fig. 6). This toxicity was greatly reduced with PrP-AA pretreatment of fibrils (Fig. 7). In contrast, PT demonstrated no neuroprotective effects.

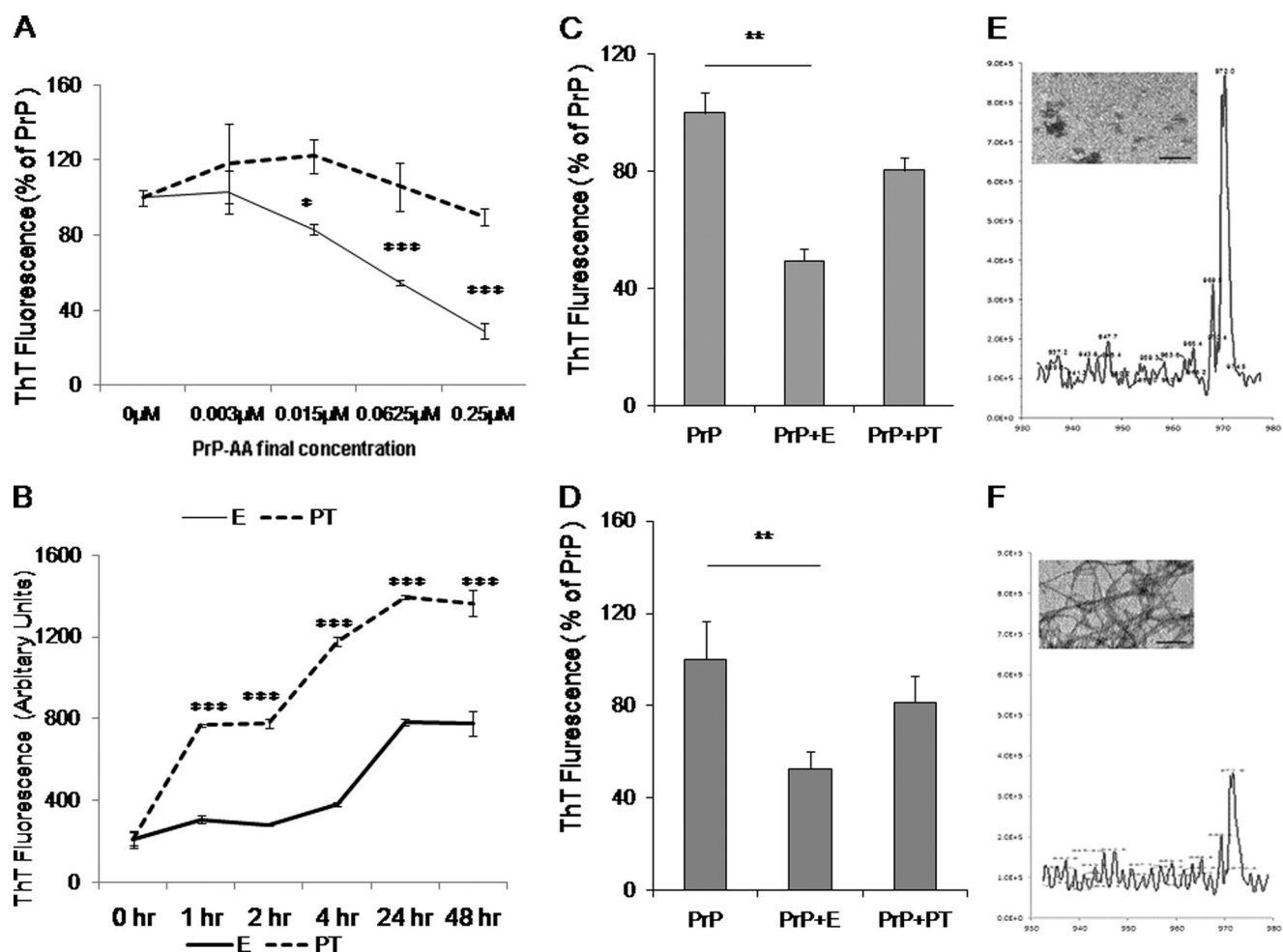
## DISCUSSION

We have identified specific prion protein-binding antibodies in both sera and CSF from normal individuals and have demonstrated neutralization of PrP toxicity in primary cerebellar neurons. This is the first identification and isolation of PrP antibodies from subjects with no documented exposure to prion antigens. Both immunoprecipitation and Western blot data suggest that PrP-AA strongly binds to the PrP monomer and PrP<sup>Sc</sup>. We speculate that these autoantibodies may have normal physiological functions of immune-mediated PrP replication control or clearance, similar to what we have previously postulated for circulating A $\beta$  antibodies (13, 15). Our results demonstrate that human PrP-AA can be isolated from currently marketed IVIg; thus, the potential for producing a consistent product to test in the clinic is enhanced.

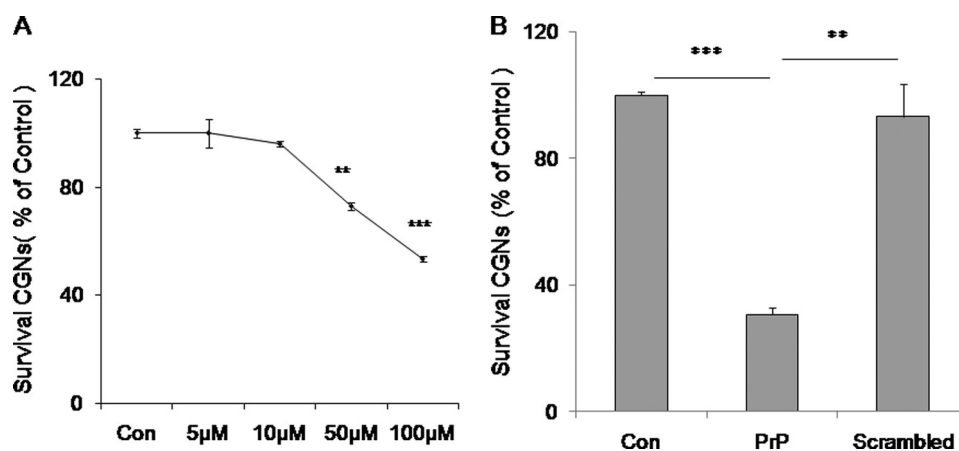
It has been previously suggested that PrP antibodies may be an effective immunotherapy for prion diseases (50). Interestingly, even though TSE is a CNS disease, PrP<sup>Sc</sup> accumulates in lymphoid tissues before CNS involvement. Accordingly, lymphoid PrP<sup>Sc</sup> represents an early primary target for therapeutic strategies, given the greater accessibility of peripheral tissues compared with privileged CNS system which significantly impedes penetration of the antibodies through the blood brain barrier. Possible immunotherapies are active immunization with a PrP antigen or passive immunization with selective antibodies. Development of an active immunization therapy may be problematic since prion infections do not elicit a classical immune response and there likely would be great reticence to immunize asymptomatic or uninfected individuals given the known infectivity of this peptide (50). In addition, a phase II clinical trial in AD patients testing active immunization with the A $\beta$  epitope, AN1792, failed due to severe side effects. Passive immunization, on the other hand, may represent a better approach given the lack of issues cited above.

Our present finding of fairly abundant levels of PrP-AA in normal human sera and concentrated pooled IgG, which can be purified and concentrated, represents a new opportunity for rapidly developing an effective and relatively safer immunotherapy for prion diseases. Alternatively, a humanized monoclonal antibody targeting the PrP epitope could be developed based on the binding sequence of PrP-AA. Although monoclonal antibodies may be viewed as more optimal than purified polyclonal antibodies from the standpoint of consistency of preparation, there is still concern that chronic dosing with humanized antibodies may generate anti-idiotypic responses directed to the residual mouse CDR sequences.

We demonstrate that purified PrP-AA dramatically inhibit PrP fibril formation and disrupt preformed PrP fibrils, as reported in previous studies using mouse PrP antibodies (8–9). The epitope for human PrP-AA is a unique, within the human genome, five-amino acid sequence located at the N terminus of

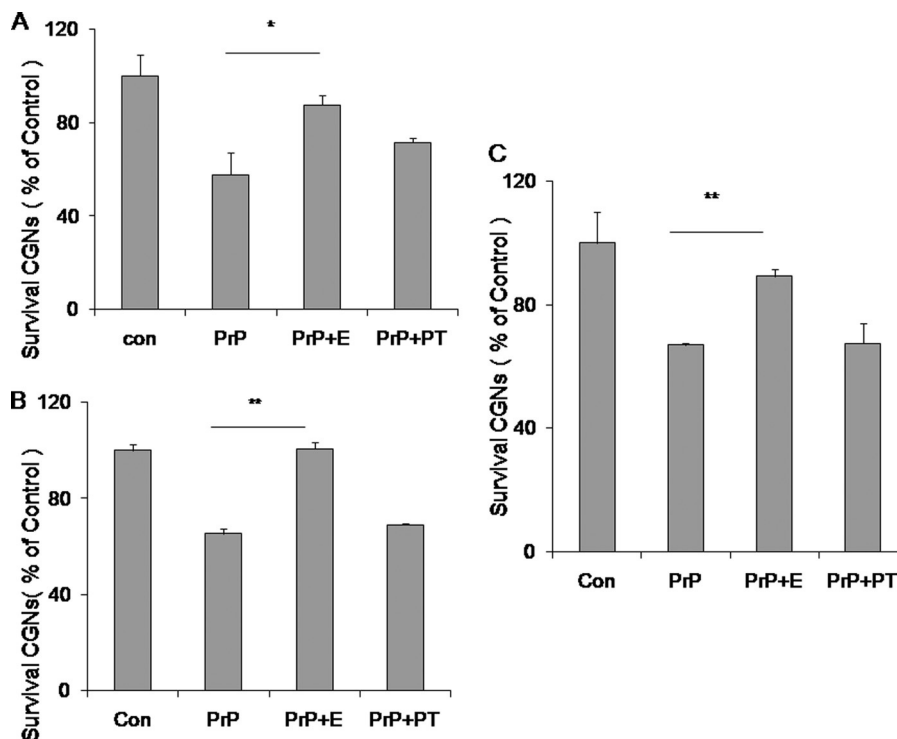


**FIGURE 4. Effects of PrP-AA on PrP peptide's fibril formation.** *A*, dose-response study of PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril formation and PrP-AA effects. *B*, kinetic study of 50  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril formation and 0.07  $\mu\text{M}$  PrP-AA effects. *C*, incubation of 50  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub>(A117V) peptides with or without purified PrP-AA in PBS. Purified PrP-AA significantly inhibited PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril formation. *D*, incubation of preformed fibrils from 50  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub>(A117V) peptides with purified PrP-AA (*E*, 0.07  $\mu\text{M}$ ) or pass-through IgG (*PT*, 0.07  $\mu\text{M}$ ) in PBS for 48 h. Purified PrP-AA significantly disaggregated preformed PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibrils as measured by ThT staining. Samples were run in triplicate and plotted as the mean  $\pm$  S.D. (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$  compared with PrP only, one-way ANOVA). Representative data from triplicate mass spectra of the PrP<sub>106-126</sub>(A117V) monomer with (*E*) or without (*F*) PrP-AA were inserted to *E* and *F*. Electron micrographs of the products from experiments are shown in *E* and *F* (scale bar = 500 nm). *E*, PrP-AA; *PT*, pass-through IgG depleted of PrP-AA.

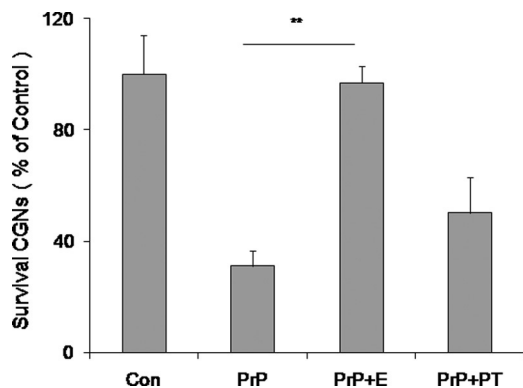


**FIGURE 5. Neurotoxicity of PrP peptides on CGN.** Dose-dependence of PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril neurotoxicity was examined in CGN. The neurons were exposed to different dosages of PrP<sub>106-126</sub>(A117V) (5  $\mu\text{M}$  to 100  $\mu\text{M}$ ) (*A*) or PrP<sub>106-126</sub>(A117V) (100  $\mu\text{M}$ ) and scrambled control peptide (100  $\mu\text{M}$ ) (*B*) for 3 days. Cell viability was determined by staining neurons with fluorescein diacetate/propidium iodide. Values are expressed as percentages (%) of control (untreated). The data represent the mean  $\pm$  S.D. (bars) values of triplicate determinations from a single but representative experiment, which has been repeated three times with similar results (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  by one-way ANOVA).

## Autoantibodies Block Prion Neurotoxicity



**FIGURE 6. Effects of PrP-AA on wild type or mutant PrP<sub>106-126</sub> induced neurotoxicity.** Exposure of rat CGN to 50  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub>(A117V or wild type) fibril resulted in a reduction of neuronal survival during a 3 day incubation period. Purified PrP-AA (0.07  $\mu\text{M}$ ) significantly attenuated PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril-induced neuronal death. *A*, PrP<sub>106-126</sub>(A117V) peptides (50  $\mu\text{M}$ ) were incubated with PrP-AA (0.07  $\mu\text{M}$ ) before being exposed to neurons. *B*, preformed PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibrils were incubated with PrP-AA (0.07  $\mu\text{M}$ ) before being exposed to neurons. *C*, preformed wild-type PrP<sub>106-126</sub>(117A) fibrils were incubated with PrP-AA (0.07  $\mu\text{M}$ ) before exposed to neurons. Cell viability was determined by staining neurons with fluorescein diacetate/propidium iodide. The data represent the mean  $\pm$  S.D. of triplicate determinations from a representative experiment repeated at least three times with similar results (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , compared with PrP<sub>106-126</sub> only, one-way ANOVA). *Con*, untreated cultures; *PrP*, PrP<sub>106-126</sub>(A117V or wild type) peptides; *E*, PrP-AA; *PT*, pass-through IgG depleted of PrP-AA.



**FIGURE 7. Analysis of PrP-AA in the culture system.** The PrP-AA prevented PrP<sub>106-126</sub>(A117V) induced neurotoxicity in a neuron-glia co-culture system. Purified PrP-AA significantly blocked PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril-induced neuronal death in the co-cultured system. CGN-glia were treated with 50  $\mu\text{M}$  PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril only and PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril that had been preincubated with 0.07  $\mu\text{M}$  PrP-AA for 24 h. Cell viability was determined by staining neurons with fluorescein diacetate/propidium iodide. Values are expressed as percentages (% of control (untreated)). The data represent the mean  $\pm$  S.D. (bars) values of triplicate determinations from a single but representative experiment, which has been repeated three times with similar results (\*\*,  $p < 0.01$ , by one-way ANOVA). *PrP*, PrP<sub>106-126</sub>(A117V) peptides; *E*, PrP-AA; *PT*, pass-through IgG depleted of PrP-AA.

the PrP<sub>106-126</sub> peptide, which is conserved between humans and hamster PrP. Human PrP-AA recognizes the full-length hybrid hamster/mouse prion protein containing the A117V mutation when expressed in a transgenic mouse line. Interestingly enough, human PrP-AA also directly and strongly binds to a well known hamster protease-resistant PrP<sup>Sc</sup> protein, SC237,

indicating human IgG, somehow, may be involved in protecting humans to resist prion infections at a certain degree. The finding that PrP-AA binding is disrupted by mutating a small stretch of amino acids exclusively, suggests that the pool of purified IgG is comprised of only a small number of antibody clones. Furthermore, it identifies a discrete region within the full-length peptide that is crucial for fibril formation and neurotoxicity. Since binding occurs at a region of the PrP protein (e.g. 106–110) without known mutations, this purified PrP-AA should be effective for treatment of all prion diseases. Indeed, we have demonstrated prevention of both wild type and PrP<sub>106-126</sub>(A117V) fibril formation and peptide-induced neurotoxicity. In addition, the different pathways of neuronal death induced by these two peptides suggest that PrP-AA may have a broad function to treat prion diseases besides GSS. Additionally, since PrP-AA could interact with PrP<sup>Sc</sup>, it is necessary to perform a future study to show whether the human PrP-AA can interfere with human PrP<sup>Sc</sup> formation, replication, and PrP<sup>Sc</sup>-induced neurotoxicity in the brain. Additionally, it is also important in future studies to test the effect of the PrP-AA on aggregation of full-length PrP or the N-terminal domain of wild-type PrP. Experiments are currently underway in transgenic models expressing various forms of the full-length protein to test this prediction.

This study provides strong evidence that PrP-AA is found in normal human blood and CSF and can be easily purified from pooled IgG. The similar features of PrP-AA to autoanti-A $\beta$  antibodies suggests treatment of prion diseases with PrP-AA is

highly feasible, especially since whole IVIg clinical trials for AD are currently ongoing and have demonstrated some efficacy (51). Thus, administration of purified human PrP-AA or IVIg may be used some day to prevent or slow down prion disease progression.

## REFERENCES

- Prusiner, S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* **252**, 1515–1522
- Bugiani, O., Giaccone, G., Piccardo, P., Morbin, M., Tagliavini, F., and Ghetti, B. (2000) Neuropathology of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. *Microsc. Res. Tech.* **50**, 10–15
- Ghetti, B., Piccardo, P., Frangione, B., Bugiani, O., Giaccone, G., Young, K., Prelli, F., Farlow, M. R., Dlouhy, S. R., and Tagliavini, F. (1996) Prion protein amyloidosis. *Brain Pathol.* **6**, 127–145
- Giaccone, G., Verga, L., Bugiani, O., Frangione, B., Serban, D., Prusiner, S. B., Farlow, M. R., Ghetti, B., and Tagliavini, F. (1992) Prion protein preamyloid and amyloid deposits in Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease, Indiana kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 9349–9353
- Kitamoto, T., Tateishi, J., Tashima, T., Takeshita, I., Barry, R. A., DeArmond, S. J., and Prusiner, S. B. (1986) Amyloid plaques in Creutzfeldt-Jakob disease stain with prion protein antibodies. *Ann. Neurol.* **20**, 204–208
- Tateishi, J., Kitamoto, T., Hashiguchi, H., and Shii, H. (1988) Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease: immunohistological and experimental studies. *Ann. Neurol.* **24**, 35–40
- Ghetti, B., Tagliavini, F., Masters, C. L., Beyreuther, K., Giaccone, G., Verga, L., Farlow, M. R., Conneally, P. M., Dlouhy, S. R., and Azzarelli, B. (1989) Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease. II. Neurofibrillary tangles and plaques with PrP-amyloid coexist in an affected family. *Neurology* **39**, 1453–1461
- Peretz, D., Williamson, R. A., Kaneko, K., Vergara, J., Leclerc, E., Schmitt-Ulms, G., Mehlhorn, I. R., Legname, G., Wormald, M. R., Rudd, P. M., Dwek, R. A., Burton, D. R., and Prusiner, S. B. (2001) Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity. *Nature* **412**, 739–743
- Enari, M., Flechsig, E., and Weissmann, C. (2001) Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 9295–9299
- Heppner, F. L., Musahl, C., Arrighi, I., Klein, M. A., Rülcke, T., Oesch, B., Zinkernagel, R. M., Kalinke, U., and Aguzzi, A. (2001) Prevention of scrapie pathogenesis by transgenic expression of anti-prion protein antibodies. *Science* **294**, 178–182
- White, A. R., Enever, P., Tayebi, M., Mushens, R., Linehan, J., Brandner, S., Anstee, D., Collinge, J., and Hawke, S. (2003) Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* **422**, 80–83
- Sigurdsson, E. M., Brown, D. R., Daniels, M., Kascsak, R. J., Kascsak, R., Carp, R., Meeker, H. C., Frangione, B., and Wisniewski, T. (2002) Immunization delays the onset of prion disease in mice. *Am. J. Pathol.* **161**, 13–17
- Du, Y., Dodel, R., Hampel, H., Buerger, K., Lin, S., Eastwood, B., Bales, K., Gao, F., Moeller, H. J., Oertel, W., Farlow, M., and Paul, S. (2001) Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology* **57**, 801–805
- Weksler, M. E., Relkin, N., Turkenich, R., LaRusse, S., Zhou, L., and Szabo, P. (2002) Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp. Gerontol.* **37**, 943–948
- Dodel, R., Hampel, H., Depboylu, C., Lin, S., Gao, F., Schock, S., Jäckel, S., Wei, X., Buerger, K., Höft, C., Hemmer, B., Möller, H. J., Farlow, M., Oertel, W. H., Sommer, N., and Du, Y. (2002) Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* **52**, 253–256
- Dodel, R. C., Du, Y., Depboylu, C., Hampel, H., Frölich, L., Haag, A., Hemmeter, U., Paulsen, S., Teipel, S. J., Bretschneider, S., Spottke, A., Nölker, C., Möller, H. J., Wei, X., Farlow, M., Sommer, N., and Oertel, W. H. (2004) Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **75**, 1472–1474
- Dodel, R., Neff, F., Noelker, C., Pul, R., Du, Y., Bacher, M., and Oertel, W. (2010) *Drugs* **70**, 513–528
- Du, Y., Wei, X., Dodel, R., Sommer, N., Hampel, H., Gao, F., Ma, Z., Zhao, L., Oertel, W. H., and Farlow, M. (2003) Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* **126**, 1935–1939
- Beekes, M. (2007) Prions and prion diseases. *FEBS J.* **274**, 575
- DeArmond, S. J., Yang, S. L., Lee, A., Bowler, R., Taraboulos, A., Groth, D., and Prusiner, S. B. (1993) Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 6449–6453
- Wisniewski, T. (2001) Henry M. Wisniewski M.D. Ph.D. *J. Alzheimers Dis.* **3**, 7–22
- Wisniewski, T., and Sigurdsson, E. M. (2007) Therapeutic approaches for prion and Alzheimer's diseases. *FEBS J.* **274**, 3784–3798
- Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 301–307
- Hanan, E., Goren, O., Eshkenazy, M., and Solomon, B. (2001) Immunomodulation of the human prion peptide 106–126 aggregation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 115–120
- Fioriti, L., Quaglio, E., Massignan, T., Colombo, L., Stewart, R. S., Salmona, M., Harris, D. A., Forloni, G., and Chiesa, R. (2005) The neurotoxicity of prion protein (PrP) peptide 106–126 is independent of the expression level of PrP and is not mediated by abnormal PrP species. *Mol. Cell Neurosci.* **28**, 165–176
- Tagliavini, F., Forloni, G., D'Urso, P., Bugiani, O., and Salmona, M. (2001) Studies on peptide fragments of prion proteins. *Adv. Protein Chem.* **57**, 171–201
- Forloni, G., Angeretti, N., Chiesa, R., Monzani, E., Salmona, M., Bugiani, O., and Tagliavini, F. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **362**, 543–546
- Forloni, G., Del Bo, R., Angeretti, N., Chiesa, R., Smirardo, S., Doni, R., Ghibaudi, E., Salmona, M., Porro, M., and Verga, L. (1994) A neurotoxic prion protein fragment induces rat astroglial proliferation and hypertrophy. *Eur. J. Neurosci.* **6**, 1415–1422
- Brown, D. R., Herms, J., and Kretzschmar, H. A. (1994) Mouse cortical cells lacking cellular PrP survive in culture with a neurotoxic PrP fragment. *Neuroreport* **5**, 2057–2060
- Brown, D. R., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. (1996) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* **18**, 59–67
- Brown, D. R., Schmidt, B., and Kretzschmar, H. A. (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* **380**, 345–347
- Brown, D. R. (1998) Prion protein-overexpressing cells show altered response to a neurotoxic prion protein peptide. *J. Neurosci. Res.* **54**, 331–340
- Mastrianni, J. A., Curtis, M. T., Oberholtzer, J. C., Da Costa, M. M., DeArmond, S., Prusiner, S. B., and Garbern, J. Y. (1995) Prion disease (PrP-A117V) presenting with ataxia instead of dementia. *Neurology* **45**, 2042–2050
- Tateishi, J. (1990) Slow virus, prion and nervous system *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **35**, 1327–1331
- Hsiao, K. K., Cass, C., Schellenberg, G. D., Bird, T., Devine-Gage, E., Wisniewski, H., and Prusiner, S. B. (1991) A prion protein variant in a family with the telencephalic form of Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrome. *Neurology* **41**, 681–684
- Brown, D. R. (2000) Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106–126 carrying the Ala(117)→Val mutation. *Biochem. J.* **346**, 785–791
- Molina, F., Laune, D., Gougat, C., Pau, B., and Granier, C. (1996) Improved performances of spot multiple peptide synthesis. *Pept. Res.* **9**, 151–155
- Morel, N., Simon, S., Frobert, Y., Volland, H., Mourton-Gilles, C., Negro, A., Sorgato, M. C., Créminon, C., and Grassi, J. (2004) Selective and efficient immunoprecipitation of the disease-associated form of the prion

## Autoantibodies Block Prion Neurotoxicity

- protein can be mediated by nonspecific interactions between monoclonal antibodies and scrapie-associated fibrils. *J. Biol. Chem.* **279**, 30143–30149
39. Yokoyama, T., Kimura, K. M., Ushiki, Y., Yamada, S., Morooka, A., Nakashiba, T., Sassa, T., and Itohara, S. (2001) *In vivo* conversion of cellular prion protein to pathogenic isoforms, as monitored by conformation-specific antibodies. *J. Biol. Chem.* **276**, 11265–11271
40. Du, Y., Bales, K. R., Dodel, R. C., Liu, X., Glinn, M. A., Horn, J. W., Little, S. P., and Paul, S. M. (1998)  $\alpha 2$ -Macroglobulin attenuates  $A\beta(1-40)$  fibril formation and associated neurotoxicity of cultured fetal rat cortical neurons. *J. Neurochem.* **70**, 1182–1188
41. Du, Y., Dodel, R., Bales, K., Hamilton-Byrd, E., and Paul, S. M. (1997) Involvement of a Caspase-3-like cysteine protease in 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>) mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurochem.* **69**, 1382–1388
42. Resink, A., Hack, N., Boer, G. J., and Balázs, R. (1994) Growth conditions differentially modulate the vulnerability of developing cerebellar granule cells to excitatory amino acids. *Brain Res.* **655**, 222–232
43. Du, Y., Bales, K. R., Dodel, R. C., Hamilton-Byrd, E., Horn, J. W., Czilli, D. L., Simmons, L. K., Ni, B., and Paul, S. M. (1997) Activation of a caspase 3-related cysteine protease is required for glutamate-mediated apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11657–11662
44. Ciani, E., and Paulsen, R. E. (1995) Activation of a reporter gene responsive to NGFI-B in cultured neurons and astrocytes. *J. Mol. Neurosci.* **6**, 131–139
45. Sparapani, M., Dall'Olio, R., Gandolfi, O., Ciani, E., and Contestabile, A. (1997) Neurotoxicity of polyamines and pharmacological neuroprotection in cultures of rat cerebellar granule cells. *Exp. Neurol.* **148**, 157–166
46. Kiedrowski, L., Costa, E., and Wroblewski, J. T. (1992) *In vitro* interaction between cerebellar astrocytes and granule cells: a putative role for nitric oxide. *Neurosci. Lett.* **135**, 59–61
47. Weissmann, C., and Flechsig, E. (2003) PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br. Med. Bull.* **66**, 43–60
48. Hegde, R. S., Mastrianni, J. A., Scott, M. R., DeFea, K. A., Tremblay, P., Torchia, M., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., and Lingappa, V. R. (1998) A transmembrane form of the prion protein in neurodegenerative disease. *Science* **279**, 827–834
49. Flego, M., Ascione, A., Zamboni, S., Dupuis, M. L., Imperiale, V., and Cianfriglia, M. (2007) Generation of human scFvs antibodies recognizing a prion protein epitope expressed on the surface of human lymphoblastoid cells. *BMC Biotechnol.* **7**, 38
50. Weissmann, C., Raeber, A. J., Montrasio, F., Hegyi, I., Frigg, R., Klein, M. A., and Aguzzi, A. (2001) Prions and the lymphoreticular system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **356**, 177–184
51. Relkin, N. R., Szabo, P., Adamiak, B., Burgut, T., Monthe, C., Lent, R. W., Younkin, S., Younkin, L., Schiff, R., and Weksler, M. E. (2009) 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging* **30**, 1728–1736



# Prion Peptide Uptake in Microglial Cells – The Effect of Naturally Occurring Autoantibodies against Prion Protein

Yvonne Roettger<sup>1</sup>, Inga Zerr<sup>2</sup>, Richard Dodel<sup>1\*</sup>, Jan-Philipp Bach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, Philipps-University Marburg, Marburg, Germany, <sup>2</sup> Department of Neurology and National Reference Center for Surveillance of Transmissible Spongiform Encephalopathies, Georg August University Göttingen, Göttingen, Germany

## Abstract

In prion disease, a profound microglial activation that precedes neurodegeneration has been observed in the CNS. It is still not fully elucidated whether microglial activation has beneficial effects in terms of prion clearance or whether microglial cells have a mainly detrimental function through the release of pro-inflammatory cytokines. To date, no disease-modifying therapy exists. Several immunization attempts have been performed as one therapeutic approach. Recently, naturally occurring autoantibodies against the prion protein (nAbs-PrP) have been detected. These autoantibodies are able to break down fibrils of the most commonly used mutant prion variant PrP106-126 A117V and prevent PrP106-126 A117V-induced toxicity in primary neurons. In this study, we examined the phagocytosis of the prion peptide PrP106-126 A117V by primary microglial cells and the effect of nAbs-PrP on microglia. nAbs-PrP considerably enhanced the uptake of PrP106-126 A117V without inducing an inflammatory response in microglial cells. PrP106-126 A117V uptake was at least partially mediated through scavenger receptors. Phagocytosis of PrP106-126 A117V with nAbs-PrP was inhibited by wortmannin, a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, indicating a separate uptake mechanism for nAbs-PrP mediated phagocytosis. These data suggest the possible mechanisms of action of nAbs-PrP in prion disease.

**Citation:** Roettger Y, Zerr I, Dodel R, Bach J-P (2013) Prion Peptide Uptake in Microglial Cells – The Effect of Naturally Occurring Autoantibodies against Prion Protein. PLoS ONE 8(6): e67743. doi:10.1371/journal.pone.0067743

**Editor:** Corinne Ida Lasmezas, The Scripps Research Institute Scripps Florida, United States of America

**Received:** February 1, 2013; **Accepted:** May 22, 2013; **Published:** June 28, 2013

**Copyright:** © 2013 Roettger et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Dr. J.-P. Bach received research grants by the Alzheimer Forschungsinitiative (AFI), Grifols and Baxter as well as the University of Marburg. This work was supported by a research grant of the University Medical Center Gießen and Marburg (UKGM). Yvonne Röttger was in part supported by a grant of the Competence Network Degenerative Dementias (German Ministry of Education and Research, BMBF 01G11008C). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have the following competing interests. Dr. J.-P. Bach received research grants from Grifols and Baxter and lecturing fees from Teva pharmaceuticals. There are no patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors.

\* E-mail: dodel@med.uni-marburg.de

## Introduction

Prion diseases are a group of transmissible neurodegenerative diseases characterized by progressive neuronal cell death, astrogliosis and microglial activation, leading to a spongiform degeneration of the central nervous system (CNS). The hallmark of the disease is the conversion of the physiological cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) into its isoform called scrapie prion protein (PrP<sup>Sc</sup>). This conversion is followed by further oligomerization and fibrillation, which has a pathological effect on cells. PrP<sup>Sc</sup> is characterized by high  $\beta$ -sheet content, protease resistance and a potential to accumulate into aggregates [1,2].

Recently, autoantibodies against the prion protein (nAbs-PrP) have been detected [3]. They are able to block the fibrillation into aggregates of prion peptides *in vitro* and can further reduce the toxicity of the peptides on cultured primary neurons. Naturally occurring autoantibodies (nAbs) are part of the innate immune system and make up 2/3 of the total IgG in humans [4]. nAbs have also been detected against other aggregating proteins, including  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ), tau and  $\alpha$ -synuclein, and their role in neurodegenerative diseases is a major topic of current research [3,5,6,7].

Prion-induced toxicity to neuronal cells depends on PrP<sup>C</sup> expression, as cells from PrP<sup>0/0</sup> mice are not susceptible to prion exposure [8]. The toxicity of prion peptides to neuronal cells further requires the presence of microglial cells [9,10]. The release of destructive oxidants by microglial cells is involved in this mechanism [8]. Microglial cells play an important role in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease. However, it is still controversial whether they play a protective role by secreting neurotrophic and anti-inflammatory molecules and support the clearance of accumulated proteins or whether they contribute to disease progression by releasing several cytotoxic substances, such as nitric oxide (NO) and pro-inflammatory cytokines [11]. In prion disease, microglial activation precedes neuronal cell death, indicating a potential detrimental role of microglia [12]. On the other hand, microglia internalize PrP<sup>Sc</sup> and prion peptides, suggesting a clearance activity of microglial cells in prion disease [13].

Therefore, we aimed to analyze whether primary microglial cells phagocytose PrP106-126 A117V and whether this uptake can be influenced by nAbs-PrP. PrP106-126 A117V is a synthetic peptide carrying residues 106-126 of human prion protein with an A117V mutation, which is linked to Gerstmann-Straussler-

Scheinker-syndrome. PrP106-126 A117V exhibits some of the physicochemical and pathogenic properties of PrP<sup>Sc</sup>, including the formation of fibrils and the ability to induce apoptosis in neuronal cells [14,15]. Compared to PrP106-126, it forms fibrils even faster *in vitro* [16], and both peptides are widely used to mimic the effect of PrP<sup>Sc</sup> *in vitro*.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal procedures were conducted according to current German law for animal welfare and were announced to the Regierungspräsidium Giessen (district president). Approval by an institutional animal welfare committee as such is not required for this type of experiment. According to current German law (TierSchG, §6 Abs. 1, Nr. 4), it is sufficient to announce these experiments to the district president ([http://www.rp-giessen.hessen.de/irj/RPGIE\\_Internet?cid=efcda20a6301329333db4f7e186a14d1](http://www.rp-giessen.hessen.de/irj/RPGIE_Internet?cid=efcda20a6301329333db4f7e186a14d1)). All animal procedures were approved by the office of the district president and the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Marburg.

### Primary Cell Culture

Primary mouse cell cultures were prepared from embryonic day 13.5 (E13.5) Swiss Webster mice. Pregnant mice were purchased from Janvier at the stage when the embryo was at day 12.5 (Janvier, Le Genest-saint-Isle, France) and housed overnight in our animal-care facility until sacrifice. Mice were housed on a 12-hour light-dark schedule (lights on 07:00–19:00). They had free access to tap water, were fed *ad libitum* and were kept under standard conditions. The oldest embryo used during the latest period of this study was 13.5 days. After pregnant dams were sacrificed by cervical dislocation by experienced researchers, embryos were removed from the uterus. Embryonic death was confirmed by dislocating their heads before preparation of the brain.

Mesencephalons were used for the preparation of microglial cell cultures to achieve highest yield of microglial cells [17]. Briefly, mesencephalons from embryonic brains, were collected in 2 ml Leibovitz L-15 medium (PAA Laboratories, Pasching, Austria) and homogenized by gently pipetting up and down 30 times. After the addition of 5 ml Leibovitz L-15 medium, the cell solution was left for 10 minutes to remove debris and 5 ml of the supernatant was transferred into a new tube. After centrifugation at 300 g for 5 min, the supernatant was discarded and the remaining pellet was resuspended in 1 ml Dulbeccòs modified Eagle's medium (DMEM with L-glutamine; Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (PAA Laboratories), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Lonza). Cells were cultured in polyethylenimine (PEI)-coated 6-well plates. To further improve the yield of microglial cells, the cell media was supplemented with 10 ng/ml GM-CSF (Roche, Basel, Switzerland) as previously described by Re et al. and Esen et al. [18,19]. Instead of the trypsinization protocol and the replating of microglial cells described by Saura et al., we replated the cells without a preceding trypsinization step. Then we followed the protocol by Saura et al. and cells were cultured for 14 days until experimental use [20]. Cells were replated onto PEI-coated 24-well or 48-well plates in a density of  $1-2 \times 10^5$  cells per ml. Cells obtained by this protocol were mainly microglia (>95%) as quantified by CD11b staining using FACS analysis before experimental use of the cells.

For neuronal cells, embryonic cortices were isolated and prepared as described above. After centrifugation, cell pellets

were resuspended in Neurobasal-A Medium (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with B27 (GIBCO, Basel, Switzerland), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and L-glutamine and plated in PEI-coated plates. Cells were used for experiments on day 7 *in vitro*.

### Peptides

Peptides were purchased by PSL - Peptide Specialty Laboratories (PSL, Heidelberg, Germany). These peptides included PrP106-126 A117V with the sequence KTNMKHMAGAVAA-GAVVGGLG as well as PrP106-126 A117V with an N-terminal fluorescein isothiocyanate (FITC).

### Purification of nAbs-PrP and ft-PrP

Antibody preparations were isolated from intravenous immunoglobulin (IVIg) as previously described [3]. Briefly, disposable chromatography columns were packed with UltraLink Iodoacetyl Gel (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). PrP106-126 A117V was conjugated to the matrix according to manufacturer's instructions. IVIg (1:1 in PBS) was loaded on the columns overnight at 4°C. Unbound fractions (IVIg depleted of nAbs-PrP, termed flow-through (ft-PrP)) were passed through the columns and collected. After several washes, bound IgG fractions were released and collected by passing elution buffer (50 mM glycine at pH 2.5) through the column. As was shown by Wei et al. (2012), nAbs-PrP bind to the extreme N-terminus of PrP106-126 [3]. The binding requires, at a minimum, residues KTNMK (PrP106-110), with both lysine residues being critical for high-affinity antibody binding. nAbs-PrP bound specifically to PrP106-126 A117V, as was shown by immunoprecipitating PrP106-126 A117V from homogenates of brains from transgenic mice expressing the human sequences encompassing residues 106–126 [3].

### Fibril Formation Assay

The formation of fibrils was quantified by the thioflavin T (ThT) binding assay [21]. Peptides were dissolved in PBS with or without antibodies at final concentrations of 150 µM peptide and 2.5 µM antibody. After incubation for 48 hours at 37°C, samples were added to 80 µl glycine buffer (50 µM, pH 9.2) and 10 µl ThT (4 µM working concentration). Fluorescence was measured using a Tecan Infinite M200 reader with excitation at 450 nm and emission at 485 nm.

### Cell Viability Assays

Peptides were prepared as described above. Microglial cells were treated with a final peptide concentration of 10 µM for 24 hours in DMEM without FCS. Viability was measured either using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay and/or by staining with fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI). For the MTT assay, cells were incubated for 1 hour at 37°C with serum-free medium containing 0.5 mg/ml MTT. Cells were permeabilized with dimethyl sulfoxide (DMSO) (AppliChem, Darmstadt, Germany) for another 30 minutes, and absorbance was measured at 570 nm. For FDA/PI staining, cells were incubated with FDA and PI at final concentrations of 0.15 mg/ml and 0.02 mg/ml, respectively. For the treatment of neuronal cells with the supernatant of microglial cells, medium was removed, and the conditioned medium from treated microglial cells was added. The MTT assay was conducted after 24 hours. All measurements were performed at least in duplicate.

## Quantification of IL-6, TNF- $\alpha$ and NO Release

Primary microglial cells were stimulated with peptide preparations (10  $\mu$ M) and LPS (1  $\mu$ g/ml; extracted from *Escherichia coli*, Sigma). After 24 hours, the supernatant was collected, and IL-6 and TNF- $\alpha$  were quantified using the Duoset ELISA system (R&D, Minneapolis, MN, USA). The production of NO was measured by using the Griess reagent (1 mM sulfanilamide, 1 mM naphthalenediamine dihydrochloride, 100 mM HCL), which detects a degradation product, nitrite (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Absorbance was measured at 450 and 540 nm for the ELISA and Griess assay, respectively.

## Western Blot

Cell lysates were prepared according to the manufacturer's protocol using M-Per solution (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) supplemented with protease inhibitor. Total cell protein was loaded onto 4–12% NuPage Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and electroblotted onto nitrocellulose membranes. Following blocking with 1 $\times$  Roti-block (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), membranes were stained with POD-conjugated anti-human IgG (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) (1/25000) or anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) (1/5000). Binding was visualized by incubating membranes with Super Signal West Dura Extended Duration working solution (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) followed by exposure to an autoradiographic film (CL-Xposure Film, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA).

## PrP106-126 A117V Uptake Assay

Fibrillation was carried out as described above using 150  $\mu$ M FITC-labeled PrP106-126 A117V with or without 2.5  $\mu$ M antibodies (nAbs-PrP or ft-PrP). Primary microglial cells were treated with PrP106-126 A117V-FITC for 3 hours at 37°C in DMEM without FCS. For flow-cytometric analysis, cells were harvested after several washes with ice-cold PBS. Cells were washed with fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (PBS with 0.1% FCS) and probed with APC-conjugated CD11b antibody (eBioscience, San Diego, CA, USA) for 20 minutes at 4°C and protected from the light. After washing cells with FACS buffer, cells were stained with HOECHST 33258 (Sigma, St. Louis, MO, USA) to detect dead cells. Measurements were carried out with an LSR II flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), and the analysis was performed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). Only CD11b-positive and Hoechst-negative cells were used for the evaluation of PrP106-126 A117V-FITC uptake. PrP106-126 A117V uptake was measured by the mean fluorescence intensity of the cells. The uptake of antibodies was determined by Western blot.

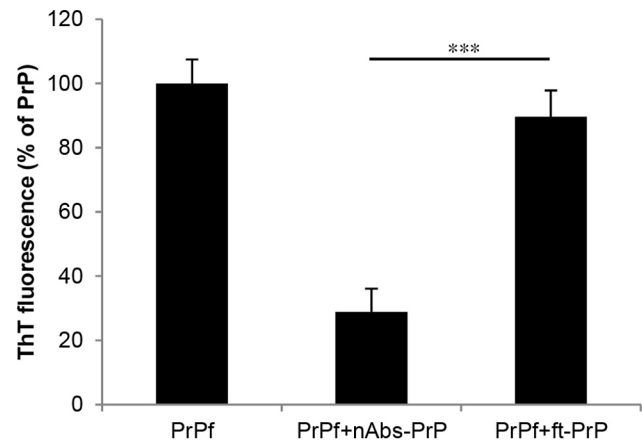
## Statistical Analysis

All results are presented as the mean  $\pm$  SD. To assess statistical significance, we used Student's *t* test. The following definitions were used:  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.01$  (\*\*) and  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## Results

### nAbs-PrP Block Fibril Formation of PrP106-126 A117V

All experiments were carried out using PrP106-126 A117V in its fibrillated form. For this purpose, the peptide was incubated either alone or with nAbs-PrP or ft-PrP for 48 hours at 37°C. Fibrillation was reduced by 70% when the peptide was incubated with nAbs-PrP, whereas co-incubation of the peptide with nonspecific IgG (ft-PrP) did not reduce the fibril formation (Fig. 1).



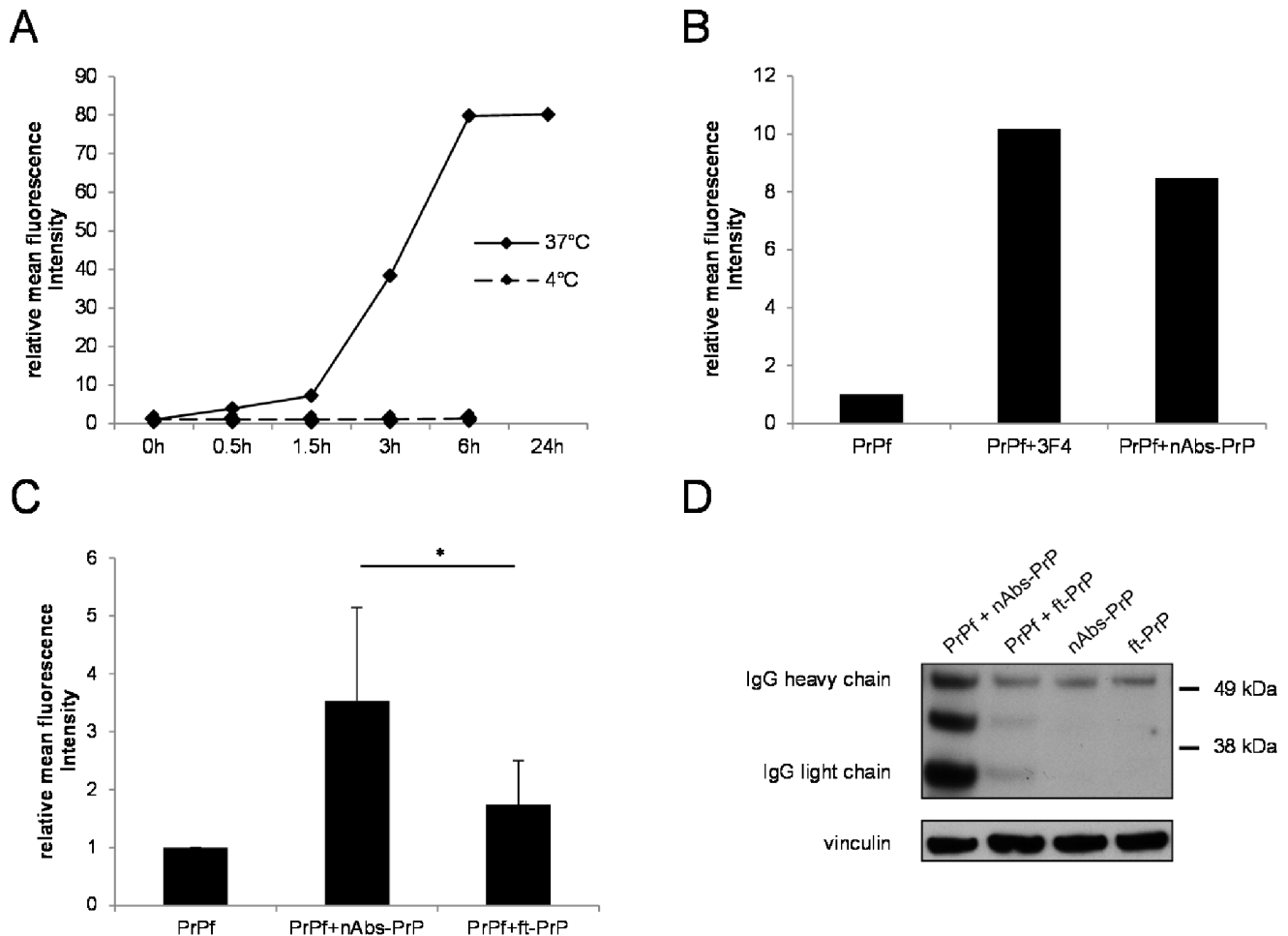
**Figure 1. nAbs-PrP block fibril formation of PrP106-126 A117V.** PrP106-126 A117V peptide (150  $\mu$ M) was incubated with or without nAbs-PrP and ft-PrP at a ratio of 1:60 at 37°C for 48 hours. The ThT Assay was performed to measure fibril formation. Fibril formation of PrP106-126 A117V was referred to as 100%. Experiments were performed at least three times independently.  
doi:10.1371/journal.pone.0067743.g001

The monoclonal anti-PrP antibody 3F4 also reduced PrP106-126 A117V fibril formation by 60% (data not shown).

### Uptake of PrP106-126 A117V, nAbs-PrP and ft-PrP in Primary Microglial Cells

Prion peptides are taken up by neurons, microglia and astrocytes [13]. We found that microglial cells phagocytosed FITC-labeled PrP106-126 A117V fibrils in a time-dependent manner, with a maximum uptake after 6 hours when normalized to untreated cells (Fig. 2A). This effect was energy-dependent and was not due to unspecific binding of fibrils to the cells, as we verified by control experiments carried out at 4°C (Fig. 2A).

Because we demonstrated that nAbs-PrP, as well as the monoclonal anti-PrP antibody 3F4, prevented PrP106-126 A117V fibril formation, we next investigated the effect of nAbs-PrP on the phagocytic ability of microglia. PrP106-126 A117V fibrillation was carried out in the presence or absence of nAbs-PrP or 3F4, and cells were treated with those peptide preparations for 3 hours. To be able to measure either a drop or a rise in the uptake of PrP106-126 A117V when co-incubated with nAbs-PrP, we chose this intermediate uptake level for further experiments (compared with Fig. 2A). After cells were treated with co-incubations of labeled prion peptide and the monoclonal anti-PrP-antibody 3F4 or nAbs-PrP, a 10-fold increase in prion peptide uptake was observed (Fig. 2B). To rule out a non-specific antibody effect, we repeated the same experiment with ft-PrP. ft-PrP did not significantly increase the FITC-PrP106-126 A117V uptake of microglia compared to nAbs-PrP (Fig. 2C). To investigate whether primary microglial cells phagocytosed nAbs-PrP and ft-PrP, we performed Western blot analysis with microglial cell lysates after 3 hour treatment (Fig. 2D). Cells were either treated with antibodies alone (nAbs-PrP or ft-PrP) or co-incubated with a combination of PrP106-126 A117V and antibody (PrP106-126 A117V with nAbs-PrP or ft-PrP). Microglial cells phagocytosed nAbs-PrP to a slightly greater extent than ft-PrP. The co-administration of PrP106-126 A117V and nAbs-PrP led to a strong increase in nAbs-PrP uptake, whereas the co-administration of PrP106-126 A117V with ft-PrP led only to a slight increase of ft-PrP uptake.



**Figure 2. Uptake of prion fibrils, nAbs-PrP and ft-PrP in primary microglial cells.** The uptake of PrP106-126 A117V fibrils (10  $\mu$ M) was measured after 0, 0.5, 1.5, 3, 6 and 24 hour treatment by flow-cytometric analysis. Control experiments were conducted at 4°C to verify that this process was energy-dependent and not due to unspecific binding to the cells (A). To measure the antibody-mediated uptake of PrP106-126 A117V, cells were treated with preparations from the co-incubation of prion peptides with monoclonal antibody 3F4 or nAbs-PrP (B) for 3 hours. Values are normalized to untreated cells, and one representative experiment out of three is shown (A, B). (C) Uptake was measured following incubation of the cells with PrP106-126 A117V, with or without nAbs-PrP or ft-PrP. Values are normalized to PrP106-126 A117V fibril-treated cells, and data from three independent experiments are shown (C). Western blot analysis of antibody uptake in microglial cells was performed after treatment of the cells for 3 hours with nAbs-PrP, ft-PrP or the co-administration of PrP106-126 A117V and nAbs-PrP or ft-PrP (D). Membranes were probed with peroxidase-conjugated anti-human IgG to detect antibody uptake.  $\alpha$ -Vinculin was used as a loading control. One representative experiment out of three is shown.

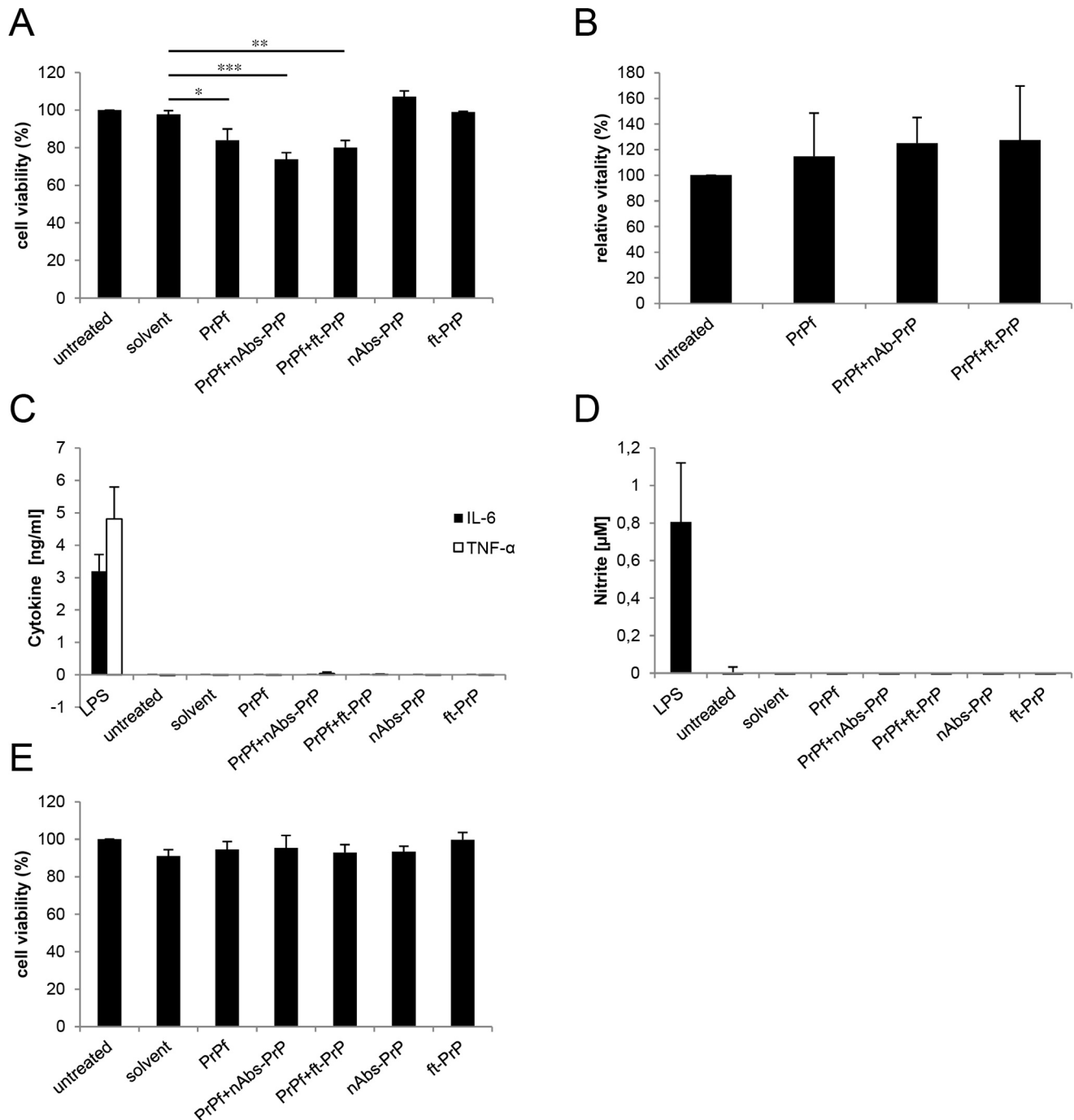
doi:10.1371/journal.pone.0067743.g002

### The Effect of PrP106-126 A117V on Viability and Activation of Microglial Cells

To investigate the effect of prion peptide uptake on microglial cells, we examined the viability of treated cells by applying two different methods. To gain first insights into the reaction of microglial cells following a treatment with PrP106-126 A117V alone, with co-incubation of PrP106-126 A117V with antibodies (nAbs-PrP or ft-PrP) or with antibodies alone (nAbs-PrP or ft-PrP), we performed an MTT assay to measure mitochondrial activity (Fig. 3A). We examined a 15–25% reduction of the signals assessed by MTT assay following a treatment with PrP106-126 A117V alone or with a combination of PrP106-126 A117V and antibodies (nAbs-PrP or ft-PrP) when compared with control cells. Cells treated with nAbs-PrP or ft-PrP alone did not exhibit any differences in the signal intensity assessed by MTT assay compared to untreated cells. Amyloidogenic peptides have been shown to bear the ability to enhance the

exocytosis of the reduced tetrazolium dye in cells [22]. Therefore, the use of MTT assay in combination with amyloidogenic peptides has limitations. To investigate whether the reduction in signal intensity examined by MTT assay following the treatment with PrP106-126 A117V preparations refer to a reduction of vitality of microglial cells, we additionally performed FDA/PI staining. No reduction in vitality was observed when counting living cells after the treatment with PrP106-126 A117V alone or with a combination of PrP106-126 A117V and nAbs-PrP or ft-PrP. Instead, the cells seemed to proliferate (Fig. 3B).

To investigate whether the treatment of microglial cells resulted in cytokine or NO release, concentrations of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and NO were examined in the supernatant of microglial cells (Fig. 3C, D). No cytokine or NO release was observed (1  $\mu$ g/ml LPS served as a positive control). To examine whether microglial cells exhibited detrimental function toward primary neuronal cells, we exposed



**Figure 3. Effect of PrP106-126 A117V on microglia.** Following treatment for 24 hours with 10  $\mu$ M PrP106-126 A117V with or without nAbs-PrP or ft-PrP, the MTT assay was performed to measure the mitochondrial activity of microglial cells. Values are normalized to untreated cells (A). The vitality of treated cells was verified by staining microglia with fluorescein diacetate/propidium iodide, and values are normalized to untreated cells (B). Supernatants of the cells were subjected to cytokine ELISA (C) and Griess assay (D) with LPS (1  $\mu$ g/ml) as the positive control. (E) Conditioned supernatant of microglial cells was administered to primary neurons for 24 hours, and the MTT assay was performed. Values are normalized to untreated cells. All experiments were performed at least three times independently. doi:10.1371/journal.pone.0067743.g003

neurons to conditioned microglial supernatant. No change in viability was observed (Fig. 3E).

#### Inhibition of PrP106-126 A117V Uptake by Specific Blocker

To investigate the uptake mechanisms of microglia for PrP106-126 A117V, different uptake blockers were employed. Specific blockers were administered to the cells for 30 minutes (10  $\mu$ M

cytochalasin D, 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fucoidan) or 60 minutes (10  $\mu\text{M}$  wortmannin) prior to the treatment with PrP106-126 A117V.

Cytochalasin D interferes with microfilament function and inhibits the phagocytic activity of cells by depolymerizing actin [23,24]. Pre-treatment of microglial cells with cytochalasin D (10  $\mu\text{M}$ ) resulted in an almost complete inhibition of uptake of all three PrP106-126 A117V preparations (PrP106-126 A117V alone or with nAbs-PrP or ft-PrP) (Fig. 4A).

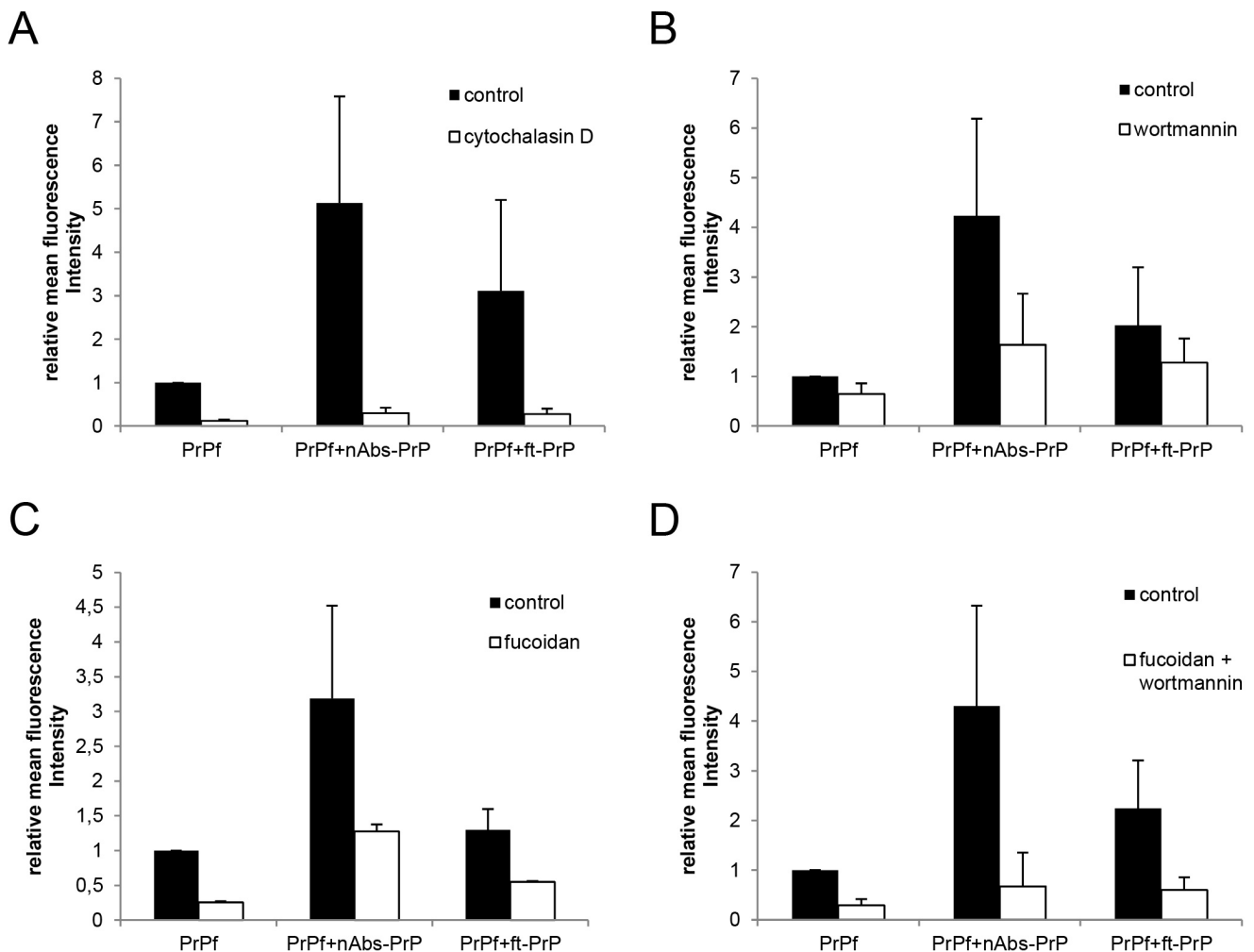
Wortmannin is a potent inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) [25] and inhibits actin-dependent endocytosis, fluid-phase pinocytosis and phagocytosis [26]. Pre-treatment with wortmannin moderately reduced phagocytosis to 60% with regard to treatment with either PrP106-126 A117V fibrils or PrP106-126 A117V co-incubated with ft-PrP. It markedly reduced the uptake of PrP106-126 A117V co-incubated with nAbs-PrP (down to 38%) (Fig. 4B).

Fucoidan is an effective inhibitor of scavenger receptors A and B, which have been previously shown to mediate the uptake of A $\beta$  in its fibrillar state [27,28]. There was a marked inhibitory effect of fucoidan on the uptake of PrP106-126 A117V fibrils (25% of control), whereas uptake of PrP106-126 A117V co-incubated with

nAbs-PrP was only reduced to 40% of the control level (Fig. 4C). Co-incubation with fucoidan and wortmannin did not further reduce uptake of PrP106-126 A117V fibrils alone (30%) but greatly reduced uptake of PrP106-126 A117V co-incubated with nAbs-PrP or ft-PrP (16% or 27%, respectively) (Fig. 4D).

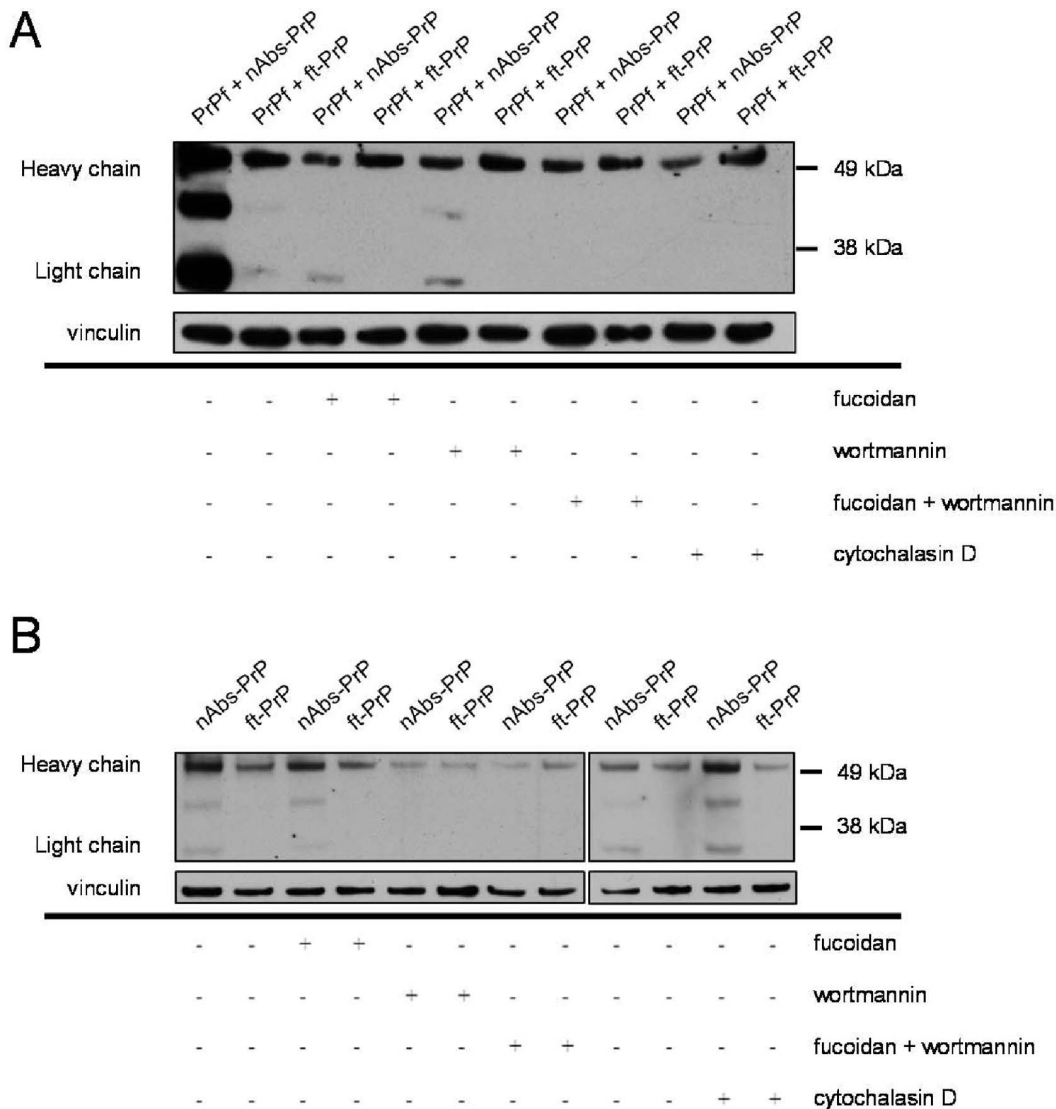
#### Wortmannin Inhibits the Uptake of nAbs-PrP and ft-PrP

In addition to investigating the effects of specific inhibitors on the uptake of PrP106-126 A117V, we further examined the uptake of nAbs-PrP and ft-PrP. The results presented above revealed that the impact of the different phagocytosis blockers on the uptake of PrP106-126 A117V varied depending on whether it was co-incubated with nAbs-PrP or with ft-PrP (i.e., wortmannin blocked the uptake of PrP106-126 A117V co-incubated with nAbs-PrP to a greater extent than PrP106-126 A117V co-incubated with ft-PrP). This experiment showed a general inhibitory effect of all three blockers on the uptake of nAbs-PrP but not on the uptake of ft-PrP when either one was co-administered with PrP106-126 A117V (Fig. 5A). When nAbs-PrP or ft-PrP was administered without PrP106-126 A117V, fucoidan and cytochalasin D had no inhibitory effect on the uptake of the antibodies, whereas



**Figure 4. Inhibition of PrP106-126 A117V uptake by specific blockers.** Phagocytosis assay was performed following pre-treatment of microglial cells with (A) cytochalasin D (10  $\mu\text{M}$ , 30 minutes), (B) fucoidan (500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 30 minutes), (C) wortmannin (10  $\mu\text{M}$ , 60 minutes) and (D) co-incubation with fucoidan and wortmannin. All experiments were performed at least three times independently, and values are normalized to PrP106-126 A117V fibril uptake.

doi:10.1371/journal.pone.0067743.g004



**Figure 5. Inhibition of uptake of nAbs-PrP and ft-PrP by specific blockers.** Western blot analysis of antibody uptake in microglial cells was performed following pre-treatment with cytochalasin D, fucoidan or wortmannin or the co-administration of fucoidan and wortmannin. Cells were co-incubated with PrP106-126 A117V and nAbs-PrP or ft-PrP (A) or with nAbs-PrP or ft-PrP alone (B). One representative experiment out of three is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0067743.g005

wortmannin greatly reduced the uptake of nAbs-PrP or ft-PrP (Fig. 5B).

## Discussion

In prion disease, a profound activation of microglial cells in regions with vacuolation, plaque formation and neuronal damage exists [29]. The exact role of microglia, however, is still not fully elucidated. In cell culture conditions, microglial cells aggregate around fibrillar PrP106-126 [30]. Continuous PrP106-126 exposure at high concentrations (e.g., 80  $\mu$ M) induces cytokine production and the release of NO by microglia *in vitro* [9,12]. Furthermore, PrP106-126 neurotoxicity in cell culture is induced by and dependent on the presence of microglial cells [8]. These results indicate that microglial cells have the potential to induce neuronal cell death via an inflammatory response. However, microglial cells have been considered to play a key role in prion clearance [31]. Falsing et al. (2008) observed a 15-fold increase in

prion titers on organotypic cerebellar slices following ablation of microglia [32]. Kranich et al. (2010) considered the secreted ligand milk fat globule epidermal growth factor 8 (Mfge8) to be part of this potential clearance function of microglial cells [33]. McHattie et al. (1999) observed an internalization of PrP106-126 by microglia, neurons and astrocytes [13]. They further showed that this uptake is independent of PrP<sup>C</sup> expression, indicating that microglial cells phagocytose prion peptides per se and that this uptake is at least not mediated through the PrP<sup>C</sup> protein.

Our results support the assumption that microglial cells are involved in prion clearance by phagocytosis of the prion protein. We demonstrated that microglial cells phagocytosed the prion peptide PrP106-126 A117V in its fibrillated form in a time-dependent manner. We assume this uptake to be beneficial, as we could not detect any release of either cytokines or NO in cultures exposed to 10  $\mu$ M PrP106-126 A117V. These findings contrast with other studies demonstrating microglial activation following

80  $\mu$ M PrP exposure, which indicates that higher concentrations of PrP106-126 A117V might be necessary to activate an inflammatory response in microglia [34,35].

Prion peptides have a toxic effect on primary neuronal cells. This toxic effect is prevented by the co-incubation of prion peptides with naturally occurring autoantibodies against the prion protein (nAbs-PrP) [3]. These results indicate a beneficial effect of nAbs-PrP in terms of prion toxicity and raise hope for a possible therapeutic strategy. Given the beneficial effect of IVIg in clinical trials of Alzheimer's disease patients [36], naturally occurring antibodies have been considered a useful therapeutic agent for neurodegenerative diseases [6,37]. In this paper, we demonstrated that nAbs-PrP enhanced the uptake of prion peptides in primary microglial cells. This effect was specific for nAbs-PrP, as we did not see the same effect with ft-PrP. The increased uptake of prion peptides did not result in an inflammatory response of microglial cells. However, the uptake of PrP106-126 A117V seemed to result in a drop in mitochondrial activity as assessed by MTT assay. nAbs-PrP and ft-PrP applied alone did not elicit the same effect. However, the use of MTT assay in combination with amyloidogenic peptides has limitations because amyloidogenic peptides bear the ability to enhance the exocytosis of the reduced tetrazolium dye in cells [22]. We therefore applied a second method to further examine the viability of microglial cells following prion and antibody exposure. Interestingly, by staining microglial cells with fluorescein diacetate/propidium iodide, we detected an increase in cell count after exposing cells to PrP106-126 A117V with or without antibodies. This result implies cell proliferation rather than cell death. These findings are in line with previous studies demonstrating an induced microglial proliferation following PrP106-126 exposure [38].

We could not detect any effect on the viability of neuronal cells following exposure to supernatants from microglia exposed to PrP106-126 A117V and nAbs-PrP. Furthermore, the application of nAbs-PrP and ft-PrP alone did not induce any inflammatory response or toxic effects on microglia or neurons. This finding reveals an important feature when considering IVIg and/or nAbs-PrP as possible treatment options. Because our data represent an *in vitro* model only, it further needs to be verified whether nAbs-PrP also influence microglia *in vivo*. There is evidence from immunotherapy studies that peripherally applied antibodies are able to pass the intact blood-brain barrier [39,40,41]. We have shown that  $^{111}\text{In}$ -labelled naturally occurring autoantibodies against A $\beta$  cross the blood-brain barrier in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease [42]. From these data, it can be concluded that a certain amount of peripherally administered nAbs-A $\beta$  are able to cross the blood-brain barrier. Therefore, we hypothesize that nAbs-PrP can as well because these are quite similar to nAbs-A $\beta$ . In our experiments, we used microglia of mouse origin. Experiments by Fabrizi et al. (2001) revealed a similar behavior of human microglial cells following PrP exposure compared to the murine microglial cells used by Brown et al. (1996) [34,38]. We therefore hypothesize that the comparability of cells from different species also applies for the application of nAbs-PrP. However, further experiments are necessary to address the differences between microglial cells from different origin.

The effects of nAbs-A $\beta$  on the phagocytosis of A $\beta$  and the viability of microglial cells have been analyzed in a recent communication by our group [43]. In contrast to our experiments with nAbs-PrP, Gold et al. (2013) found a profound inflammatory response following the *in vitro* treatment of microglia with co-administration of oligomerized A $\beta$  and nAbs-A $\beta$ . With respect to the inflammatory reactions observed in response to challenge with different types of oligomers, microglial cells may react in a variety

of ways [44]. The impact of nAbs-PrP or nAbs-A $\beta$  on those processes and the underlying signaling pathways are not yet fully understood. However, in treatment with nAbs-PrP or nAbs-A $\beta$  alone, we did not observe any change in cytokine production, whereas Gold et al. (2013) detected a slight increase in cytokine concentrations. This discrepancy might have been caused by the different types of antibodies used (i.e., nAbs-PrP or nAbs-A $\beta$ ). Because IVIg itself induces an inflammatory response in microglial cells [45], it seems reasonable that the different antibody preparations isolated from IVIg might induce a variety of responses in microglia. Moreover, the *in vivo* experiments by Gold et al. (2013) did not demonstrate any inflammatory reaction following the administration of nAbs-A $\beta$  in Tg2576 mice. These results indicate the need for additional *in vivo* studies to further evaluate the action of nAbs-PrP on inflammatory reactions *in vivo*.

Our results suggest that nAbs-PrP contribute to the clearance function of microglial cells without leading to an inflammatory response, thus triggering neuronal loss. In our study, we applied 10  $\mu$ M PrP106-126 A117V, compared to 80  $\mu$ M PrP in other studies. Our findings indicate that microglia might only be deleteriously activated by excessive prion accumulation, but low concentrations might not lead to an activation that causes cell damage. It may be concluded that nAbs-PrP are important for prion clearance and have no detrimental side effects. However, our results were obtained using PrP106-126 A117V peptides only. It still needs to be verified if the same results can be achieved by using full-length PrP. Preliminary experiments revealed highly specific binding of nAbs-PrP to human recombinant PrP23-231 (data not shown). Wei et al. (2012) further demonstrated nAbs-PrP to successfully immunoprecipitate PrP (A117V) from PrP (A117V) transgenic mice [3]. These results provide evidence for a similar mode of interaction of nAbs-PrP with other PrP peptides. Another limitation, however, is that our studies were performed with single cell culture systems only. Further studies with co-culture systems are needed to characterize these effects in an interactive environment.

To date, not much is known about the underlying mechanisms of prion uptake in microglia. Filamentous actin is required for phagocytosis in general. Cytochalasin D is an inhibitor of actin depolymerization and inhibits scavenger-, complement- and Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis [46,47]. We demonstrate here that the uptake of prion peptide was almost completely prevented when incubating the cells with cytochalasin D, indicating one of these mechanisms underlies prion peptide uptake. The scavenger receptors are essential for the uptake of A $\beta$  in its fibrillated state [27,28]. Therefore, we further investigated the role of scavenger receptors and found that they were also involved in the uptake of PrP106-126 A117V fibrils. However, uptake of co-preparations of PrP106-126 A117V and nAbs-PrP or ft-PrP did not seem to be mediated through this pathway, as those were not affected as much by fucoidan as PrP106-126 A117V alone was. In co-preparations of PrP106-126 A117V with nAbs-PrP, wortmannin effectively inhibited its microglial uptake. Wortmannin is a specific PI-3K inhibitor that prevents pseudopod extension of the cells during phagocytic processes. Especially for Fc receptor-mediated phagocytosis, pseudopod extension (and PI-3K activity) is important for the engulfment of particles [48]. In the present study we used microglial cells of murine origin and human IgG. Human Fc $\gamma$  receptor and murine Fc $\gamma$  receptor share 65–75% identity in their extracellular domains, and human Fc $\gamma$  receptor can bind murine IgG [49]. So far, it is not known whether the murine Fc $\gamma$  receptor can bind to human IgG. Recently, Smith et al. (2012) introduced a mouse model in which murine Fc $\gamma$  receptors have been replaced by human Fc $\gamma$  receptors [50]. It might be worth



testing nAbs-PrP on microglia from this mouse to exclude the possible impact of species differences on the interaction of immunoglobulin and Fc receptor. However, PI-3K activity is also involved in complement receptor-mediated phagocytosis, even if this process occurs rather passively with the appearance of only small pseudopodia [51]. Comparison of the phagocytic characteristics after fucoidan treatment alone, in contrast to fucoidan/wortmannin co-treatment, revealed that additional wortmannin mainly affected the uptake of PrP106-126 A117V co-administered with nAbs-PrP. This finding was supported by further experiments that investigated the effects of cytochalasin D, fucoidan and wortmannin on the uptake of nAbs-PrP and ft-PrP. We found that only wortmannin pre-treatment of microglial cells resulted in a markedly reduced uptake of nAbs-PrP and ft-PrP. These findings indicate that the uptake of nAbs-PrP or ft-PrP alone is mainly achieved through PI-3K-mediated phagocytosis. Because our data show that the uptake of PrP106-126 A117V fibrils is at least partly scavenger receptor-mediated but phagocytosis of nAbs-PrP and ft-PrP occurs mainly through PI-3K mediated pathways, we conclude that there are at least two different mechanisms involved in the uptake of PrP106-126 A117V and nAbs-PrP. However, the mechanism that is mainly responsible for prion uptake and whether nAbs-PrP merely support the uptake or give rise to a completely new mechanism of prion uptake needs to be further elucidated.

In summary, microglial cells are activated during prion disease and thus contribute to neurodegeneration. In contrast, these cells function in the clearance of prion proteins, and insufficient prion clearance is a possible cause of severe prion accumulation [52]. In

infected mice, prion accumulation occurs in large plaques. In our experiments, comparably lower concentrations were applied. One possibility is that microglial clearance of prion proteins is only functional under low concentrations and/or lower aggregates of prion protein. The presence of larger aggregates therefore disrupts this ability. From our experiments, it seems reasonable to administer nAbs-PrP to help microglial cells to clear the extracellular space at the very beginning of prion accumulation. Our data also show that this clearance mechanism takes place without any inflammatory response and by avoiding neuronal cell death. Given the beneficial effects and few adverse side effects of IVIg administration in clinical studies, nAbs-PrP might be a target for therapeutic aspects of prion diseases. However, we must emphasize that our data are from an *in vitro* model. Therefore, further work using animal models is required to determine whether these results also apply to the *in vivo* situation.

## Acknowledgments

We would like to thank Dr. Yansheng Du for continuous support in the field of prion research. We would also like to thank Christine Forbach for the preparation of nAbs-PrP. The article was edited for English language by American Journal Experts ([www.journalexpert.com](http://www.journalexpert.com)).

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: YR JPB. Performed the experiments: YR. Analyzed the data: YR JPB IZ RD. Wrote the paper: YR.

## References

- Pastore A, Zagari A (2007) A structural overview of the vertebrate prion proteins. *Prion* 1: 185–197.
- Prusiner SB (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science* 252: 1515–1522.
- Wei X, Roettger Y, Tan B, He Y, Dodel R, et al. (2012) Human Anti-prion Antibodies Block Prion Peptide Fibril Formation and Neurotoxicity. *J Biol Chem* 287: 12858–12866.
- Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL (2006) Autoantibodies. : Elsevier Science & Technology. 872 p.
- Du Y, Wei X, Dodel R, Sommer N, Hampel H, et al. (2003) Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain* 126: 1935–1939.
- Neff F, Wei X, Noller C, Bacher M, Du Y, et al. (2008) Immunotherapy and naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative disorders. *Autoimmun Rev* 7: 501–507.
- Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, et al. (2007) Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101: 749–756.
- Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA (1996) Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380: 345–347.
- Brown DR (2000) Altered toxicity of the prion protein peptide PrP106–126 carrying the Ala(117)→Val mutation. *Biochem J* 346 Pt 3: 785–791.
- Bate C, Boshuizen R, Williams A (2005) Microglial cells kill prion-damaged neurons in vitro by a CD14-dependent process. *J Neuroimmunol* 170: 62–70.
- Walter L, Neumann H (2009) Role of microglia in neuronal degeneration and regeneration. *Semin Immunopathol* 31: 513–525.
- Giese A, Brown DR, Groschup MH, Feldmann C, Haist I, et al. (1998) Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol* 8: 449–457.
- McHattie SJ, Brown DR, Bird MM (1999) Cellular uptake of the prion protein fragment PrP106–126 in vitro. *J Neurocytol* 28: 149–159.
- Forloni G, Angeretti N, Chiesa R, Monzani E, Salmona M, et al. (1993) Neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 362: 543–546.
- Salmona M, Malesani P, De Gioia L, Gorla S, Bruschi M, et al. (1999) Molecular determinants of the physicochemical properties of a critical prion protein region comprising residues 106–126. *Biochem J* 342 (Pt 1): 207–214.
- Levy Y, Hanan E, Solomon B, Becker OM (2001) Helix-coil transition of PrP106–126: molecular dynamic study. *Proteins* 45: 382–396.
- Kim WG, Mohny RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, et al. (2000) Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. *J Neurosci* 20: 6309–6316.
- Esen N, Kielian T (2007) Effects of low dose GM-CSF on microglial inflammatory profiles to diverse pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). *J Neuroinflammation* 4: 10.
- Re F, Belyanskaya SL, Riese RJ, Cipriani B, Fischer FR, et al. (2002) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J Immunol* 169: 2264–2273.
- Saura J, Tusell JM, Serratosa J (2003) High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44: 183–189.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem* 177: 244–249.
- Liu Y, Schubert D (1997) Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *J Neurochem* 69: 2285–2293.
- Drevets DA, Campbell PA (1991) Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria. *J Immunol Methods* 142: 31–38.
- Axline SG, Reaven EP (1974) Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *J Cell Biol* 62: 647–659.
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* 54: 2419–2423.
- Araki N, Johnson MT, Swanson JA (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* 135: 1249–1260.
- Husemann J, Loike JD, Anankov R, Febbraio M, Silverstein SC (2002) Scavenger receptors in neurobiology and neuropathology: their role on microglia and other cells of the nervous system. *Glia* 40: 195–205.
- Koenigsnecht J, Landreth G (2004) Microglial phagocytosis of fibrillar beta-amyloid through a beta1 integrin-dependent mechanism. *J Neurosci* 24: 9838–9846.
- Rezaie P, Lantos PL (2001) Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* 35: 55–72.
- Ciesielski-Treska J, Grant NJ, Ulrich G, Corrotte M, Bailly Y, et al. (2004) Fibrillar prion peptide (106–126) and scrapie prion protein hamper phagocytosis in microglia. *Glia* 46: 101–115.
- Aguzzi A, Zhu C (2012) Five questions on prion diseases. *PLoS Pathog* 8: e1002651.
- Falsig J, Julius C, Margalith I, Schwarz P, Heppner FL, et al. (2008) A versatile prion replication assay in organotypic brain slices. *Nat Neurosci* 11: 109–117.
- Kranich J, Krautler NJ, Falsig J, Ballmer B, Li S, et al. (2008) Engulfment of cerebral apoptotic bodies controls the course of prion disease in a mouse strain-dependent manner. *J Exp Med* 207: 2271–2281.

34. Fabrizi C, Silei V, Menegazzi M, Salmona M, Bugiani O, et al. (2001) The stimulation of inducible nitric-oxide synthase by the prion protein fragment 106–126 in human microglia is tumor necrosis factor-alpha-dependent and involves p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 276: 25692–25696.
35. Peyrin JM, Lasmezas CI, Haik S, Tagliavini F, Salmona M, et al. (1999) Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport* 10: 723–729.
36. Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, et al. (2009) 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30: 1728–1736.
37. Roettger Y, Du Y, Bacher M, Zerr I, Dodel R, et al. (2012) Immunotherapy in prion disease. *Nat Rev Neurol*.
38. Brown DR, Schmidt B, Kretschmar HA (1996) A neurotoxic prion protein fragment enhances proliferation of microglia but not astrocytes in culture. *Glia* 18: 59–67.
39. Kellner A, Matschke J, Bernreuther C, Moch H, Ferrer I, et al. (2009) Autoantibodies against beta-amyloid are common in Alzheimer's disease and help control plaque burden. *Ann Neurol* 65: 24–31.
40. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, et al. (2001) Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8850–8855.
41. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, et al. (2000) Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* 6: 916–919.
42. Bacher M, Depboylu C, Du Y, Noelker C, Oertel WH, et al. (2009) Peripheral and central biodistribution of (111)In-labeled anti-beta-amyloid autoantibodies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 449: 240–245.
43. Gold M, Mengel D, Roskam S, Dodel R, Bach JP (2013) Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against beta-amyloid on microglia. *J Neuroinflammation* 10: 5.
44. Garcao P, Oliveira CR, Agostinho P (2006) Comparative study of microglia activation induced by amyloid-beta and prion peptides: role in neurodegeneration. *J Neurosci Res* 84: 182–193.
45. Pul R, Nguyen D, Schmitz U, Marx P, Stangel M (2002) Comparison of intravenous immunoglobulin preparations on microglial function in vitro: more potent immunomodulatory capacity of an IgM/IgA-enriched preparation. *Clin Neuropharmacol* 25: 254–259.
46. Sulahian TH, Imrich A, Deloid G, Winkler AR, Kobzik L (2008) Signaling pathways required for macrophage scavenger receptor-mediated phagocytosis: analysis by scanning cytometry. *Respir Res* 9: 59.
47. Newman SL, Mikus LK, Tucci MA (1991) Differential requirements for cellular cytoskeleton in human macrophage complement receptor- and Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Immunol* 146: 967–974.
48. Garcia-Garcia E, Rosales C (2002) Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72: 1092–1108.
49. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE (1998) The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* 76: 231–248.
50. Smith P, DiLillo DJ, Bourmazos S, Li F, Ravetch JV (2012) Mouse model recapitulating human Fc gamma receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 6181–6186.
51. Allen LA, Aderem A (1996) Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages. *J Exp Med* 184: 627–637.
52. Hughes MM, Field RH, Perry VH, Murray CL, Cunningham C (2010) Microglia in the degenerating brain are capable of phagocytosis of beads and of apoptotic cells, but do not efficiently remove PrP<sup>Sc</sup>, even upon LPS stimulation. *Glia* 58: 2017–2030.