

Aus der Klinik für Neurologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Lars Timmermann
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Natürlich vorkommende Autoantikörper –
Charakterisierung, Klonierung und Testung rekombinanter
Antikörper am Beispiel von Amyloid- β -reaktiven Autoantikörpern

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Medizin (20)
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Alexandra Albus
aus Olpe

Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

28.09.2021

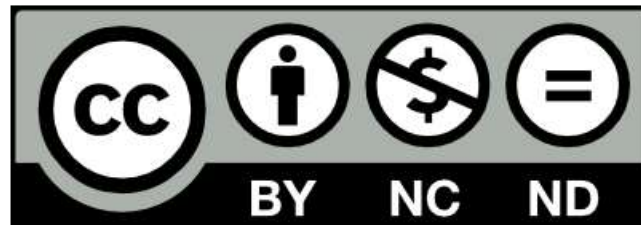
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

Dekanin: Prof. Dr. rer. nat. Denise-Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. med. Richard Dodel

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Burkhard Schütz

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Keine Bearbeitung
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

“Everything will be okay in the end. If it's not okay, it's not the end.”

- John Lennon

Anmerkung:

In dieser Promotion wurde von der Möglichkeit der kumulativen Promotion (nach der „Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 15.7.2009 (§9)) Gebrauch gemacht. Demnach sind eingereichte oder veröffentlichte Publikationen als Dissertationsleistung anzuerkennen. Die vorliegende Arbeit besteht aus einer gemeinsamen Einleitung, der Zusammenfassung der Ergebnisse sowie einer gemeinsamen Diskussion. Am Ende sind die publizierten Originalarbeiten angefügt.

Originalarbeiten:

1. **Albus A**, Jördens M, Möller M, Dodel R (2019): Encoding the Sequence of Specific Autoantibodies Against beta-Amyloid and alpha-Synuclein in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in immunology* 10, S. 2033. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02033.

2. **Albus A**, Kronimus Y, Neumann S, Vidovic N, Frenzel A, Kuhn P, Seifert M, Ziehm T, van der Wurp H, Dodel R (2021): Effect of a multimerized recombinant autoantibody against Amyloid- β . *Neuroscience*. Im Druck. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.03.006.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
1.1 Die Alzheimer-Erkrankung.....	1
1.1.1 Pathologie	1
1.1.2 Ursachen der Alzheimer-Erkrankung	3
1.2 Behandlungsstrategien gegen die Neurodegeneration der AD	4
1.2.1 Immunisierungsansätze gegen die Alzheimer-Pathologie	5
1.3 Natürlich vorkommende Autoantikörper	6
1.3.1 A β -reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper	7
2. Ergebnisse	9
2.1 Anteil der A β -reaktiven B1-Lymphozyten aus Vollblut	10
2.2 Klonierung der rekombinanten Antikörper.....	10
2.3 Bindungsverhalten verschiedener Klone	11
2.4 Funktionalität des B07 scFv-Fc Antikörpers	12
2.5 Untersuchung der mikroglialen Aktivierung im <i>ex vivo</i> Mausmodell	15
2.6 Veränderung des Fc N-Glykosylierungsmusters	15
3. Diskussion.....	17
3.1 Isolation von B1-Lymphozyten.....	17
3.2 Unterschiede der Antikörperklone auf A β	18
3.3 Bedeutung der Fc N-Glykosylierung.....	21
3.4 Limitationen der Studien.....	22
3.5 Ausblick	23
4. Referenzen	24
5. Zusammenfassung.....	33
7. Anhang	37
Verzeichnis aller Hochschullehrer/innen	37
Danksagung	38
Publikationen	39

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AD	engl. <i>Alzheimer's Disease</i> (Alzheimer-Erkrankung)
ADCC	engl. <i>Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity</i> (Antikörper-vermittelte Zelltoxizität)
ADCP	engl. <i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i> (Antikörper-vermittelte mikrogliale Aufnahme)
AICD	engl. <i>APP intracellular domain</i> (intrazelluläre Domäne des APP)
APOE ε4	Apolipoprotein E (Allelvariante) epsilon 4
ARIA	engl. <i>Amyloid-related imaging abnormalities</i> (Amyloid-bedingte Anomalien in der Bildgebung)
AS	Aminosäuresequenz
Aβ	Beta-Amyloid
Aβ_x	Beta-Amyloid mit einer Länge von x Aminosäuren
APP	engl. <i>Amyloid Precursor Protein</i> (Amyloid Vorläuferprotein)
BV-2	Immortalisierte murine mikrogliale Zelllinie
bzw.	beziehungsweise
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i>
CDR	complementarity determining region
CSF	engl. <i>cerebrospinal fluid</i> (Zerebrospinalflüssigkeit)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Da	Dalton
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (Markenprodukt standardisiertes Nährmedium)
Engl.	englisch
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
et al.	lat. <i>et alii</i> (und andere)
Fab	engl. <i>Fragment antigen binding</i>
FACS	engl. <i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
Fc	engl. <i>Fragment crystallisable</i>
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	engl. <i>Fragment variable</i> (Variable Domäne/Region)

GWAS	engl. <i>genome-wide association study</i> (genomweite Assoziationsstudie)
HT-22	Immortalisierte murine neuronale Zelllinie
Iba-1	engl. <i>Ionized calcium binding adaptor molecule 1</i> (ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1)
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgH	Schwere Kette des Immunglobulins
Igk	Kappa-Version der leichten Kette des Immunglobulins
Igλ	Lambda-Version der leichten Kette des Immunglobulins
IgL	Leichte Kette des Immunglobulins
IL-1β/6	Interleukin-1 beta/Interleukin-6
IVIg	Intravenöse Immunglobuline der Klasse G
ka	Assoziationskonstante
kd	Dissoziationskonstante
KD	Gleichgewichtsbindungskonstante
MAHA	engl. <i>Murine-anti human antibody</i> (murine anti-Human Antikörper)
MALDI-TOF	engl. <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight</i> (Matrix-Assistierte Laser-Desorption-Ionisierung mit der Flugzeitanalyse)
MRT	Magnetresonanztomographie
nAbs	engl. <i>Naturally occurring autoantibodies</i> (natürlich vorkommende Autoantikörper)
NeuN	Neuronaler Nukleus
OHSC	engl. <i>Organotypic hippocampal slice cultures</i> (organotypische hippocampale Schnittkulturen)
PBMC	engl. <i>Peripheral blood mononuclear cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PD	engl. <i>Parkinson's Disease</i> (Parkinson-Erkrankung)
pH	lat. <i>Potentia hydrogenii</i>
PI	Propidium Iodid
rpm	engl. <i>Rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
rT	reverse Transkription
RU	engl. <i>Response unit</i> (Signalstärke)
sAPPα/β	engl. <i>soluble APP alpha/beta</i> (lösliche alpha/beta Domäne von APP)
scFv-Fc	engl. <i>single chain variable fragment- fragment crystalline</i>
SPR	engl. <i>Surface plasmon resonance</i> (Oberflächenplasmonenresonanz)

Tab.	Tabelle
ThT	Thioflavin-T
TNF-α	Tumornekrosefaktor-alpha
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
Abb. 1	APP Prozessierung	2
Abb. 2	Untersuchung der Zellviabilität von A β behandelten neuronalen HT-22 Zellen	14

1. Einleitung

1.1 Die Alzheimer-Erkrankung

Die Alzheimer-Erkrankung (engl. *Alzheimer's disease*: AD) ist eine neurodegenerative Erkrankung und wurde erstmalig durch den deutschen Arzt Alois Alzheimer im Jahr 1907 beschrieben (Alzheimer 1907). Mit schätzungsweise 44 Millionen Erkrankten gilt die AD weltweit als die häufigste neurodegenerative Erkrankung. Ihre Inzidenz wird zudem aufgrund des demographischen Wandels weiter steigen (Alzheimer's Association 2019). Hauptsymptome der Erkrankung sind die zunehmende Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen, die jedoch erst Jahre nach den initialen pathologischen Prozessen auftreten (Reiman et al. 2012; Jack et al. 2010).

1.1.1 Pathologie

Bei der AD kommt es mit fortschreitender Erkrankung zur neuronalen Atrophie in spezifischen Bereichen des Gehirns. Anhand der sogenannten Braak-Stadien kann der pathologische Fortschritt der Erkrankung bestimmt werden (Braak et al. 2006). Die Pathologie beginnt im entorhinalen Cortex der Temporallappen und befällt im weiteren Verlauf der AD das limbische System, einschließlich Hippocampus, und zuletzt den Neocortex. Dabei kommt es zum Verlust hippocampaler und kortikaler Neurone. Zusammen mit den daraus resultierenden Kognitionsdefiziten ergibt sich die Leitsymptomatik der AD (Laakso et al. 1995). Auf zellulärer Ebene wird die Neurodegeneration durch die Akkumulation und Ablagerung von dem fehlgefalteten Peptid Amyloid- β (A β) und dem hyperphosphorylierten Protein Tau begünstigt. Als Schwerpunkt dieser Arbeit wird vorrangig die Pathologie des Peptids A β behandelt, welches dem Amyloid Vorläuferprotein (engl. *Amyloid precursor protein* = APP) entstammt. Die physiologische Funktion von APP ist noch weitestgehend ungeklärt. Bisher bekannt ist, dass es nahezu ubiquitär exprimiert wird und unter anderem eine Funktion bei der synaptischen Plastizität einnimmt (Nalivaeva and Turner 2013). APP wird als Transmembranprotein exprimiert und kann durch die α -Sekretase extrazellulär das neurotrophe sAPP α (engl. *soluble APP alpha*: lösliche alpha Domäne von APP) abspalten (Abb. 1A, (O'Brien and Wong 2011; Habib et al. 2017)). Durch den weiteren Einsatz der γ -Sekretase wird auf der extrazellulären Seite zusätzlich das Peptid p3 abgespalten, dessen physiologische oder pathologische Rolle derzeit noch diskutiert wird (Dulin et al. 2008; Nhan et al. 2015; Habib et al. 2017). Auf der intrazellulären Seite wird zudem die intrazelluläre Proteindomäne von APP (engl. *APP intracellular domain*: AICD) abgespalten. Dieser Prozess wird als nicht-amyloido gener Weg beschrieben und gilt als

physiologisch. Setzt anstelle der α -Sekretase jedoch die β -Sekretase an das APP an, so wird extrazellulär das kürzere sAPP β abgespalten (Abb. 1B). Ob sAPP β genauso neurotrophe Funktionen einnimmt wie sAPP α ist aufgrund bisheriger Forschungsergebnisse nicht eindeutig (Chasseigneaux and Allinquant 2012). Durch den weiteren Einsatz der γ -Sekretase wird intrazellulär ebenfalls das Protein AICD abgespalten. Auf der extrazellulären Seite wird anstelle von p3 jedoch ein Peptid mit einer Länge von bis zu 43 Aminosäuren abgespalten, welches Amyloid- β_x (x = Anzahl der Aminosäuren) genannt wird. Dieser Prozess wird als amyloido gener Weg bezeichnet und markiert somit die Entstehung und Abspaltung des pathogenen Peptids, welches als Hauptmerkmal der AD betrachtet wird.

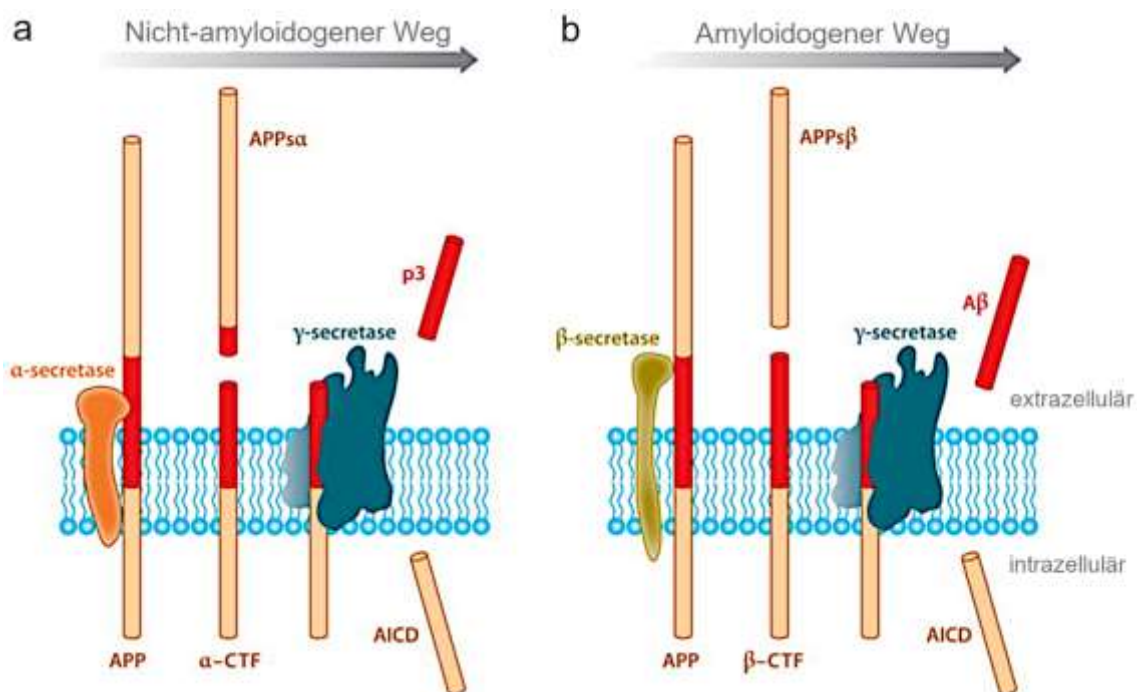


Abb. 1: Prozessierung von A β . (a) Der nicht-amyloido gene Weg beschreibt die physiologische Prozessierung von APP zu p3 und AICD. (b) Der amyloido gene Weg beschreibt die Prozessierung von APP zu AICD und zum pathogenen A β_x . Modifiziert nach (O'Brien and Wong 2011).

A β ist hydrophob und lagert sich infolgedessen mit weiteren A β -Monomeren zusammen. Während dieser Akkumulation von Peptiden entstehen oligomere Strukturen und Protofibrillen, welche als hoch neurotoxisch gelten (Kayed and Lasagna-Reeves 2013). Bei einer weiteren Akkumulation entstehen schließlich Fibrillen, die sich als so genannte A β -Plaques an Neuronen ablagern, aber als weniger toxisch gelten (Walsh and Selkoe 2020; Selkoe and Hardy 2016).

Bei der Aufdeckung der pathologischen Prozesse in der AD wird der Amyloid-Kaskaden Hypothese eine bedeutende Rolle zugesprochen (Hardy and Higgins 1992; Karran and Strooper 2016). Dabei wird angenommen, dass die AD durch einen genetischen oder umweltbedingten Stimulus initiiert wird. Der APP Metabolismus wird daraufhin gestört, wodurch vermehrt A β als Spaltprodukt entsteht und infolgedessen unzureichend abgebaut werden kann. Das vorhandene A β lagert sich vermehrt zu Oligomeren zusammen und nimmt dadurch Einfluss auf die Synapsenfunktion, wodurch umliegende gliale Zellen aktiviert werden und somit erste inflammatorische Reaktionen hervorgerufen werden. Während der fortschreitenden Schädigung der Neuronen treten als Folge zudem oxidative Schädigungen und ein gestörtes Ionen-Gleichgewicht auf. Das Tau Protein, welches ebenfalls eine Rolle bei der AD Pathologie einnimmt, phosphoryliert, löst sich von den Mikrotubuli und bildet neurofibrilläre Bündel (Mandelkow et al. 1996; Naseri et al. 2019). Die neuronale Dysfunktion und schließlich der neuronale Zelltod nehmen infolgedessen weiter zu. Erst zu diesem fortgeschrittenen Zeitpunkt der Pathologie treten meist kognitive Beeinträchtigungen als erste äußerlich bemerkbaren Symptome der AD-Erkrankten auf. Während, pathologisch betrachtet, zu diesem Zeitpunkt ausgedehnte Areale im zentralen Nervensystem (ZNS) bereits wesentliche Schädigungen bis zur neuronalen Degeneration aufweisen (Hardy and Higgins 1992; Musiek and Holtzman 2015).

1.1.2 Ursachen der Alzheimer-Erkrankung

Die AD differenziert sich in einen genetischen bzw. familiären und in einen sporadischen Ursprung (Lippa et al. 1996; DeTure and Dickson 2019). Bei etwa 5% aller Erkrankten ist bereits im Alter von < 65 Jahren eine AD manifestiert. Bei dieser früh auftretenden AD (engl. *Early onset Alzheimer's Disease*: EOAD) führen genetische Mutationen zur Erkrankung. In den Genen, welche die Kernproteine Presenilin-1 und -2 für die APP-spaltende γ -Sekretase kodieren, und im APP-Gen selbst lassen sich die häufigsten krankheitsinitiierenden Mutationen finden (Raux et al. 2005; Rovelet-Lecrux et al. 2006). Bei der spät auftretenden Form der AD (engl. *late onset Alzheimer's Disease*: LOAD) sind hingegen genetische Risikofaktoren im Fokus, welche mithilfe von genomweiten Assoziationsstudien (engl. *genome-wide association studies*: GWASs) identifiziert werden konnten (Tosto and Reitz 2013). Dazu wurden genetische Variationen am Genom von Alzheimer-Erkrankten im Vergleich zu gesunden Kontrollen untersucht. Dabei konnte unter anderem das ϵ 4 Allel im Apolipoprotein E (APOE ϵ 4) identifiziert werden, welches der bisher am genauesten beschriebene genetische Risikofaktor für LOAD ist (Corder et al. 1993; Farrer et al. 1997). Weitere, durch GWASs, identifizierte Risikofaktoren für LOAD werden zurzeit intensiv untersucht, zu denen unter anderem der Einfluss von mikroglialen Zellen zählt. Mikroglia sind die phagozytierenden Immunzellen im ZNS. Sie nehmen unter anderem eine

wichtige Funktion bei der Beseitigung von degradierten Zellen und Abbauprodukten ein (Wake and Fields 2011). Des Weiteren rufen Mikroglia pro- und anti-inflammatorische Prozesse hervor, welche die Pathogenese beschleunigen oder ihr entgegenwirken können. Bei der Untersuchung der mikroglialen Beteiligung an der A β -Pathologie wurden von Mikroglia exprimierte Gene aufgedeckt. Dazu zählen beispielweise TREM2 (engl. *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*) und PLCG2 (engl. *phospholipase Cy2*) (Bajaj et al. 2018).

1.2 Behandlungsstrategien gegen die Neurodegeneration der AD

Die hohe Anzahl an Erkrankten und der schleichende kognitive Verfall, erhöhen die Dringlichkeit einer Therapie und/oder Prophylaxe der AD. Bisher kann die AD nur symptomatisch therapiert werden, eine Heilung oder krankheits-modifizierende Substanzen stehen derzeit nicht zur Verfügung. Bei der therapeutischen Behandlung kommen vor allem die sogenannten Antidementiva, wie Cholinesteraseinhibitoren (Donepezil, Galantamin, Rivastigmin) oder der NMDA-Antagonist Memantin zum Einsatz (Cui et al. 2019; Rountree et al. 2013). Durch den Einsatz der Acetylcholinesterase-Hemmer wird der Abbau von Acetylcholin gehemmt, wodurch der Untergang cholinergischer Neurone kompensiert werden kann und so die neuronale Signalweiterleitung gestärkt wird (Moghul and Wilkinson 2001). NMDA-Rezeptorantagonisten hingegen blockieren Glutamat-Rezeptoren und verhindern so die erhöhte Freisetzung von Glutamat. Diese stimuliert bei fortgeschrittener AD häufig den Kalzium-Einstrom in neuronale Zellen, was zur Neurodegeneration beiträgt (Danysz and Parsons 2012). Beide Wirkstoffklassen können somit nur bedingt den Verlauf der AD abmildern. Zudem werden häufig alternative pflanzliche Mittel, wie Ginkgo biloba Präparate, eingesetzt. Ginkgo biloba soll unter anderem die Durchblutung im Hirn fördern und so die Konzentrationsfähigkeit steigern (Yang et al. 2016). Darüber hinaus werden als nicht-medikamentöse Therapie Verhaltensempfehlungen zur Prävention neurodegenerativer Erkrankungen ausgesprochen. Dazu werden bisher Ergotherapie, Gedächtnistraining, Vermeiden von Rauchen, gesunde Ernährung und Aufrechterhaltung sozialer Kontakte eingesetzt, welche die Kognition und die Hirnleistung generell stärken können (Arvanitakis et al. 2019; Livingston et al. 2017; Livingston et al. 2020). Bei einer Kohorte älterer Personen mit einer milden kognitiven Beeinträchtigung konnte mittels dieser Empfehlungen eine signifikant bessere Aufrechterhaltung der Kognition gegenüber der Kontrollkohorte festgestellt werden (Ngandu et al. 2015).

1.2.1 Immunisierungsansätze gegen die Alzheimer-Pathologie

Bisherige immunologische Studien zur Prävention der AD sowie zur Regeneration konzentrieren sich überwiegend auf eine Immunisierung der Erkrankten, die entweder aktiv oder passiv erfolgen kann. Bei dem Ansatz einer aktiven Immunisierung werden kleine Fragmente des pathogenen Peptids so modifiziert, dass sie die Erkrankung selbst nicht auslösen können. Ziel dieser Methode ist die Bildung von Gedächtnis B-Lymphozyten. Bei späterem Kontakt mit dem pathogenen Peptid reagiert das Immunsystem dadurch schneller mit der Freisetzung von Antikörpern. Dieser Mechanismus wird bereits seit über 100 Jahren erfolgreich bei der Prävention diverser Erkrankungen eingesetzt (Baxter 2007; Strikas et al. 2018). Im Jahr 1999 wurde dazu erstmals eine aktive Immunisierungsstudie zur Prävention der AD beschrieben (Schenk et al. 1999). Dabei wurden genetisch veränderte Mäuse eines AD-Mausmodells (PDAPP Maus mit Überexpression von humanem APP) mittels aggregiertem A β ₄₂ und einem Adjuvans, zur Stimulierung des Immunsystems, behandelt. Sowohl in jungen als auch gealterten Tieren wurden positive Effekte gemessen, zu denen unter anderem die Verhinderung der A β -Ablagerungen und die Verhinderung der Einleitung von inflammatorischen Reaktionen durch Gliazellen zählten. Zudem zeigte sich eine Reduktion der A β Ablagerungen bei gealterten Mäusen (Schenk et al. 1999). Bisherige klinische Studien zu aktiven A β -Immunisierungen sind jedoch fast ausnahmslos fehlgeschlagen. Bei einigen Studienteilnehmern kam es bei der ersten Studie mit einer aktiven Immunisierung gegen A β (AN-1792) zur Ausprägung einer aseptischen Meningoenzephalitis, was zum Studienabbruch führte (Gilman et al. 2005; Orgogozo et al. 2003; Nicoll et al. 2003; Ferrer et al. 2004). Eine weitere Problematik dieses Ansatzes liegt in der sogenannten Immunseneszenz. Das Immunsystem bei Menschen über 40 Jahren, wozu auch AD-Erkrankte zählen, reagiert schwächer auf exogen eingeführte Antigene. Dadurch wird eine aktive Immunisierung mit zunehmenden Lebensalter oft stark in ihrem protektiven Effekt limitiert (Pinti et al. 2016; Weiskopf et al. 2009).

Ein vielversprechenderer Ansatz könnte hingegen die passive Immunisierung sein. Hierbei werden direkt A β -bindende Antikörper verabreicht, welche die A β -Degradierung einleiten. Aufgrund der direkten Applikation von Antikörpern wird die adaptive Immunantwort umgangen (Mak et al. 2014). Im Jahr 2000 wurden Ergebnisse erster passiver Immunisierungsstudien gegen AD publiziert (Bard et al. 2000). Transgene AD-Mäuse (PDAPP Mausmodell) wurden mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern behandelt, wobei ein Teil der Antikörper eine Reduktion der A β -Ablagerungen erzielte. Die Unterschiede der Antikörper lagen dabei in der Bindesequenz an A β , sowie im IgG-Subtyp. Obwohl dieser Ansatz unter anderem durch die

positiv verlaufenden Tierversuche einen großen Erfolg vermuten ließ, wurde der Großteil bisheriger klinischer Studien zur passiven Immunisierung erfolglos abgebrochen (Doody et al. 2014; Salloway et al. 2014; Relkin 2014). Bei einem geringen Teil der Studienteilnehmer zeigten sich in Magnetresonanztomograph (MRT)-Aufnahmen als Nebenwirkungen sogenannte Amyloid-bedingte Veränderungen in der Bildgebung (engl. *Amyloid-related imaging abnormalities: ARIA*), wie Mikroblutungen oder Ödeme. Jedoch war eine zu geringe Effizienz der Gedächtnisstabilisation der Hauptabbruchsgrund dieser Studien (Relkin et al. 2017). Derzeit wird eine Zulassung des Antiköpers Aducanumab (Biogen) von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA erwogen (U.S. Food & Drug Administration 2020).

Aufgrund des „therapeutischen Fensters“ müsste die immunologische Therapie bei der AD greifen, bevor die klinische Symptomatik mit Erinnerungs- und Orientierungsproblematik auftritt (Sarazin et al. 2013). Die pathologischen Prozesse, wie Neurodegeneration und -Inflammation, treten schon Jahre vor der klinischen Symptomatik auf (s. auch Amyloid-Kaskaden Hypothese unter 1.1.1). Spezifische Biomarker, wie bildgebende Verfahren und Nachweisbarkeit von A β und Tau in zerebrospinaler Flüssigkeit (engl. *cerebrospinal fluid: CSF*), belegen die frühen pathologischen Mechanismen der AD Progression und zeigen die Problematik der Interventionsmöglichkeit nach Diagnose (Jack et al. 2010). Eine weitere Problematik von Immunisierungsstrategien ist die Blut-Hirn-Schranke. Da die A β -Aggregate vorrangig im Hirn auftreten, sollten wirksame Antikörper zudem ins Hirn wandern können, was durch die natürliche Barriere zwischen Blutbahn und ZNS erschwert wird (Pardridge 2005). Jedoch gibt es auch die Hypothese, dass ein A β -Gleichgewicht im ZNS und der Peripherie herrscht (sog. *peripheral sink hypothesis*) (DeMattos et al. 2001; Liu et al. 2015). Dabei wird angenommen, dass sich A β nahezu gleich im Liquor und Serum befindet. Durch die Antikörperbindung und den Abbau von Serum A β würde somit A β aus dem ZNS ins Blut transportiert werden, wo es von den Antikörpern verstoffwechselt werden könnte (Liu et al. 2015). Dadurch müsste die Blut-Hirn-Schranke nicht von den A β -bindenden Antikörpern passiert werden.

1.3 Natürlich vorkommende Autoantikörper

Einen möglichen Ansatz zur passiven Immunisierung könnten natürlich vorkommende Autoantikörper (engl. *naturally occurring autoantibodies: nAbs*) darstellen. Sie sind unter anderem in der Lage fehlgefaltete oder -gebildete Autoantigene zu detektieren und über ihren Fc-Teil an Phagozyten zu vermitteln, wodurch sie unter anderem auch die Aufrechterhaltung der Homöostase fördern (Elkon and Casali 2008). nAbs besitzen eine besondere Stellung in der

humoralen Immunität, da sie aller Voraussicht nach von B1-Lymphozyten sekretiert werden. B1-Lymphozyten sind eine Unterklasse der Antikörper-sezernierenden B-Lymphozyten und werden schon sehr früh in der Entwicklung in der fetalen Leber gebildet und stellen somit eine frühe Immunabwehr dar. B1-Lymphozyten sezernieren, T-Zell unabhängig, Antikörper ins Blut (Hayakawa et al. 1985). Da sie der Einwanderung in Keimzentren überwiegend entgehen und somit kaum somatische Hypermutationen aufweisen, sind ihre Gene hoch konserviert. Zudem sind sie selbsterneuernd und werden konstant über die Lebensspanne exprimiert (Shoenfeld et al. 2013). Über die genaue Charakterisierung von humanen B1-Lymphozyten mittels Oberflächenmarkern (engl. *Cluster of differentiation marker*: CD Marker) wird zurzeit noch unter Experten debattiert (Griffin et al. 2011; Descatoire et al. 2011; Perez-Andres et al. 2011).

1.3.1 A β -reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper

Die von B1-Lymphozyten sezernierten nAbs könnten eine wichtige Rolle sowohl bei der Prävention und Heilung der AD als auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen einnehmen. In bisherigen Studien wurden nAbs identifiziert, die das AD spezifische A β binden (nAbs-A β), seine Aggregation verhindern und seine Beseitigung unterstützen (Albus et al. 2018; Gold et al. 2013). Des Weiteren wurde eine protektive Wirkung auf die Gedächtnisleistung sowie auf die Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Marker im Mausmodell nachgewiesen (Mengel et al. 2013). Bei der Untersuchung von AD-Erkrankten wurden veränderte Level an nAbs-A β im Serum und in CSF nachgewiesen (Du et al. 2001; Weksler et al. 2002; Kronimus et al. 2018), welche die These einer funktionellen Bedeutung dieser natürlichen Antikörper unterstützt. Bisher wurden keine Mechanismen aufgedeckt, welche die signifikant veränderten nAbs-Level von AD-Erkrankten erklären. Mögliche Hypothesen hierfür könnten im Untergang der nAbs sekretierenden B1-Lymphozyten liegen oder in einer pathologischen Veränderung der nAbs-A β durch einen bisher unbekanntem Mechanismus (Kronimus et al. submittiert).

Der methodische Ansatz nAbs therapeutisch bei AD und weiteren Erkrankungen einzusetzen ist dabei nicht neu. Intravenöse Immunglobuline der Klasse G (IVIg) sind ein etabliertes Therapeutikum zur Behandlung diverser Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, Rheuma oder Myasthenia Gravis (Beauté et al. 2010; Gelfand 2012). IVIg-Präparate werden durch die Blutspende vieler Menschen gesammelt und aufgereinigt. Dadurch stellen sie den durchschnittlichen Antikörperpool eines gesunden Menschen dar. IVIg wurde bereits im Rahmen einer klinischen Phase-2 und einer Phase-3 Studie als mögliche passive Immunisierung bei AD-Erkrankten untersucht (Relkin et al. 2017; Dodel et al. 2013). Die Phase-3 Studie wurde jedoch aufgrund des geringen Effekts auf die Kognition abgebrochen. Dennoch ist der Ansatz nicht komplett zu verwerfen. nAbs-A β sind zwar ein Bestandteil von IVIg, sie machen jedoch nur

einen geringen Anteil aus. Das Scheitern der Studie könnte somit durch den zu geringen Anteil an krankheitsrelevanten Antikörpern zustande gekommen sein. Somit könnte zur Immunisierung entweder IVIg viel höher eingesetzt werden oder zuvor müssten die spezifischen nAbs-A β aufgereinigt und konzentriert verabreicht werden. Aufgrund des breiten Anwendungsgebiets von IVIg und der gleichzeitigen Abhängigkeit von Blutspenden wird die Verfügbarkeit dieses Therapeutikums jedoch stark limitiert. Schätzungen zufolge läge die voraussichtlich benötigte Menge pro Behandlung durchschnittlich bei 0,4 g IVIg (10 %) pro kg Körpergewicht (Relkin et al. 2009). Da IgG-Antikörper eine Halbwertszeit von durchschnittlich 25,8 Tagen besitzen (Mankarious et al. 1988) müsste die Verabreichung zudem in regelmäßigen Abständen wiederholt werden. Bei der steigenden Zahl an AD-Erkrankten und der steten Abhängigkeit der Immunisierung wäre eine uneingeschränkte Verfügbarkeit somit nicht zu gewährleisten.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit lag in einer nAbs-A β -basierten passiven Immunisierung unabhängig von IVIg durch die rekombinante Antikörper-Herstellung mithilfe der genetischen Sequenz A β -reaktiver B1-Lymphozyten.

2. Ergebnisse

Eigene Anteile an den Publikationen:

Albus A, Jördens M, Möller M, Dodel R (2019): Encoding the Sequence of Specific Autoantibodies Against beta-Amyloid and alpha-Synuclein in Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Immunology* 10, S. 2033. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02033. (Albus et al. 2019)

Die Arbeit wurde mit einer geteilten Erstautorenschaft erstellt. Ich habe das Projekt gemeinsam mit Prof. Dodel geplant und alle Experimente mit Frau cand. med. Marit Jördens durchgeführt und ausgewertet. Alle Abbildungen und Tabellen wurden von mir und Frau Jördens erstellt. Das Manuskript haben Frau Jördens und ich gemeinsam mit Prof. Dodel entworfen und geschrieben.

Albus A, Kronimus Y, Neumann S, Vidovic N, Frenzel A, Kuhn P, Seifert M, Ziehm T, van der Wurp H, Dodel R (2021): Effect of a multimerized recombinant autoantibody against Amyloid- β . *Neuroscience*. Im Druck. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2021.03.006. (Albus et al. 2021)

Das Projekt wurde von mir und Prof. Dodel entwickelt. Ich habe alle Experimente bis auf die Glykosylierungs-Analytik (Abb. 8) und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 2) selbständig durchgeführt und analysiert, sowie deren Abbildungen erstellt. Das Manuskript habe ich zusammen mit Prof. Dodel geplant und geschrieben.

2.1 Anteil der A β -reaktiven B1-Lymphozyten aus Vollblut

Ziel der ersten Originalarbeit war es, eine Methode zu entwickeln, welche die Antikörpersequenzen von A β -reaktiven B1-Lymphozyten identifiziert (Albus et al. 2019). Dazu wurde Vollblut gesunder Spender im Alter zwischen 20 und 30 Jahren entnommen, woraus zunächst mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (engl. *peripheral blood mononuclear cell*: PBMC) isoliert wurden. Aus diesem Zellgemisch wurden im Anschluss, mittels definiert bindender Magnetbeads, B-Lymphozyten aufgereinigt. Weiter wurden diese mit FITC-konjugiertem A β und spezifischen CD Markern inkubiert, welche die relevante B1-Subpopulation der B-Lymphozyten markieren sollte. Mittels Durchflusszytometrie (engl. *Fluorescent associated cell sorting* = FACS) wurden die A β -reaktiven B1-Lymphozyten dann vereinzelt isoliert. Durch die spezifische Eingrenzung der B1-Lymphozyten durch die CD Marker CD20, CD27, CD43 und CD69 wurde festgestellt, dass nur ein sehr geringer Anteil der B-Lymphozyten zur relevanten Subpopulation gehört (1,69 % \pm 0,6 % aller durch die Magnetbeads aufgereinigten B-Lymphozyten, ((Albus et al. 2019), Tab. 1). Zudem wurde die Population durch die Reaktivität gegen A β und IgG eingegrenzt, um nAbs-A β sekretierende B1-Lymphozyten zu erhalten. Die Population dieser A β - und IgG-reaktiven B1-Lymphozyten fiel entsprechend sehr gering aus (0,37 % \pm 0,22 % aller B1-Lymphozyten ((Albus et al. 2019), Tab. 1). Nach Einzelisolation der Zellen in Lysepuffer wurde zunächst, mittels reverser Transkription (RT), die mRNA in cDNA umgeschrieben. Durch den anschließenden Einsatz der Polymerasen Kettenreaktion (PCR) und spezifischer Primersets wurden die variablen Regionen (engl. *Fragment variable* = Fv) der schweren (IgH) und leichten (IgL als Kappa (Ig κ) oder Lambda (Ig λ)) Kette separat amplifiziert. Nachfolgende Sequenzierungen lieferten zwölf vollständige Fv Sequenzen von A β -reaktiven B1-Lymphozyten. Bei der genaueren Betrachtung der verwendeten Genfamilien wurde ersichtlich, dass 84,6 % der sequenzierten IgH der Genfamilie IGVH3 und die restlichen 15,4 % der Genfamilie IGVH4 abstammen. Die Verteilung der verwendeten Genfamilien für die leichten Ketten war jedoch mit 30,8 % für IGKV1 sowie für IGKV3, 15,4 % für IGKV2 und jeweils 7,7 % für IGKV4, IGLV3 und IGLV8 viel diffuser verteilt ((Albus et al. 2019), Abb. 4).

2.2 Klonierung der rekombinanten Antikörper

Für die weitere Untersuchung der Antikörper wurden in Kooperation mit dem Unternehmen Yumab GmbH, einer universitären Ausgründung der Universität Braunschweig (Braunschweig, Deutschland), drei Fv Sequenzen in humane IgG₁-Konstrukte kloniert und in HEK-Zellen (engl. *Human embryonic kidney cells*: humane embryonale Nierenzellen) exprimiert. Eine dieser Fv

Sequenzen wurde zusätzlich in einem veränderten Konstrukt hergestellt. Bei dem scFv-Fc Konstrukt ist der humane IgG₁-stämmige Fc -Teil (engl. *Fragment crystallisable*) c-Terminal mit dem als Einzelkette vorliegenden Fv (engl. *single chain Fv*: scFv), verbunden. Aufgrund des Fc Fragments dimerisieren zwei dieser Einzelketten, wodurch ein bivalentes Homodimer, ähnlich eines IgG Antikörpers, entsteht (Cuesta et al. 2010). Dabei wies der scFv-Fc Antikörper einen erhöhten Multimerisierungsgrad auf, welcher in der zweiten Originalarbeit, mithilfe der Größenausschluss-Chromatographie (engl. *size-exclusion chromatography*: SEC), dargestellt werden konnte ((Albus et al. 2021), Abb. 1C). Die Länge des eingesetzten Linkers, welcher die IgH mit der IgL verbindet, kann dabei maßgeblich den Multimerisierungsgrad beeinflussen.

Die verschiedenen Antikörper wurden von den mit den Fv Sequenzen transfizierten HEK-Zellen als Sekretionsprodukt in den Zellkulturüberstand abgegeben und mittels Protein A aufgereinigt. Erste Analyseverfahren (SDS-PAGE) wurden eingesetzt, um die korrekte und vollständige Bildung der Antikörper nachzuweisen ((Albus et al. 2021), Abb. 1D). Im Anschluss wurden die Antikörper an unser Labor ausgehändigt.

2.3 Bindungsverhalten verschiedener Klone

Drei verschiedene rekombinante Antikörper (B06, B07 und C06) wurden erfolgreich im IgG Format kloniert, wobei der Antikörper B07 zusätzlich noch in dem veränderten scFv-Fc Format erstellt wurde. Die Untersuchung des Bindungsverhaltens und somit die Verifizierung der A β -Reaktivität war einer der Schwerpunkte der zweiten Originalarbeit (Albus et al. 2021). Mittels ELISA-Experimenten wurden die klonierten Antikörper auf ihre Bindungskapazitäten an monomeres und oligomeres A β untersucht ((Albus et al. 2021), Abb. 3A und 4A). Vergleichend zu den rekombinanten Antikörpern wurden in diesen und auch allen weiteren Experimenten IVIg und die daraus aufgereinigten nAbs-A β untersucht. IVIg, als Ausgangsprodukt, galt als Negativreferenz, da es nur einen geringen Anteil an nAbs-A β enthält. nAbs-A β wurden dementsprechend als Positivreferenz eingesetzt. Im ELISA Assay zeigten die rekombinanten Antikörper B06, B07 und C06 im IgG-Format, im Vergleich zu IVIg-aufgereinigten nAbs-A β , eine verminderte Bindungskapazität zu monomerem A β . Dabei wies der Antikörper B07 IgG die höchste Bindungskapazität auf. Die Bindung an oligomeres A β wurde von allen eingesetzten Antikörpern mit einem zwei- bis zehnfach verringerten Faktor erkannt. Zudem wurden mögliche Kreuzreaktionen gegen Prion-Peptid, α -Synuclein und bovinem Serumalbumin untersucht. Eine geringe Bindungskapazität wurde dabei zum Prion-Peptid nachgewiesen. Diese war für die getesteten Antikörper zwei- bis dreifach niedriger als die Bindungskapazität an monomeres A β .

Es wurden keine eindeutig messbaren Kreuzreaktivitäten zu α -Synuclein und bovinem Serumalbumin festgestellt. Die Bindungsaffinitäten der rekombinanten Antikörper wurden mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl. *Surface plasmon resonance spectroscopy*: SPR) untersucht. Dabei zeigten sich stärkere Interaktionen mit oligomerem als mit monomerem immobilisierten A β ((Albus et al. 2021), Abb. 3B-C, Tab. 1). Die gemessenen Interaktions-Maxima (engl. *Response unit*: RU) der rekombinanten Antikörper im IgG Format waren, im Gegensatz zu nAbs-A β , sehr gering und ließen dadurch eine unzureichende Bindungsaffinität schlussfolgern.

Aufgrund dessen wurde das veränderte scFv-Fc Konstrukt am Beispiel vom B07 Antikörper eingesetzt und ebenfalls untersucht. Da der Bindungsnachweis des scFv-Fc Antikörpers im ELISA Assay in der ursprünglich verwendeten Konzentration von 10 μ g/ml übersättigt war, wurde er in einer niedrigeren Konzentration von 1,25 μ g/ml eingesetzt ((Albus et al. 2021), Abb. 4A). Dabei zeigte sich, dass die Bindungskapazität des B07 Antikörpers im scFv-Fc Format, gegenüber dem IgG Format, verstärkt wurde. Die B07 scFv-Fc Bindungskapazität war zudem dreifach stärker als die der Positivreferenz nAbs-A β ((Albus et al. 2021), Abb. 4A). Zudem wurde eine Kreuzreaktivität zum Prion-Peptid nachgewiesen, die jedoch geringer ausgeprägt war als die Bindung an monomeres A β . Eine eindeutige Bindung an α -Synuclein und bovines Serumalbumin konnte hingegen nicht gemessen werden. Durch SPR Experimente zur Affinitätsbestimmung konnte des Weiteren gezeigt werden, dass der Antikörper B07 scFv-Fc ebenfalls eine Affinitätssteigerung im Vergleich zum B07 IgG erzielt hat und eine ähnliche Affinität wie nAbs-A β aufwies ((Albus et al. 2021), Abb. 4B-C, Tab. 2). Zudem wurde eine eindeutige Bindungsaffinität sowohl zum monomeren als auch zum oligomeren A β deutlich.

2.4 Funktionalität des B07 scFv-Fc Antikörpers

Neben der Bindungsfähigkeit der rekombinanten Antikörper an A β wurde auch eine mögliche protektive Funktionalität auf verschiedene pathologische A β -vermittelte Mechanismen dieser untersucht. Dazu wurden die rekombinanten Antikörper auf drei essenzielle Funktionen geprüft: Inhibition der A β Oligomerisierung, Steigerung der mikroglialen Aufnahme von A β und Protektion der Viabilität von mit A β behandelten Neuronen. Die Inhibition der Oligomerisierung wurde mittels Thioflavin-T (ThT) untersucht. ThT bindet an die für die A β -Aggregation charakteristischen β -Faltblattstrukturen, sodass eine erhöhte ThT-Fluoreszenzintensität eine Zunahme von Oligomeren kennzeichnet (Albus 2021, Abb. 3A). Zunächst wurden die Experimente mit dem multimerisierten B07 scFv-Fc Antikörper durchgeführt, da er in den

Bindungsassays das größte Potential aufzeigte. Im ThT Assay wies der B07 scFv-Fc Antikörper eine starke Inhibition der A β Aggregation auf ((Albus et al. 2021), Abb. 5A, Tab. 3). Nach 48 Stunden Gesamtmessdauer konnte die Aggregation auf 30% verringert werden ((Albus et al. 2021), Abb. 5B). Die Inkubation mit dem B07 scFv-Fc Antikörper zeigte sich damit effektiver als mit nAbs-A β , welche die A β Aggregation auf 60% Fibrillationsgrad minimieren konnten. Anschließende Untersuchungen mit den Antikörpern B06, B07 und C06 im IgG Format konnten zwar ebenfalls eine Inhibition der Fibrillation erreichen, jedoch im verringerten Ausmaß, vergleichbar mit der Referenz IVIg ((Albus et al. 2021), Abb. 6A-B, Tab. 3).

Die Untersuchung zur Steigerung der mikroglialen Aufnahme von A β wurde an der murinen mikroglialen Zelllinie BV-2 durchgeführt ((Albus et al. 2021), Abb. 5C-D und 6C-D). Dabei wurde der Einfluss der Antikörper sowohl auf monomeres als auch auf oligomeres A β geprüft. Der B07 scFv-Fc Antikörper konnte die mikrogliale Aufnahme von monomerem A β im Vergleich zur Antikörper-unbehandelten A β -Probe stark steigern. Vergleichend dazu konnte bei der Testung der oligomeren A β Aufnahme zusätzlich zum rekombinanten Antikörper B07 scFv-Fc auch die Positivreferenz nAbs-A β die Aufnahme im Vergleich zur Antikörper-unbehandelten A β -Probe stark steigern ((Albus et al. 2021), Abb. 5C-D, Tab. 4). Untersuchungen mit den rekombinanten Antikörpern im IgG Format zeigten nur eine geringe Steigerung der mikroglialen A β Aufnahme, sowohl für monomeres als auch für oligomeres A β ((Albus et al. 2021), Abb. 6C-D, Tab. 4). Dabei wies der Antikörper C06 IgG die stärkste Aufnahmesteigerung für monomeres A β auf. Eine anschließende statistische Auswertung konnte jedoch keine Signifikanzen nachweisen ((Albus et al. 2021), Tab. 4).

Die Antikörper wurden auf ihren potentiell protektiven Effekt auf die neuronale Zellviabilität durch A β Behandlung untersucht. Dieser Assay wurde nicht als Teil der zweiten Originalarbeit publiziert und wird deswegen ausschließlich an dieser Stelle beschrieben. Murine neuronale HT-22 Zellen wurden zunächst mit einer Dichte von 6000 Zellen/well in eine Poly D-Lysin-beschichtete 96-well Platte ausgesät und für 24 Stunden im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert. Nach 23 Stunden wurden 10 μ M monomeres oder oligomeres A β mit 1 μ M multimerisierten B07 scFv-Fc Antikörper, nAbs-A β oder IVIg in FCS-freiem Kultivierungsmedium (DMEM versetzt mit 2 mM Glutamin and 20 mM HEPES; (Istrin et al. 2006)) für eine Stunde bei 37°C und anschließend für 24 Stunden mit den Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellviabilität wurde im Anschluss mittels CellTiter-Glo (Promega) bestimmt und mit einem Plattenleser ausgewertet (Abb. 2A-B). Monomer eingesetztes A β allein zeigte nur einen sehr geringen toxischen Effekt (95 \pm 3,6% Zellviabilität) auf die Neurone. Dieser konnte weder durch nAbs-A β noch durch IVIg signifikant verringert werden. Unter Co-Inkubation von monomerem

A β und dem rekombinanten Antikörper B07 scFv-Fc wurde eine signifikant erhöhte Zellviabilität detektiert ($p < 0,001$ mittels zweiseitigem t -Test, Abb. 2A). Versuche mit oligomerem A β allein dagegen zeigten einen stärkeren toxischen Effekt auf die neuronalen Zellen, wobei die Zellviabilität gegenüber der Mediumkontrolle erniedrigt war ($90 \pm 3,8\%$ Zellviabilität). Sowohl nAbs-A β als auch IVIg konnten hier eine protektive Wirkung auf die neuronale Zellviabilität aufweisen (Abb. 2B). Die Zellviabilität unter Co-Inkubation mit nAbs-A β ($p < 0,05$ mittels zweiseitigem t -Test) sowie mit IVIg ($p < 0,05$ mittels zweiseitigem t -Test) verbesserte sich signifikant gegenüber der ausschließlich mit Oligomer-inkubierten A β Kondition. Ein deutlicher protektiver Effekt des Antikörpers B07 scFv-Fc konnte auch unter Co-Inkubation mit oligomerem A β festgestellt werden ($p < 0,001$ mittels zweiseitigem t -Test). Zudem wurde ein weiteres Assay ohne A β zur Überprüfung der gesteigerten Zellviabilität durch Zugabe des scFv-Fc Antikörpers durchgeführt (Abb. 2C). Dazu wurde ein anderer scFv-Fc Antikörper des Unternehmens Yumab GmbH in gleicher Konzentration eingesetzt. Zwar zeigte sich hier ebenfalls eine leichte Steigerung der Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle, welche jedoch nicht so stark ausfiel wie der Effekt durch den B07 scFv-Fc Antikörper.

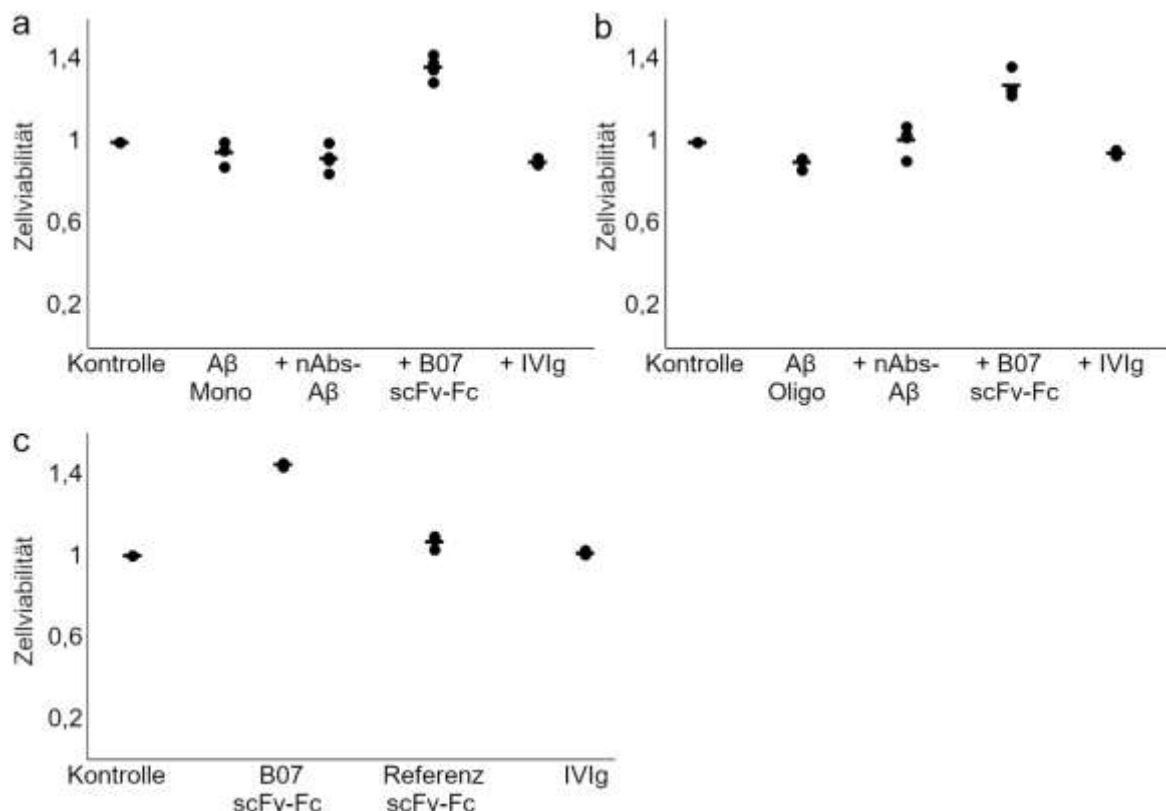


Abb. 2: Untersuchung der Zellviabilität von A β behandelten neuronalen HT-22 Zellen. (a-b) Neuronale HT-22 Zellen wurden mit 10 μ M monomerem A β (a) bzw. oligomerem A β (b) mit oder ohne 1 μ M B07 scFv-Fc, nAbs-A β oder IVIg für 24 Stunden inkubiert. (c) Unbehandelte Zellen wurden neben B07 scFv-Fc, einem Referenz scFv-Fc Antikörper und IVIg für 24 Stunden Inkubationsdauer getestet. Anschließend wurde jeweils ein Zellviabilitätsassay durchgeführt

und am Plattenleser (Tecan Infinite M200) ausgelesen. Alle Testungen wurden in Duplikaten mit einem n=3 gemessen. Gezeigt sind jeweils die gemittelten Einzelwerte sowie der Mittelwert.

2.5 Untersuchung der mikroglialen Aktivierung im *ex vivo* Mausmodell

Um potenzielle inflammatorische Effekte des humanen rekombinanten B07 scFv-Fc Antikörpers sowie von nAbs-A β und IVIg auf murine Zellverbände zu untersuchen, wurden *ex vivo* Experimente an hippocampalen Schnittkulturen (engl. *Organotypic hippocampal slice cultures*: OHSC) von C57Bl6J Mäusen durchgeführt. Dazu wurden OHSC von postnatalen Mäusen im Alter von 2-3 Tagen angefertigt und nach sechs Tagen Ruhephase mit dem rekombinanten Antikörper B07 scFv-Fc, nAbs-A β oder IVIg für acht Tage inkubiert. Anschließend wurden die Schnittkulturen immunhistochemisch analysiert ((Albus et al. 2021), Abb. 7A). Neben der Färbung toter Zellen mittels Propidium Iodid (PI) wurden die Schnitte auch mit dem neuronalen Marker NeuN und dem mikroglialen Marker Iba-1 angefärbt. Bei der immunhistochemischen Analyse wurde kein erhöhter Zelltod im Vergleich zur PBS-behandelten OHSC Kontrolle festgestellt. Die mit dem Antikörper B07 scFv-Fc oder mit nAbs-A β behandelten Schnitte wiesen eine morphologische Veränderung der Mikroglia auf ((Albus et al. 2021), Abb. 7A Pfeile). Diese Veränderung wurde jedoch nicht bei den mit IVIg behandelten Schnitten festgestellt. Die Morphologie und Quantität der Neurone blieben hingegen gänzlich unverändert. Ergänzend zur immunhistochemischen Analyse wurde die Sekretion von pro-/anti-inflammatorischen Markern anhand der Kulturüberstände untersucht ((Albus et al. 2021), Abb. 7B). Beispielhaft wurden nach Vollendung der Antikörper-Inkubation von acht Tagen dazu die Level der Interleukine Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) sowie des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) mittels ELISA Analyse der OHSC Überstände detektiert. Die Ausschüttung von IL-1 β konnte bei keiner der getesteten Konditionen detektiert werden. Die IL-6 Werte waren hingegen bei den mit dem Antikörper B07 scFv-Fc und nAbs-A β behandelten Schnitten gegenüber den IVIg behandelten Schnitten eindeutig erhöht. Die IL-6 Werte im Überstand der sowohl mit IVIg als auch mit PBS behandelten Schnitte blieben sehr gering. Die Sekretion von TNF- α zeigte sich im Vergleich zur IVIg Behandlung bei B07 scFv-Fc und nAbs-A β ebenfalls stark erhöht.

2.6 Veränderung des Fc N-Glykosylierungsmusters

Die in HEK-Zellen produzierten rekombinanten Antikörper B06, B07 und C06 im IgG-Format sowie der Antikörper B07 im scFv-Fc-Format wurden hinsichtlich ihrer N-Glykosylierung am Fc-Teil untersucht, da diese für viele Fc-vermittelten Funktionen wichtig bzw. notwendig ist. Das

Glykosylierungsmuster wurde mittels MALDI-TOF (engl. *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization — Time of Flight*: Matrix–Assistierte Laser–Desorption–Ionisierung mit der Flugzeitanalyse) analysiert und anschließend mit IVIg, als Vertreter natürlich vorkommender Autoantikörper, verglichen ((Albus et al. 2021), Abb. 8). In der Analyse ließen sich viele Glykane sowohl bei den untersuchten rekombinanten Antikörpern als auch bei IVIg nachweisen. Jedoch konnten an den exprimierten Glykanen der in HEK-Zellen produzierten Antikörper keinerlei Sialinsäuren detektiert werden.

3. Diskussion

Ziel der kumulativen Promotionsarbeit war die Generierung und Charakterisierung rekombinanter Antikörper, die eine passive Immunisierung gegen das Alzheimer-relevante Peptid A β darstellen könnten. Grundlage dafür bildeten natürlich vorkommende Autoantikörper gegen A β , welche bisher als Teil von IVIg Präparaten verfügbar, jedoch in ihrer Gesamtheit limitiert sind (Cattepoel et al. 2013). Dazu wurden A β -reaktive vermeintliche B1-Lymphozyten vereinzelt isoliert, ihre Immunglobulin-Gene identifiziert und daraus resultierend die vier rekombinanten monoklonalen Antikörper B06, B07 und C06 im IgG-Format sowie der Antikörper B07 im scFv-Fc Format generiert. Diese Antikörper wurden auf ihre Bindungseigenschaften anhand von ELISA und SPR, sowie auf ihre funktionelle Wirksamkeit auf monomeres als auch oligomeres A β *in vitro* untersucht. Zudem wurde die mikrogliale Aktivierung durch die humanen Antikörper im murinen *ex vivo* System betrachtet.

3.1 Isolation von B1-Lymphozyten

Die Grundlage der Arbeit war die Extraktion der genetischen Sequenz von B1-Lymphozyten, welche A β - und IgG-reaktiv waren. Dazu wurde ein gating-panel angewendet, welches humane B1-Lymphozyten markiert und als nAbs-produzierende B-Lymphozyten Subklasse dargestellt wird (Albus et al. 2019). Dementsprechend wurden mittels der FACS-Methode B-Lymphozyten vereinzelt isoliert, die CD20⁺, CD27⁺, CD43⁺, CD69⁻, A β ⁺ und IgG⁺ waren. Die Charakterisierung humaner B1-Lymphozyten und somit der Ursprung der nAbs ist zum jetzigen Zeitpunkt jedoch noch nicht abschließend geklärt und wird noch diskutiert (Descatoire et al. 2011; Griffin et al. 2011; Perez-Andres et al. 2011). Dabei wird vor allem die Bedeutung von CD43 zur Eingruppierung der B1-Lymphozyten infrage gestellt. Dennoch wurde in dieser Arbeit das gating-panel in Anlehnung an Griffin und Kollegen angewendet (Griffin and Rothstein 2012). Durch die anschließende Sequenzierung der variablen Regionen der isolierten B-Lymphozyten war eine erste detailliertere Analyse bezüglich ihres Ursprungs möglich. Die Reaktivität des Autoantigens A β weist zunächst auf den Ursprung von B1-Lymphozyten hin (Baumgarth 2011). Jedoch zeigten sich in der Sequenzanalyse (Daten nicht gezeigt) neben dem Klassenwechsel zu IgG auch, in Form von Mutationen, Affinitätsreifungen in der Sequenz. Diese weisen auf eine Keimzentrums-erfahrung und somit auf eine Zuordnung Richtung B2-Lymphozyten hin (Seifert and Küppers 2016; Rajewsky 1996). Für die weitere Charakterisierung dieser A β -reaktiven B-Lymphozyten war die vollständige Aufklärung des Ursprungs aufgrund des abgezielten therapeutischen Effekts

jedoch zweitrangig. Zur verständlichen Eingruppierung als nAbs wurden sie in dieser Arbeit dennoch als vermeintliche B1-Lymphozyten-Abkömmlinge bezeichnet. Bei der Analyse der verwendeten Genfamilien der isolierten A β -reaktiven B1-Lymphozyten ließen sich Übereinstimmungen zu bereits analysierten Tau-reaktiven B-Lymphozyten finden. Diese wurden ebenfalls als nAbs-produzierende B-Lymphozyten deklariert (Pascual et al. 2017). Das Verhältnis in der Verteilung in Richtung des kappa Subtyps der leichten IgG Kette untermauert zudem die Hypothese des bislang angenommenen Ursprung der nAbs (Masliah et al. 2011).

3.2 Unterschiede der Antikörperklone auf A β

Nach erfolgreicher Sequenzierung und Klonierung wurden drei vollständige IgGs (B06, B07 und C06) sowie ein scFv-Fc (B07) Antikörper erhalten und getestet. Die Antikörper zeigten dabei sehr unterschiedliche Eigenschaften im Hinblick auf Bindungskapazität und -Affinität. Da die IgG Antikörper in ELISA- und SPR Experimenten unzureichende Ergebnisse aufwiesen, wurden die Experimente mit dem veränderten scFv-Fc Konstrukt erweitert. Der Antikörper B07 zeigte im scFv-Fc Format dabei eine Zusammenlagerung einzelner scFv-Fc Antikörper zu Multimeren ((Albus et al. 2021), Abb. 1C). Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Cuesta et al. 2010). Dabei kann der Multimerisierungsgrad durch die Länge des Peptidlinkers, welcher die variablen Regionen der leichten und der schweren Kette miteinander verbindet, beeinflusst werden. Durch die Multimerisierung des Antikörpers entstand ein mit IgM-Antikörpern vergleichbares Konstrukt. Der B07 Antikörper im scFv-Fc Format wies eine erhöhte Bindungskapazität und -Affinität auf, sodass sich die weiteren funktionellen Experimente primär auf ihn bezogen. Sowohl die Inhibition der A β -Aggregation als auch die mikrogliale Aufnahmesteigerung von A β durch den B07 scFv-Fc Antikörper konnte positiv beeinflusst werden und zeigten zudem stärkere Effekte als unter der nAbs-A β Kondition. Durch die Multimerisierung des scFv-Fc Konstrukts konnte die mikrogliale Aufnahme vermutlich zusätzlich verstärkt werden, da der Antikörper im Multimer zusammengelagert mehrere Paratope für A β aufwies und somit entsprechend seiner gesteigerten Avidität mehr A β -Moleküle der Phagozytose zuleiten konnte. Neben der Antigenbindung an das Paratop wird die Antikörpervermittelte mikrogliale Aufnahme (engl. *Antibody dependent cellular phagocytosis*: ADCP) maßgeblich durch den Fc-Teil eines Antikörpers reguliert (Nimmerjahn and Ravetch 2008). Frühere Studien konnten bereits zeigen, dass die Fc γ -Bindung sowie die Fc γ -vermittelte Phagozytose in multimerisierten Antikörpern erhöht ist (Luo et al. 2009). Vor allem die niedrig-affinen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) Fc γ RIIA und Fc γ RIIIB werden stärker von multimeren als von monomeren Antikörpern gebunden, was einen Mechanismus zur Beseitigung großer Immunkomplexe durch

die Aktivierung von Immunzellen darstellen könnte (Luo et al. 2009). Demnach wiesen multimere Antikörper einen verstärkt protektiven Effekt durch effektivere ADCP auf.

Durch die Untersuchung der Zellviabilität konnte gezeigt werden, dass der eingesetzte B07 scFv-Fc Antikörper einen positiven Einfluss auf das Zellüberleben der behandelten Neurone hatte. Vergleichbare Beobachtungen wurden in einer Studie von Gómez-Guerrero und Kollegen gemacht (Gómez-Guerrero et al. 1994). Dabei konnte die Gruppe einen zellproliferativen Effekt durch aggregiertes IgG nachweisen, das vergleichbar mit dem multimerisierten scFv-Fc Konstrukt ist. Um das gesteigerte Zellüberleben im Hinblick auf das scFv-Fc-Format zu untersuchen, wurde ein Experiment mit einem unspezifischen scFv-Fc Antikörper ergänzt. Dieser wies zwar ebenfalls einen positiven Effekt auf das Zellüberleben auf, jedoch in verringerter Ausprägung im Vergleich zum B07 scFv-Fc-Antikörper (Abb. 2C). Bei dem unspezifischen scFv-Fc Antikörper wurden allerdings keine Angaben zum Multimerisierungsgrad angegeben, sodass dieses Ergebnis nicht durch eine potentielle Aggregation des Antikörpers bestätigt werden kann. Das gesteigerte Zellüberleben der Neurone unter scFv-Fc-Behandlung könnte somit auch lediglich einen *off-target* Effekt darstellen. Der Antikörper könnte dabei beispielweise fehlendes fetales Kälberserum (engl. *fetal calf serum*: FCS) im Behandlungsmedium kompensieren, da sich ein ähnliches Ergebnis des Zellüberlebens unter FCS-Zugabe gezeigt hat (Daten nicht gezeigt). Für die beschriebenen Zellkulturexperimente wurden die verwendeten neuronalen HT-22 Zellen zwar unter FCS-Zugabe kultiviert, jedoch wurde während der Behandlung auf FCS verzichtet. Ein direkter Zusammenhang des gesteigerten Zellüberlebens zur A β -Toxizität konnte somit nicht eindeutig nachgewiesen werden.

Die Testung von humanen Antikörpern im komplexen murinen System ermöglichte die Messung der mikroglialen Aktivierung im Zellverbundsystem. Unter der Behandlung mit dem B07 scFv-Fc Antikörper sowie mit nAbs-A β konnte eine morphologische Veränderung der Mikroglia festgestellt werden (Albus 2021, Abb. 7A). Unter IVIg und unter PBS Behandlung lagen die Mikroglia differenziert vor, was auf den mikroglialen Ruhemodus hindeutet (Fernández-Arjona et al. 2017). Unter Behandlung mit dem B07 scFv-Fc-Antikörper sowie unter nAbs-A β lagen die Mikroglia als konzentrierte Zellen im sogenannten amöboiden Status vor, die zum aktivierten Zustand zählen. Ergänzend dazu wurden die Kulturüberstände auf die Ausschüttung von inflammatorischen Markern untersucht. Es zeigte sich, dass unter B07 scFv-Fc und unter nAbs-A β Behandlung vermehrt IL-6 freigesetzt wurde ((Albus et al. 2021), Abb. 7B). Diese Beobachtung deckt sich mit den immunhistochemischen Ergebnissen über den aktivierten Zustand der Mikroglia unter B07 scFv-Fc und nAbs-A β . Jedoch weist IL-6 neben pro-

inflammatorischen auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf (sog. pleiotrophe Charakteristik) (Rothaug et al. 2016). Indem IL-6 unter anderem die mikrogliale Migration fördert, kann beispielweise eine erhöhte Phagozytose erzielt werden (Chakrabarty et al. 2010). Dabei stellt die erhöhte Phagozytose eines der Primärziele der Antikörpertherapie dar. Vergleichbare Studien zu aggregiertem IgG stellten ebenfalls eine erhöhte Ausschüttung von IL-6 dar, wodurch sich der beobachtete IL-6 Anstieg im OHSC Überstand unter der Behandlung mit dem B07 scFv-Fc Antikörper erklären ließe (Gómez-Guerrero et al. 1994).

Der B07 scFv-Fc Antikörper konnte, im Vergleich zu den weiteren rekombinanten Antikörpern B06, B07 und C06 im IgG Format, sowohl monomeres als auch oligomeres A β erkennen und beide Formen an Mikroglia vermitteln. Diese Eigenschaft wurde bei bisherigen untersuchten A β -reaktiven Antikörpern seltener beobachtet (van Dyck 2018). Viele bisher untersuchte anti-A β Antikörper zeigen eine definierte Präferenz für einen Aggregationsstatus, was sich durch das reaktive Epitop ergibt. Erkennt der Antikörper ein lineares Epitop, demnach eine Aminosäuresequenz, kann diese durch die Aggregation des A β verdeckt werden. Antikörper, welche strukturell binden, erkennen ein konformationsabhängiges Epitop. Dieses bildet sich erst durch die Zusammenlagerung zu höheren oligomeren oder fibrillären Strukturen oder durch die Umfaltung des Proteins aus (Roeder et al. 2013; Sela et al. 1967). Eine Reaktivität gegen verschiedene A β -Konformationen könnte evtl. eine wichtige Ansatzstelle bei der weiteren Etablierung einer passiven Immunisierung darstellen, da sowohl neurotoxische Oligomere als auch ihre monomere Vorstufe abgefangen werden könnten.

Zusammenfassend zeigte der B07 scFv-Fc Antikörper in allen Assays positive Ergebnisse, welche teilweise sogar stärker waren als in der nAbs-A β Kondition. Somit konnte das primäre Ziel der Promotionsarbeit, die rekombinante Herstellung von Antikörpern auf Basis von nAbs-A β , erfüllt werden. Interessanterweise wurde bei dem B07 scFv-Fc Antikörper eine Multimerisierung beobachtet, wodurch dieser von seiner Struktur und Größe vergleichbar mit IgM Antikörpern ist. IgM ähnliche Eigenschaften, wie Instabilität und Anfälligkeit für pH Veränderungen, lassen sich ebenfalls vermuten (Mader et al. 2013). Diese wurden im Rahmen dieser Arbeit aber nicht untersucht. Dies könnte zusätzlich eine Ansatzstelle zur Untersuchung und der Entwicklung von IgM Antikörpern darstellen, welche erfahrungsgemäß schwierig zu handhaben sind und bereits anhand von Alternativen, wie HexaBody™ Molekülen, untersucht werden (Jong et al. 2016).

3.3 Bedeutung der Fc N-Glykosylierung

Die Relevanz spezifischer Fc N-Glykosylierungen von Antikörpern wurde bei bisherigen klinisch relevanten anti-A β Antikörpern unterschätzt. Dabei ist bekannt, dass Rezeptorfunktionen wie ADCP und ADCC (engl. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*: Antikörper vermittelte Zelltoxizität) maßgeblich durch angefügte Glykane am Fc-Teil beeinflusst werden (Kaneko et al. 2006; Goetze et al. 2011; Raju and Lang 2014). Die dieser Arbeit zugrunde liegenden rekombinanten Antikörper wurden in HEK-Zellen produziert und weisen demnach ein humanes Glykosylierungsmuster auf. Mithilfe der MALDI-TOF Analyse dieser Antikörper konnte allerdings gezeigt werden, dass sich das von HEK-Zellen exprimierte Glykosylierungsmuster von natürlichen B-Lymphozyten unterscheidet (Albus 2021, Abb.8). Die rekombinanten Antikörper wiesen keine Sialinsäuren auf, welche bei der Stabilität von Immunglobulinen eine wesentliche Rolle einnehmen. Sialinsäuren schützen vor einem frühzeitigen Abbau durch den Asialoglycoproteinrezeptor (Correia 2010; Washburn et al. 2015; Bas et al. 2019). Antikörper, sowie weitere Glykoproteine und Erythrozyten im Serum, können aufgrund fehlender Sialinsäuren extrazellulär Galaktosereste exprimieren. Dadurch wird der Antikörper bzw. das Glykoprotein durch den Asialoglycoproteinrezeptor gebunden, in Vesikel eingeschlossen und anschließend degradiert (Ashwell and Harford 1982). Allgemein haben Immunglobuline im Körper eine Halbwertszeit von circa 25,8 Tagen (Mankarious et al. 1988). Fehlende Sialinsäuren verkürzen infolge der vorzeitigen Degradation durch den Asialoglycoproteinrezeptor jedoch wesentlich die Bioverfügbarkeit. Dadurch ist die Effizienz des verabreichten Antikörpers im Organismus stark reduziert. Diese Information könnte die notwendigen Konzentrationen an anti-A β Antikörpern in bisherigen klinischen Studien erklären. Der Abbau einer höheren Konzentration an Antikörpern dauert länger. Somit würde eine längere Bioverfügbarkeit und dementsprechend eine höhere Effizienz erhalten werden. Jedoch könnte die hohe Konzentration zur häufigsten Nebenwirkung mit vasogenen Ödemen (ARIA-E) führen. Diese wurde vor allem in den Versuchsgruppen mit höherer Antikörperkonzentration nachgewiesen (Ostrowitzki et al. 2017; Schneider 2020). Die Abwesenheit von Sialinsäuren hat jedoch den Vorteil, dass die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IgG erhöht werden (Kaneko et al. 2006), welche bei Immunisierungen sinnvoll sind.

Die in dieser Studie verwendeten Antikörper wurden im kleinen Maßstab produziert, wozu sich das HEK-Zellsystem anbietet. Für einen größeren Maßstab, wie beispielweise für passive Immunisierungen, werden meistens CHO (engl. *Chinese hamster ovary*: Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Zwerghamsters) -Zellen verwendet. Dadurch wird dem Glykosylierungsproblem jedoch keinesfalls umgangen. Untersuchungen von CHO-sezernierten IgG haben gezeigt, dass

den Glykanen zusätzlich zu den Sialinsäuren auch bi-antennäre N-Acetylglucosamine fehlen, welche mit einer verminderten ADCP und ADCC verbunden sind (Kronimus et al. 2019). Demnach stellen beide Zelllinien aufgrund ihres natürlichen Glykosylierungsmusters kein ideales System dar. Jedoch könnten mithilfe des so genannten „Glyko-engineerings“ spezifische Glykane am Antikörper hinzugefügt werden, sodass entsprechende glykosylierungsabhängige Effekte erzielt und somit verbessert werden (Dekkers et al. 2016; Bruggeman et al. 2018). Die nachgeschalteten Effektorfunktionen des Antikörpers würden somit zusätzlich beeinflusst und optimiert werden können.

3.4 Limitationen der Studien

Die untersuchten humanen rekombinanten Antikörper wurden im murinen Zellkultursystem *in vitro* getestet. Sowohl die Bindungskapazitäten und -Affinitäten als auch die Fibrillationsanalyse sind von der Speziesbarriere ausgenommen. Doch im Hinblick auf die mikrogliale Aufnahmesteigerung und die Zellviabilität sind die erhobenen Daten nur bedingt aussagekräftig. Vor allem bei Rezeptor-vermittelten Prozessen, wie Phagozytose und Zytokin-Freisetzung, ist die Aussagekraft von Interspezies-Versuchen limitiert. Um eine präzise Aussage treffen zu können, müssten die vorliegenden *in vitro* Ergebnisse mit chimären, murinen-humanen Antikörpern verifiziert werden (Brüggemann et al. 1989). Zudem könnten die Experimente auf humane Zellen, wie etwa SH-SY5Y als neuronale und HMC3 als mikrogliale Zellkulturen, erweitert werden. Eine Alternative könnte auch die Verwendung von transgenen Mäusen sein, welche humane Fc-Rezeptoren aufweisen, um die nachgeschalteten Prozesse wie ADCP und ADCC besser untersuchen zu können (Smith et al. 2012). Jedoch wird zurzeit noch darüber diskutiert, ob murine Fc-Rezeptoren überhaupt unterschiedlich zu humanen Fc-Rezeptoren reagieren und dadurch eine geeignetere humane ADCP und ADCC in der Maus darstellen (Dekkers et al. 2017). Die Zellkulturüberstände der *ex vivo* untersuchten OHSC zeigten des Weiteren einen Anstieg an Zytokinen, die aufgrund der Spezies Abweichung nicht eindeutig ihrer Ursache zugerechnet werden konnten. Die Zytokine könnten so beispielweise ein Resultat einer murinen Antikörperreaktion auf humane Antikörper (engl. *murine-anti-human antibody reaction = MAHA*) sein und keine Folge der eingeleiteten Phagozytose (Loeffler et al. 2012). Auch hier könnte ein chimärer Antikörper diese Problematik in weiteren Versuchen umgehen.

3.5 Ausblick

Die Isolation von A β -reaktiven B1-Lymphozyten sowie die Amplifikation und Klonierung der Antikörper waren so weit erfolgreich, als dass diese Antikörper eine eindeutige Bindung an A β zeigen konnten. Zudem waren die Antikörper, wenn auch in unterschiedlichem Maße, gegen typische A β pathologische Mechanismen wirksam. Allgemein sollte hier aber noch die Fallzahl erhöht werden, um eine bessere statistische Aussage treffen zu können.

Anhand der *ex vivo* Versuche an OHSC konnten erste wichtige Informationen über die Aktivierung mikroglialer Zellen gesammelt werden. Diese Beobachtungen müssen dennoch weiter ausführlich *in vivo* getestet werden, um unerwünschte pro-inflammatorische Reaktionen auszuschließen. Auch mögliche immunogene Nebenwirkungen des Antikörpers, die unter anderem durch die Multimerisierung des Antikörpers auftreten könnten, müssen in weiteren Untersuchungen identifiziert werden, um sie bei Applikation beim Menschen zu vermeiden (Polumuri et al. 2018). Ein zusätzliches „glyco-engineering“ kann die Effektorfunktionen des Antikörpers regulieren bzw. beeinflussen, um die Problematik der Zelllinien-Glykosylierung zu umgehen und den eingesetzten Antikörper für eine lange Bioverfügbarkeit zu stabilisieren. Darüber hinaus muss die potenzielle Hirngängigkeit des rekombinanten Antikörpers untersucht werden, welche mit der generellen Applikation eines therapeutischen Antikörpers zur Behandlung einer neurodegenerativen Erkrankung einhergeht.

4. Referenzen

- Albus A; Gold M; Bach J-P; Burg-Roderfeld M; Jördens M; Kirchhein Y; Kronimus Y; Mengel D; Zerr I; Dodel R (2018). Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid, Prion Protein and α -Synuclein. *PLoS ONE*. 8. 13. e0202954.
- Albus A; Jördens M; Möller M; Dodel R (2019). Encoding the Sequence of Specific Autoantibodies Against beta-Amyloid and alpha-Synuclein in Neurodegenerative Diseases. *Front Immunol*. 10. 2033.
- Albus A; Kronimus Y; Neumann S; Vidovic N; Frenzel A; Kuhn P; Seifert M; Ziehm T; van der Wurp H; Dodel R (2021). Effects of a Multimerized Recombinant Autoantibody Against Amyloid- β . *Neuroscience*. Im Druck.
- Alzheimer A (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*. 64. 146–148.
- Alzheimer's Association (2019). 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 3. 15. 321–387.
- Arvanitakis Z; Shah RC; Bennett DA (2019). Diagnosis and Management of Dementia: Review. *JAMA*. 16. 322. 1589–1599.
- Ashwell G; Harford J (1982). Carbohydrate-specific receptors of the liver. *Annu Rev Biochem*. 51. 531–554.
- Bajaj T; Ramirez A; Wagner-Thelen H (2018). Genetik der Alzheimer-Krankheit. *medgen*. 2. 30. 259–266.
- Bard F; Cannon C; Barbour R; Burke RL; Games D; Grajeda H; Guido T; Hu K; Huang J; Johnson-Wood K; Khan K; Kholodenko D; Lee M; Lieberburg I; Motter R; Nguyen M; Soriano F; Vasquez N; Weiss K; Welch B; Seubert P; Schenk D; Yednock T (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*. 8. 6. 916–919.
- Bas M; Terrier A; Jacque E; Dehenne A; Pochet-Béghin V; Béghin C; Dezetter A-S; Dupont G; Engrand A; Beauvils B; Mondon P; Fournier N; Romeuf C de; Jorieux S; Fontayne A; Mars LT; Monnet C (2019). Fc Sialylation Prolongs Serum Half-Life of Therapeutic Antibodies. *J Immunol*. 5. 202. 1582–1594.
- Baumgarth N (2011). The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. *Nat Rev Immunol*. 1. 11. 34–46.
- Baxter D (2007). Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing. *Occup Med (Lond)*. 8. 57. 552–556.
- Beauté J; Levy P; Millet V; Debré M; Dudoit Y; Le Mignot L; Tajahmady A; Thomas C; Suarez F; Pellier I; Hermine O; Aladjidi N; Mahlaoui N; Fischer A (2010). Economic evaluation of immunoglobulin replacement in patients with primary antibody deficiencies. *Clin Exp Immunol*. 2. 160. 240–245.

- Braak H; Alafuzoff I; Arzberger T; Kretschmar H; Del Tredici K (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol.* 4. 112. 389–404.
- Bruggeman CW; Dekkers G; Visser R; Goes NWM; van den Berg TK; Rispen T; Vidarsson G; Kuijpers TW (2018). IgG Glyco-Engineering to Improve IVIg Potency. *Front Immunol.* 9. 2442.
- Brüggemann M; Winter G; Waldmann H; Neuberger MS (1989). The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med.* 6. 170. 2153–2157.
- Cattepoel S; Schaub A; Ender M; Gaida A; Kropf A; Guggisberg U; Nolte MW; Fabri L; Adlard PA; Finkelstein DI; Bolli R; Miescher SM (2013). Intravenous immunoglobulin binds beta amyloid and modifies its aggregation, neurotoxicity and microglial phagocytosis in vitro. *PLoS ONE.* 5. 8. e63162.
- Chakrabarty P; Jansen-West K; Beccard A; Ceballos-Diaz C; Levites Y; Verbeeck C; Zubair AC; Dickson D; Golde TE; Das P (2010). Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses Abeta deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J.* 2. 24. 548–559.
- Chasseigneaux S; Allinquant B (2012). Functions of A β , sAPP α and sAPP β : similarities and differences. *J Neurochem.* 120 Suppl 1. 99–108.
- Corder EH; Saunders AM; Strittmatter WJ; Schmechel DE; Gaskell PC; Small GW; Roses AD; Haines JL; Pericak-Vance MA (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science.* 5123. 261. 921–923.
- Correia IR (2010). Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs.* 3. 2. 221–232.
- Cuesta AM; Sainz-Pastor N; Bonet J; Oliva B; Alvarez-Vallina L (2010). Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol.* 7. 28. 355–362.
- Cui C-C; Sun Y; Wang X-Y; Zhang Y; Xing Y (2019). The effect of anti-dementia drugs on Alzheimer disease-induced cognitive impairment: A network meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 27. 98. e16091.
- Danysz W; Parsons CG (2012). Alzheimer's disease, β -amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections. *Br J Pharmacol.* 2. 167. 324–352.
- Dekkers G; Bentlage AEH; Stegmann TC; Howie HL; Lissenberg-Thunnissen S; Zimring J; Rispen T; Vidarsson G (2017). Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs.* 5. 9. 767–773.
- Dekkers G; Plomp R; Koeleman CAM; Visser R; Horsten HH von; Sandig V; Rispen T; Wuhrer M; Vidarsson G (2016). Multi-level glyco-engineering techniques to generate IgG with defined Fc-glycans. *Sci Rep.* 6. 36964.
- DeMattos RB; Bales KR; Cummins DJ; Dodart JC; Paul SM; Holtzman DM (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.* 15. 98. 8850–8855.
- Descatoire M; Weill J-C; Reynaud C-A; Weller S (2011). A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med.* 13. 208. 2563–2564.

- DeTure MA; Dickson DW (2019). The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener.* 1. 14. 32.
- Dodel R; Rominger A; Bartenstein P; Barkhof F; Blennow K; Förster S; Winter Y; Bach J-P; Popp J; Alferink J; Wiltfang J; Buerger K; Otto M; Antuono P; Jacoby M; Richter R; Stevens J; Melamed I; Goldstein J; Haag S; Wietek S; Farlow M; Jessen F (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.* 3. 12. 233–243.
- Doody RS; Farlow M; Aisen PS (2014). Phase 3 trials of solanezumab and bapineuzumab for Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 15. 370. 1460.
- Du Y; Dodel R; Hampel H; Buerger K; Lin S; Eastwood B; Bales K; Gao F; Moeller HJ; Oertel W; Farlow M; Paul S (2001). Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology.* 5. 57. 801–805.
- Dulin F; Léveillé F; Ortega JB; Mornon J-P; Buisson A; Callebaut I; Colloc'h N (2008). P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett.* 13. 582. 1865–1870.
- Elkon K; Casali P (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 9. 4. 491–498.
- Farrer LA; Cupples LA; Haines JL; Hyman B; Kukull WA; Mayeux R; Myers RH; Pericak-Vance MA; Risch N; van Duijn CM (1997). Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium. *JAMA.* 16. 278. 1349–1356.
- Fernández-Arjona MdM; Grondona JM; Granados-Durán P; Fernández-Llebrez P; López-Ávalos MD (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci.* 11.
- Ferrer I; Boada Rovira M; Sánchez Guerra ML; Rey MJ; Costa-Jussá F (2004). Neuropathology and pathogenesis of encephalitis following amyloid-beta immunization in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 1. 14. 11–20.
- Gelfand EW (2012). Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 21. 367. 2015–2025.
- Gilman S; Koller M; Black RS; Jenkins L; Griffith SG; Fox NC; Eisner L; Kirby L; Rovira MB; Forette F; Orgogozo J-M (2005). Clinical effects of Abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology.* 9. 64. 1553–1562.
- Goetze AM; Liu YD; Zhang Z; Shah B; Lee E; Bondarenko PV; Flynn GC (2011). High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology.* 7. 21. 949–959.
- Gold M; Mengel D; Röskam S; Dodel R; Bach J-P (2013). Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against β -amyloid on microglia. *J Neuroinflammation.* 10. 5.

- Gómez-Guerrero C; López-Armada MJ; González E; Egido J (1994). Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol.* 11. 153. 5247–5255.
- Griffin DO; Holodick NE; Rothstein TL (2011). Human B1 cells are CD3-: A reply to "A human equivalent of mouse B-1 cells?" and "The nature of circulating CD27+CD43+ B cells". *J Exp Med.* 13. 208. 2566–2569.
- Griffin DO; Rothstein TL (2012). Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front Immunol.* 3. 122.
- Habib A; Sawmiller D; Tan J (2017). Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *J Neurosci Res.* 4. 95. 973–991.
- Hardy JA; Higgins GA (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science.* 5054. 256. 184–185.
- Hayakawa K; Hardy RR; Herzenberg LA (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med.* 6. 161. 1554–1568.
- Istrin G; Bosis E; Solomon B (2006). Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res.* 2. 84. 434–443.
- Jack CR; Knopman DS; Jagust WJ; Shaw LM; Aisen PS; Weiner MW; Petersen RC; Trojanowski JQ (2010). Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *The Lancet Neurology.* 1. 9. 119–128.
- Jong RN de; Beurskens FJ; Verploegen S; Strumane K; van Kampen MD; Voorhorst M; Horstman W; Engelberts PJ; Oostindie SC; Wang G; Heck AJR; Schuurman J; Parren PWHI (2016). A Novel Platform for the Potentiation of Therapeutic Antibodies Based on Antigen-Dependent Formation of IgG Hexamers at the Cell Surface. *PLoS Biol.* 1. 14. e1002344.
- Kaneko Y; Nimmerjahn F; Ravetch JV (2006). Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science.* 5787. 313. 670–673.
- Karran E; Strooper B de (2016). The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? *J Neurochem.* 139 Suppl 2. 237–252.
- Kayed R; Lasagna-Reeves CA (2013). Molecular mechanisms of amyloid oligomers toxicity. *J Alzheimers Dis.* 33 Suppl 1. S67-78.
- Kronimus Y; Albus A; Hasenberg M; Walkenfort B; Seifert M; Budeus B; Gronewold J; Hermann DM; Lochnit G; Galuska SP; Sitek B; Mengel D; Neumann S; Dodel R (submitted). Fc N-glycosylation of autoreactive A β antibodies as blood-based biomarker for Alzheimer's disease.
- Kronimus Y; Dodel R; Galuska SP; Neumann S (2019). IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun.* 96. 14–23.
- Kronimus Y; Dodel R; Neumann S (2018). A quantitative view on naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative diseases. *Journal of Neurology & Neuromedicine.* 4. 3. 5–11.
- Laakso MP; Soininen H; Partanen K; Helkala EL; Hartikainen P; Vainio P; Hallikainen M; Hänninen T; Riekkinen PJ (1995). Volumes of hippocampus, amygdala and frontal lobes in the MRI-

- based diagnosis of early Alzheimer's disease: correlation with memory functions. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect.* 1. 9. 73–86.
- Lippa CF; Saunders AM; Smith TW; Swearer JM; Drachman DA; Ghetti B; Nee L; Pulaski-Salo D; Dickson D; Robitaille Y; Bergeron C; Crain B; Benson MD; Farlow M; Hyman BT; George-Hyslop SP; Roses AD; Pollen DA (1996). Familial and sporadic Alzheimer's disease: neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology.* 2. 46. 406–412.
- Liu Y-H; Wang Y-R; Xiang Y; Zhou H-D; Giunta B; Mañucat-Tan NB; Tan J; Zhou X-F; Wang Y-J (2015). Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: shifting the action site from center to periphery. *Mol Neurobiol.* 1. 51. 1–7.
- Livingston G; Huntley J; Sommerlad A; Ames D; Ballard C; Banerjee S; Brayne C; Burns A; Cohen-Mansfield J; Cooper C; Costafreda SG; Dias A; Fox N; Gitlin LN; Howard R; Kales HC; Kivimäki M; Larson EB; Ogunniyi A; Orgeta V; Ritchie K; Rockwood K; Sampson EL; Samus Q; Schneider LS; Selbæk G; Teri L; Mukadam N (2020). Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *The Lancet.* 10248. 396. 413–446.
- Livingston G; Sommerlad A; Orgeta V; Costafreda SG; Huntley J; Ames D; Ballard C; Banerjee S; Burns A; Cohen-Mansfield J; Cooper C; Fox N; Gitlin LN; Howard R; Kales HC; Larson EB; Ritchie K; Rockwood K; Sampson EL; Samus Q; Schneider LS; Selbæk G; Teri L; Mukadam N (2017). Dementia prevention, intervention, and care. *The Lancet.* 10113. 390. 2673–2734.
- Loeffler DA; Smith LM; Klaver AC; Brzezinski HA; Morrison EI; Coffey MP; Steficek BA; Cook SS (2012). Development of antihuman IgG antibodies and hematologic deficits but not clinical abnormalities in C57BL/6 mice after repeated administration of human intravenous immunoglobulin. *Comp Med.* 1. 62. 31–36.
- Luo Y; Lu Z; Raso SW; Entrican C; Tangarone B (2009). Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fcγ receptors. *MAbs.* 5. 1. 491–504.
- Mader A; Chromikova V; Kunert R (2013). Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production. *ABB.* 04. 04. 38–43.
- Mak TW; Saunders ME; Jett BD (2014). Primer to the immune response. Elsevier. 2. ed. 674.
- Mandelkow EM; Schweers O; Drewes G; Biernat J; Gustke N; Trinczek B; Mandelkow E (1996). Structure, microtubule interactions, and phosphorylation of tau protein. *Ann N Y Acad Sci.* 777. 96–106.
- Mankarious S; Lee M; Fischer S; Pyun KH; Ochs HD; Oxelius VA; Wedgwood RJ (1988). The half-lives of IgG subclasses and specific antibodies in patients with primary immunodeficiency who are receiving intravenously administered immunoglobulin. *J Lab Clin Med.* 5. 112. 634–640.
- Masliah E; Rockenstein E; Mante M; Crews L; Spencer B; Adame A; Patrick C; Trejo M; Ubhi K; Rohn TT; Mueller-Stainer S; Seubert P; Barbour R; McConlogue L; Buttini M; Games D; Schenk D (2011). Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS ONE.* 4. 6. e19338.
- Mengel D; Röskam S; Neff F; Balakrishnan K; Deuster O; Gold M; Oertel WH; Bacher M; Bach JP; Dodel R (2013). Naturally occurring autoantibodies interfere with β-amyloid metabolism

- and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*. 3. e236.
- Moghul S; Wilkinson D (2001). Use of acetylcholinesterase inhibitors in Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother*. 1. 1. 61–69.
- Musiek ES; Holtzman DM (2015). Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and 'wingmen'. *Nat Neurosci*. 6. 18. 800–806.
- Nalivaeva NN; Turner AJ (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*. 13. 587. 2046–2054.
- Naseri NN; Wang H; Guo J; Sharma M; Luo W (2019). The complexity of tau in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 705. 183–194.
- Ngandu T; Lehtisalo J; Solomon A; Levälahti E; Ahtiluoto S; Antikainen R; Bäckman L; Hänninen T; Jula A; Laatikainen T; Lindström J; Mangialasche F; Pajananen T; Pajala S; Peltonen M; Rauramaa R; Stigsdotter-Neely A; Strandberg T; Tuomilehto J; Soininen H; Kivipelto M (2015). A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER): a randomised controlled trial. *The Lancet*. 9984. 385. 2255–2263.
- Nhan HS; Chiang K; Koo EH (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*. 1. 129. 1–19.
- Nicoll JAR; Wilkinson D; Holmes C; Steart P; Markham H; Weller RO (2003). Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report. *Nat Med*. 4. 9. 448–452.
- Nimmerjahn F; Ravetch JV (2008). Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 1. 8. 34–47.
- O'Brien RJ; Wong PC (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 34. 185–204.
- Orgogozo J-M; Gilman S; Dartigues J-F; Laurent B; Puel M; Kirby LC; Jouanny P; Dubois B; Eisner L; Flitman S; Michel BF; Boada M; Frank A; Hock C (2003). Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Aβ₄₂ immunization. *Neurology*. 1. 61. 46–54.
- Ostrowitzki S; Lasser RA; Dorflinger E; Scheltens P; Barkhof F; Nikolcheva T; Ashford E; Retout S; Hofmann C; Delmar P; Klein G; Andjelkovic M; Dubois B; Boada M; Blennow K; Santarelli L; Fontoura P (2017). A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*. 1. 9. 95.
- Pardridge WM (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 1. 2. 3–14.
- Pascual G; Wadia JS; Zhu X; Keogh E; Kükroer B; van Ameijde J; Inganäs H; Siregar B; Perdok G; Diefenbach O; Nahar T; Sprengers I; Koldijk MH; der Linden ECB-v; Peferoen LA; Zhang H; Yu W; Li X; Wagner M; Moreno V; Kim J; Costa M; West K; Fulton Z; Chammas L; Luckashenk N; Fletcher L; Holland T; Arnold C; Anthony Williamson R; Hoozemans JJ; Apetri A; Bard F; Wilson IA; Koudstaal W; Goudsmit J (2017). Immunological memory to hyperphosphorylated tau in asymptomatic individuals. *Acta Neuropathol*. 5. 133. 767–783.

- Perez-Andres M; Grosserichter-Wagener C; Teodosio C; van Dongen JJM; Orfao A; van Zelm MC (2011). The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med.* 13. 208. 2565–2566.
- Pinti M; Appay V; Campisi J; Frasca D; Fülöp T; Sauce D; Larbi A; Weinberger B; Cossarizza A (2016). Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur J Immunol.* 10. 46. 2286–2301.
- Polumuri SK; Haile LA; Ireland DDC; Verthelyi D (2018). Aggregates of IVIG or Avastin, but not HSA, modify the response to model innate immune response modulating impurities. *Sci Rep.* 1. 8. 11477.
- Rajewsky K (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* 6585. 381. 751–758.
- Raju TS; Lang SE (2014). Diversity in structure and functions of antibody sialylation in the Fc. *Curr Opin Biotechnol.* 30. 147–152.
- Raux G; Guyant-Maréchal L; Martin C; Bou J; Penet C; Brice A; Hannequin D; Frebourg T; Campion D (2005). Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet.* 10. 42. 793–795.
- Reiman EM; Quiroz YT; Fleisher AS; Chen K; Velez-Pardo C; Jimenez-Del-Rio M; Fagan AM; Shah AR; Alvarez S; Arbelaez A; Giraldo M; Acosta-Baena N; Sperling RA; Dickerson B; Stern CE; Tirado V; Munoz C; Reiman RA; Huentelman MJ; Alexander GE; Langbaum JBS; Kosik KS; Tariot PN; Lopera F (2012). Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *The Lancet Neurology.* 12. 11. 1048–1056.
- Relkin N (2014). Clinical trials of intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *J Clin Immunol.* 34 Suppl 1. S74-9.
- Relkin NR; Szabo P; Adamiak B; Burgut T; Monthe C; Lent RW; Younkin S; Younkin L; Schiff R; Weksler ME (2009). 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging.* 11. 30. 1728–1736.
- Relkin NR; Thomas RG; Rissman RA; Brewer JB; Rafii MS; van Dyck CH; Jack CR; Sano M; Knopman DS; Raman R; Szabo P; Gelmont DM; Fritsch S; Aisen PS (2017). A phase 3 trial of IV immunoglobulin for Alzheimer disease. *Neurology.* 18. 88. 1768–1775.
- Roeder AM; Roettger Y; Stündel A; Dodel R; Geyer A (2013). Synthetic dimeric A β (28-40) mimics the complex epitope of human anti-A β autoantibodies against toxic A β oligomers. *J Biol Chem.* 38. 288. 27638–27645.
- Rothaug M; Becker-Pauly C; Rose-John S (2016). The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. *Biochim Biophys Acta.* 6 Pt A. 1863. 1218–1227.
- Rountree SD; Atri A; Lopez OL; Doody RS (2013). Effectiveness of antidementia drugs in delaying Alzheimer's disease progression. *Alzheimers Dement.* 3. 9. 338–345.
- Rovelet-Lecrux A; Hannequin D; Raux G; Le Meur N; Laquerrière A; Vital A; Dumanchin C; Feuillet S; Brice A; Vercelletto M; Dubas F; Frebourg T; Campion D (2006). APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet.* 1. 38. 24–26.

- Salloway S; Sperling R; Fox NC; Blennow K; Klunk W; Raskind M; Sabbagh M; Honig LS; Porsteinsson AP; Ferris S; Reichert M; Ketter N; Nejadnik B; Guenzler V; Miloslavsky M; Wang D; Lu Y; Lull J; Tudor IC; Liu E; Grundman M; Yuen E; Black R; Brashear HR (2014). Two phase 3 trials of bapineuzumab in mild-to-moderate Alzheimer's disease. *N Engl J Med.* 4. 370. 322–333.
- Sarazin M; Dorothée G; Souza LC de; Aucouturier P (2013). Immunotherapy in Alzheimer's disease: do we have all the pieces of the puzzle? *Biol Psychiatry.* 5. 74. 329–332.
- Schenk D; Barbour R; Dunn W; Gordon G; Grajeda H; Guido T; Hu K; Huang J; Johnson-Wood K; Khan K; Kholodenko D; Lee M; Liao Z; Lieberburg I; Motter R; Mutter L; Soriano F; Shopp G; Vasquez N; Vandeventer C; Walker S; Wogulis M; Yednock T; Games D; Seubert P (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 6740. 400. 173–177.
- Schneider L (2020). A resurrection of aducanumab for Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology.* 2. 19. 111–112.
- Seifert M; Küppers R (2016). Human memory B cells. *Leukemia.* 12. 30. 2283–2292.
- Sela M; Schechter B; Schechter I; Borek F (1967). Antibodies to Sequential and Conformational Determinants. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 0. 32. 537–545.
- Selkoe DJ; Hardy J (2016). The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 6. 8. 595–608.
- Shoenfeld Y; Gershwin M; Meroni P (2013). Autoantibodies. *Amsterdam, Elsevier Science.*
- Smith P; DiLillo DJ; Bournazos S; Li F; Ravetch JV (2012). Mouse model recapitulating human Fcγ receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16. 109. 6181–6186.
- Strikas RA; Mawle AC; Pickering LK; Orenstein WA (2018). Active Immunization.
- Tosto G; Reitz C (2013). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease: a review. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 10. 13. 381.
- U.S. Food & Drug Administration (2020). Meeting of the Peripheral and Central Nervous System Drugs Advisory Committee Meeting Announcement. <https://www.fda.gov/advisory-committees/advisory-committee-calendar/november-6-2020-meeting-peripheral-and-central-nervous-system-drugs-advisory-committee-meeting>. Zuletzt geprüft am 21.03.2021.
- van Dyck CH (2018). Anti-Amyloid-β Monoclonal Antibodies for Alzheimer's Disease: Pitfalls and Promise. *Biol Psychiatry.* 4. 83. 311–319.
- Wake H; Fields RD (2011). Physiological function of microglia. *Neuron Glia Biol.* 1. 7. 1–3.
- Walsh DM; Selkoe DJ (2020). Amyloid β-protein and beyond: the path forward in Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol.* 61. 116–124.
- Washburn N; Schwab I; Ortiz D; Bhatnagar N; Lansing JC; Medeiros A; Tyler S; Mekala D; Cochran E; Sarvaiya H; Garofalo K; Meccariello R; Meador JW; Rutitzky L; Schultes BC; Ling L; Avery W; Nimmerjahn F; Manning AM; Kaundinya GV; Bosques CJ (2015). Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 11. 112. E1297-306.

- Weiskopf D; Weinberger B; Grubeck-Loebenstein B (2009). The aging of the immune system. *Transpl Int.* 11. 22. 1041–1050.
- Weksler ME; Relkin N; Turkenich R; LaRusse S; Zhou L; Szabo P (2002). Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol.* 7. 37. 943–948.
- Yang G; Wang Y; Sun J; Zhang K; Liu J (2016). Ginkgo Biloba for Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Curr Top Med Chem.* 5. 16. 520–528.

5. Zusammenfassung

Die weltweit häufigste neurodegenerative Erkrankung ist die Alzheimer-Erkrankung. Sie ist durch das Absterben von Neuronen gekennzeichnet mit der Folge einer chronisch fortschreitenden kognitiven Beeinträchtigung. Durch bisher ungeklärte Mechanismen werden in der Pathogenese vorrangig Amyloid- β (A β) Peptide prozessiert, welche sich fehlgefaltet zu neurotoxischen Oligomeren zusammenlagern, an Neuronen ablagern und somit destabilisieren. Bisher gibt es kein effektives Therapeutikum, welches die Pathogenese durch die Oligomerbildung verhindert. Die passive Immunisierung mittels Antikörpern stellt einen vielversprechenden Ansatz dar. Dabei wird A β durch Antikörper markiert und durch umliegende Makrophagen phagozytiert. Bisherige klinische Studien dazu blieben jedoch bisher ohne Erfolg. Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf einen physiologischen Ansatz der passiven Immunisierung mittels natürlich vorkommender Autoanti-körper (nAbs), welche u.a. fehlgefaltetes A β erkennen und Makrophagen zuführen (nAbs-A β). Dabei wurden sie bisher als Teil kommerzieller Intravenöser Immunglobulin-Präparate (IVIg) aufgereinigt. Da diese therapeutische Quelle jedoch in ihrer Verfügbarkeit limitiert ist, wurde in dieser Arbeit eine rekombinante Herstellung dieser Antikörper erprobt.

Durch die Isolation einzelner A β -reaktiver B1-Lymphozyten aus gesunden Spendern konnten die Ig-Gene identifiziert werden, auf deren Grundlage drei rekombinante humane Antikörper im IgG Format, sowie einem in dem veränderten Einzelketten (scFv-Fc) Format, hergestellt wurden. Durch Bindungs- und funktionelle Analysen konnte dabei der B07 scFv-Fc Antikörper in allen Experimenten die positivsten Ergebnisse aufweisen und somit als der in dieser Arbeit vielversprechendste Antikörperkandidat für zukünftige passive Immunisierungsstudien identifiziert werden. Die Analyse des Antikörper Glykosylierungsmusters hat zudem eine mögliche Schwachstelle rekombinanter Antikörper allgemein aufgezeigt. Durch die spezifische Glykosylierung von verwendeten HEK-Zellen werden sowohl die Stabilität des Antikörpers als auch die Fc-Rezeptor-vermittelten Funktionen essenziell beeinträchtigt. Für weitere Immunisierungsversuche sollte demnach das Glykosylierungsmuster berücksichtigt und eventuell durch spezifisches „Glyco-engineering“ optimiert werden.

Die Aussagekraft der Arbeit wird jedoch durch den Einsatz von murinen Zellsystemen limitiert. So können die Beobachtungen teilweise nur bedingt gewertet werden, da die Ergebnisse durch die Speziesbarriere Maus-Mensch beeinflusst und zudem weitere immunologische Reaktionen hervorrufen werden könnten.

Zusammenfassend konnten mithilfe aufgereinigter Blutspenden gesunder Probanden rekombinante A β -reaktive Antikörper generiert werden, wovon der B07 im multimeren scFv-Fc Format eine vergleichbare Effizienz zu nAbs-A β aufweist und somit für eine zukünftige passive Immunisierung eingesetzt werden könnte, um den Verlauf der Alzheimer Erkrankung zu verlangsamen bzw. frühzeitig zu unterbinden. Durch den frühestmöglichen Einsatz mit einem geeigneten Antikörper könnten A β Moleküle abgefangen und verstoffwechselt werden bevor sie sich ablagern und pathologisch wirken. Da sich der multimerisierte B07 Antikörper sowohl gegen monomeres als auch gegen oligomeres A β reaktiv gezeigt hat würden zudem verschiedene Aggregationsformen zur Phagozytose geleitet werden und so auch bereits zusammengelagerte A β Moleküle binden. Zudem zeigt der Antikörper auch eine höhere Avidität und dadurch eine effizientere Bereinigung von A β . Generell nachteilig an einer passiven Immunisierung zeigt sich die Halbwertszeit von Antikörpern, wodurch diese in regelmäßigen Abständen appliziert werden müssten, um fortgehend wirken zu können. Eine zusätzliche Veränderung des Glykosylierungs-musters kann die Stabilität steigern und die Antikörper länger verfügbar machen, wodurch die applizierte Konzentration vermutlich gesenkt werden kann und dadurch weniger Nebenwirkungen, wie Ödeme, auftreten. Jedoch ist bisher noch nicht geklärt, inwiefern die eingesetzten Antikörper hirngängig sind oder ob sie das freigesetzte A β peripher binden und dort der Verstoffwechslung zuführen.

Durch die Kombination des multimerisierten A β -reaktiven Antikörpers B07 und den Veränderungen der Glykane könnte ein geeigneter Antikörper gegen die Entstehung der AD eingesetzt werden.

6. Summary

Alzheimer's Disease is the most common neurodegenerative disease and characterized by neuronal degeneration, which leads to cognitive impairment. Due to yet unknown mechanisms misfolded Amyloid- β ($A\beta$) accumulates and deposits on neurons, followed by destabilization of neurons and pro-inflammatory processes within the brain. Until now, there is no effective treatment to prevent or to slow down Alzheimer's Disease progression. In this context, passive immunization trials come up to fore as most promising approaches. Pathological peptides are marked by antibodies and mediated to surrounding phagocytosing macrophages, which are represented by microglia in the CNS. However, clinical studies on passive immunization trials failed due to ineffective cognitive stabilization. In this context, the aim of the here presented study was a physiological approach of passive immunization using already existing naturally occurring autoantibodies (nAbs). NAbs detect autoantigens, such as misfolded $A\beta$ and mediate them to macrophages (nAbs- $A\beta$). Until now, they were enriched from commercially available intravenous immunoglobulins of class G (IVIg). However, their availability is restricted to blood donations. Therefore, we investigated on the recombinant production of nAbs- $A\beta$.

By the single isolation of $A\beta$ -reactive B1 cells from healthy donors, we were able to identify the antibodies' Ig-genes. Thereby, we could produce three recombinant human antibodies in IgG format as well as one antibody in an altered single chain (scFv-Fc) construct. Using different binding and functional assays we identified the altered B07 scFv-Fc antibody as most promising candidate for a passive immunization approach as it showed the most positive results in all used assays. Further investigation on the glycosylation pattern of the recombinant antibodies showed a possible deficiency of recombinant antibodies in general. The antibody's stability as well as the Fc-receptor mediated functions could massively be altered due to the specific glycosylation of the used HEK cells. For further immunization trials with recombinant antibodies the glycosylation pattern should be considered and potentially modified by specific "glyco-engineering".

However, as we used murine cell culture systems, the study is limited by the species barrier between human and mice. Therefore, the results could be influenced using murine cells, which could induce further immunological reactions.

In conclusion, by the enrichment of B1 cells from healthy blood donations four recombinant $A\beta$ -reactive antibodies were produced and tested. Thereby, the multimeric B07 scFv-Fc antibody expressed the most positive outcome in comparison to nAbs- $A\beta$ and could be investigated in

further passive immunization approaches to slow down the progression of Alzheimer's Disease or even prevent its occurrence. By the application of the potential antibody as early as possible A β molecules could be led to phagocytosis before they deposit and get pathological. As the multimerized B07 antibody showed reactivity against monomeric as well as oligomeric A β both aggregation states could be phagocytized. In addition, due to its multimerization the B07 showed a higher avidity and thereby reflects a more efficient A β clearance. However, a general disadvantage of passive immunization is the half-life of antibodies, which make applications at regular intervals necessary to be effective. By the change of the glycosylation pattern the antibody stability could be increased, whereby the antibody would be longer available. Thus, the used antibody concentration could be decreased and side-effects, such as edema, will decrease as well. Nevertheless, it is not clarified if the antibodies enter the brain to bind A β or the mechanism function in the periphery.

By the combination of the multimerized A β -reactive antibody B07 and the modifications of the glycans a potential antibody could be used against AD.

7. Anhang

Verzeichnis aller Hochschullehrer/innen

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren der Philipps-Universität Marburg:

Bachelor und Master Studium, Philipps-Universität Marburg

Beck, Lothar	Jansen, Andreas
Brandis-Heep, Astrid	Kendzior, Bernd
Brandl, Roland	Kost, Gerhard
Bremer, Erhard	Kostron, Barbara
Buttgereit, Detlev	Kraft, Martin
Dempfle, Astrid	Maier, Uwe
Dodel, Richard	Matthies, Diethart
Feuser, Beate	Mösch Hans-Ulrich
Galland, Paul	Oliver, Dominik
Greene, Brandon	Schwarting, Rainer
Hänze, Jörg	Søgaard-Andersen, Lotte
Hassel, Monika	Weber, Hans Christian
Heider, Johann	Weihe, Eberhard
Homberg, Uwe	

Danksagung

Die Promotion ist nicht einfach eine Abhandlung über Experimente, es ist vielmehr eine lange Zeit der Toleranzentwicklung und Ausdehnung der Frustrationsgrenzen.

Es ist für mich unerlässlich mich bei den Menschen zu bedanken, die dafür gesorgt haben, dass ich diese Grenzen nie erreicht habe - auch wenn ich oft dachte sie schon passiert zu haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn **Prof. Richard Dodel**. Ich danke Ihnen für Ihre Unterstützung, sowohl bei der Entstehung dieser Arbeit als auch bei weiteren Meilensteinen meiner Karriere. Ich danke Ihnen, dass Sie mir ein so spannendes, aber auch wichtiges Thema für die Promotion anvertraut haben und mich stets dabei gefördert haben, mir große Ziele zu stecken. Weiter möchte ich **Dr. Sascha Neumann** danken, dafür dass du in Zeiten des Umbruchs an unserer Seite warst und uns stets mit Ruhe und Wissen geholfen hast. Die gemeinsame Zeit war nur sehr kurz, aber dafür haben wir viel gelernt. Ich danke **Natascha & Yannick** für wunderbare Jahre, in denen wir, nicht nur umzugsbedingt, freundschaftlich zusammengewachsen sind. Ich danke euch, dass wir diese Reise gemeinsam bestritten haben, sowohl mit vielen Lachern als auch immer mit viel Hilfe und Verständnis. Danke, dass wir immer über alles diskutieren und uns gegenseitig helfen konnten. Ihr werdet mir in meiner beruflichen Zukunft oft fehlen, dafür aber hoffentlich privat weiterhin erhalten bleiben. **Susanne, Tine, Rosi, Kerstin, Michael & Jotti**: Ihr habt die Labore in Marburg vereint und zu einem wunderbar angenehmen Arbeitsplatz gemacht. Allseits mit guter Laune und helfender Hand habt ihr uns den Weg zu Beginn der Arbeit aufgehellert und geebnet. Bei **Tamar, Gavin, Marc & Marc** möchte ich mich herzlich für die Hilfe an diversen Geräten & den damit verbundenen Problemen danken. Ein riesen Danke an **Hendrik**, für die Unterstützung bzgl. der Statistik. Ohne euch alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. **Dr. André Frenzel & Dr. Philipp Kuhn** von Yumab GmbH gilt mein besonderer Dank für Ihre geduldige Unterstützung bei der Thematik rund um PCR und Antikörper. Ich danke meinen **Eltern & Geschwistern**, dass ihr mich zu diesem Menschen gemacht habt, der heute diese Arbeit angefertigt hat. Ich bedanke mich für all die Jahre des gegenseitigen Ansporns, des Zuhörens und des Mut Zusprechens.

An letzter Stelle aber nicht weniger wichtig danke ich dir **Florian** für deine unermüdliche Unterstützung & dein Verständnis; dafür, dass du mir immer ein Ruhepol bist & für noch so viel mehr in meinem Leben.

- Danke -

Publikationen

Weitere Original-Publikationen

Albus A, Kronimus Y, Burg-Roderfeld M, Neumann S, van der Wurp H, Willbold D, Ziehm T, LRRK2 Consortium, Dodel R. Avidity of Autoreactive Alpha-Synuclein Antibodies in LRRK2 Mutation Carriers is not Altered Compared to Healthy Controls or PD Patients. (submittiert)

Kronimus Y, **Albus A**, Hasenberg M, Walkenfort B, Seifert M, Budeus B, Gronewold J, Hermann DM, Lochnit G, Galuska SP, Marcus K, Sitek B, Mengel D, Neumann S, Dodel R. Fc N-glycosylation of autoreactive A β antibodies as blood-based biomarker for Alzheimer's disease. (submittiert)

Albus A; Gold M; Bach J-P; Burg-Roderfeld M; Jördens M; Kirchhein Y; Kronimus Y; Mengel D; Zerr I; Dodel R (2018). Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid, Prion Protein and α -Synuclein. *PLoS ONE*. 8. 13. e0202954.

Kronimus Y; **Albus A**; Balzer-Geldsetzer M; Straub S; Semler E; Otto M; Klotsche J; Dodel R; Mengel D (2016). Naturally Occurring Autoantibodies against Tau Protein Are Reduced in Parkinson's Disease Dementia. *PLoS ONE*. 11. 11. e0164953.

Wilke BU; Lindner M; Greifenberg L; **Albus A**; Kronimus Y; Bünemann M; Leitner MG; Oliver D (2014). Diacylglycerol mediates regulation of TASK potassium channels by Gq-coupled receptors. *Nat Commun*. 5. 5540.

Übersichtsartikel

Albus A, Dodel R. The human B1 cell subtype and its released autoantibodies. (in Fertigstellung)

Knecht L, Folke J, Dodel R, **Albus A**. Alpha-Synuclein immunization strategies for synucleinopathies in clinical studies: a biological perspective. (in Fertigstellung)

Kongressbeiträge

Albus A, Kronimus Y, Neumann S, Vidovic N, Frenzel A, Kuhn P, Dodel R. „Autoantikörper gegen die Alzheimer-Erkrankung – eine Immunisierungsstrategie mittels rekombinanter nAbs“ Poster auf dem 18. Tag der Forschung (November 2019), Essen, Deutschland.

Albus A, Kronimus Y, Neumann S, Vidovic N, Frenzel A, Kuhn P, Dodel R. „How autoantibodies could prevent Alzheimer's disease – an approach of encoding and testing recombinant nAbs“ Poster Präsentation auf dem: 2nd Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases (November 2019), Düsseldorf, Deutschland.

Albus A, Jördens M, Möller M, Neumann S, Dodel R. „Alzheimer's Disease and naturally occurring autoantibodies – passive immunization against neurodegeneration“, Poster Präsentation auf dem 11th International Autoimmunity Congress (Mai 2018), Lissabon, Portugal.

Albus A, Joerdens M, Moeller M, Dodel R. „Generation of monoclonal autoantibodies for immunization in patients with Alzheimer’s and Parkinson’s Disease“ Poster Präsentation auf dem 10th International Autoimmunity Congress (April 2016), Leipzig, Deutschland.

Albus A, Roettger Y, Stei S, Dodel R, Zerr I. „Naturally occurring autoantibodies against Prion Protein are not reduced in the serum of Creutzfeldt-Jakob patients“ Poster Präsentation auf dem KNDD Statuskolloquium (Dezember 2015), Bonn, Deutschland.

Albus A, Gold M, Burg-Roderfeld M, Kronimus Y, Mengel D, Roettger Y, Dodel R. „Aggregation of α -Synuclein, β -Amyloid and Prion Protein leads to a common structural epitope for naturally occurring autoantibodies.“ Poster Präsentation auf dem: 1st Düsseldorf-Jülich Symposium on Neurodegenerative Diseases (Oktober 2015), Düsseldorf, Deutschland.

Albus A, Burg-Roderfeld M, Bach JP, Roettger Y, Dodel R, Gold M. „Characterization of the epitope specificity of naturally occurring autoantibodies against α -Synuclein, β -Amyloid and Prion Protein.“ Poster Präsentation auf dem: 18th International Congress of Parkinson’s Disease and Movement Disorders (Juni 2014) Stockholm, Schweden.



Encoding the Sequence of Specific Autoantibodies Against beta-Amyloid and alpha-Synuclein in Neurodegenerative Diseases

Alexandra Albus^{1,2†}, Marit Jördens^{2†}, Moritz Möller² and Richard Dodel^{1,2*}

¹ Chair of Geriatric Medicine, University Hospital Essen, University Duisburg-Essen, Essen, Germany, ² Department of Neurology, Philipps-University, Marburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Pedro A. Reche,
Complutense University of
Madrid, Spain

Reviewed by:

Jürgen Winkler,
University of Erlangen
Nuremberg, Germany
Seong An,
Gachon University, South Korea
Andrei Surguchov,
University of Kansas Medical Center,
United States

*Correspondence:

Richard Dodel
Richard.Dodel@uk-essen.de

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Vaccines and Molecular Therapeutics,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 01 March 2019

Accepted: 12 August 2019

Published: 27 August 2019

Citation:

Albus A, Jördens M, Möller M and
Dodel R (2019) Encoding the
Sequence of Specific Autoantibodies
Against beta-Amyloid and
alpha-Synuclein in Neurodegenerative
Diseases. *Front. Immunol.* 10:2033.
doi: 10.3389/fimmu.2019.02033

There is no effective disease-modifying therapy for Alzheimer's or Parkinson's disease. As pathological hallmarks, the specific peptide amyloid- β and the specific protein α -Synuclein aggregate and deposit in and destabilize neurons, which lead to their degeneration. Within the context of a potential immunization strategy for these diseases, naturally occurring autoantibodies could play a crucial role in treatment due to their ability to inhibit peptide/protein aggregation and mediate their phagocytosis. We developed a procedure to extract the genetic information of such amyloid- β - and α -Synuclein-specific naturally occurring autoantibodies for future passive immunization strategies. We performed FACS-based single-cell sorting on whole blood donated from healthy individuals and performed single-cell RT-PCR analysis to amplify the coding sequences of antigen-binding regions of each antibody-secreting B1 cell. Sequences were further analyzed to determine CDR sequences and germline expression. Therefore, only low percentages of B1 cells obtained were amyloid- β^+ / α -Synuclein $^+$. After cell sorting, the variable regions of full IgGs were sequenced, demonstrating preferred usage of IGHV3 and IGKV1. The study we present herein describes an approaching for extracting and amplifying the sequence information of autoantibodies based on single-cell analysis of donated blood and producing a recombinant antibody pool for potential passive immunization against neurodegenerative diseases. We sorted a small pool of CD20 $^+$ CD27 $^+$ CD43 $^+$ CD69 $^-$ IgG $^+$ and A β^+ / α -Syn $^+$ B cells.

Keywords: B1 cell, naturally occurring autoantibodies, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, single-cell RT-PCR, passive immunization strategy

INTRODUCTION

Naturally occurring autoantibodies (nAbs) form a special group of immunoglobulins that are directed against self-components and form a part of the innate immune system. They are secreted by B1 cells, a distinctive subpopulation of B cells, and are generated early in development in the fetal liver (1). nAbs assume a special position among the pool of all antibodies because they are found in the sera of individuals even if there is no verifiable, previous contact with antigens or T cell participation (2, 3). Although they are established early in life, their maintenance in adults is enabled by self-replenishment (4, 5).

Recently, we and other groups identified nAbs that may play an important role in neuroprotection (6, 7). The two most frequent neurodegenerative diseases, Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) disease, are characterized by misfolding, aggregation, and intra- or extracellular deposition of certain peptides and proteins (8). During AD progression, amyloid- β (A β) primarily deposits within the hippocampus (9). In the case of PD, intraneural deposits of proteins including α -Synuclein (α -Syn) as the main component are formed (10–12). Therefore, modifying the turnover of both peptide and protein by, for example, antibodies represent a promising approach for future therapies. The neuroprotective function of nAbs has been demonstrated by *in vitro* as well as in *in vivo* experiments. nAbs against A β (nAbs-A β) or α -Syn (nAbs- α -Syn) inhibit peptide/protein fibrillation and exhibit a rescue effect on microglial uptake (6, 13). Moreover, nAbs-A β application reduces A β toxicity and leads to an improvement in cognition in AD models (14). Furthermore, nAbs might exert a protective function because nAbs-A β titers are lower in AD patients than in age-matched controls (15, 16).

For clinical applications, two possibilities are conceivable. The first involves purification of nAbs from commercially available intravenous class G immunoglobulins (IVIg), which is already being used for a variety of neurological diseases, such as myasthenia gravis and multiple sclerosis (17, 18). However, IVIg is a limited and expensive resource, as its preparation is dependent on blood donations (19). A second possibility is recombinant production.

Based on the protective mechanisms of nAbs, we sought to develop a method for recombinant production of such antibodies for future therapeutic approaches because all of the previously conducted clinical trials have been unsuccessful and terminated. Surprisingly, clinical trials applying monoclonal antibodies against A β did not improve symptoms, potentially due to epitope specificity (20). Although a passive immunization approach for PD has been successfully tested in mice, no clinical trial with humans has been conducted (21).

To date, recombinant production of nAbs has not been reported. Seigny et al. used an undefined pool of A β -recognizing memory B cells to isolate binding antibodies, similar to the experiments of Pascual et al., who performed comparable approaches for hyperphosphorylated tau (22, 23). Here, we extend this approach by focusing on A β / α -Syn-nAbs-producing B1 cell subpopulations and unraveling their genetic distinction.

METHODS

Peptides

FITC-labeled A β (Bachem) was aggregated into amyloid-derived diffusible ligands (ADDLs) according to the protocol of Freir et al. (24). α -Syn (rPeptide) was used in monomeric form. Both were stored at -80°C until used in experiments. For verification experiments A β (Bachem) was additionally used in monomeric or oligomeric form. For monomers A β was dissolved in PBS to 1 mg/ml and stored at -80°C . For oligomers PBS dissolved A β with 1 mg/ml was incubated at 37°C for 24 h with constant agitation and then stored at -80°C .

Fluorescein-Labeling of α -Syn

α -Syn was diluted to 20 mg/ml in PBS. The solution obtained was labeled according to the manufacturer's protocol with the Lightning-Link[®]-Fluorescein labeling kit (Innova Bioscience). Briefly, 1 μl of the included LL-modifier was mixed with the protein. This mixture was then resuspended with lyophilized Lightning-Link[®]. According to the manufacturer, 100% of the protein was FITC labeled. FITC-labeled α -Syn was stored at -20°C for a short time or at -80°C for longer storage.

Blood Samples and Donors

The study was approved by the Ethics Committee of the Philipps-University Marburg (no: 172/15) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (25). Ten healthy donors between 20 and 30 years of age were included. After providing written informed consent, blood samples were collected by standard peripheral vein-puncture into 9-ml EDTA S-monovettes (Sarstedt AG & Co.) and processed instantly.

Isolation of PBMCs

Initially, 20 ml venous EDTA blood was diluted with 20 ml PBS. In a new tube, 10 ml of Biocoll[®] (Merck KGaA) was gently overlaid with the blood dilution without mixing the two phases. This preparation was centrifuged at 1,500 rpm for 30 min at 20°C without braking. The PBMC fraction, which was turbid and layered below the top fraction, was carefully transferred into a new 50-ml tube, washed twice with 40 ml PBS supplemented with 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich[®] Corporation), and again centrifuged at 1,500 rpm for 20 min at 20°C with braking. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in FACS buffer [PBS + 0.4 % fetal calf serum (FCS)].

B Cell Enrichment

The obtained suspension of PBMCs contained lymphocytes, natural killer cells, macrophages, and monocytes. To separate B lymphocytes from the other PBMCs, the EasySep[™] human B cell enrichment kit without CD43 depletion (STEMCELL Technologies Inc.) was used at room temperature following the manufacturer's instructions. The advantage of this negative selection method was that the desired B1 cells remained untouched during the process and thus were not activated.

Staining and Fluorophores

The enriched B cells were washed by centrifugation twice with FACS buffer for 5 min at 4°C and 1,200 rpm; the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 300 μl FACS buffer. Afterwards, the concentration of B cells was determined using a Neubauer counting chamber (Brand GmbH & Co. KG). Next, the cell suspension was split into different FACS tubes (Sarstedt) on ice and centrifuged at 1,200 rpm and 4°C for 5 min. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 200 μl PBS with 10 % FCS. This suspension of purified B cells was incubated on ice and in the dark for 20 min with 300 nM A β -FITC or α -Syn-FITC to select cells expressing antibodies directed against A β or α -Syn on their cell surface. Afterwards, the cells were washed for 5 min at 1,200 rpm and 4°C .

For the next step, the cells were stained for 30 min on ice and in the dark with antibodies against a selection of CD markers that are expressed on viable B1 cells. To differentiate B1 cells from the other cells in the suspension, antibodies against CD20, CD27, CD43, CD69, and IgG were used (26). Distinct CD markers can be distinguished based on antibodies with individual fluorophores. All fluorophore-coupled CD markers and the IgG marker were purchased from BD Biosciences.

Single-Cell Sorting

B1 cells (CD20⁺, CD27⁺, CD43⁺, and CD69⁻) presenting IgG⁺ B cell receptors against A β / α -Syn on their surface were detected using the cell sorter MoFlo Astrios (Beckman Coulter). Sorting was carried out in round-bottom 96-well PCR plates without a skirt (Sarstedt) containing 4 μ l/well of sorting buffer (0.5-fold PBS containing 10 mM DTT (Invitrogen), 8 U RNasin (Promega), and 0.4 U 5'-3' Stop RNase Inhibitor [5 Prime GmbH] (27)). After sorting, the plates were placed immediately on dry ice and stored at -80°C .

Single-Cell RT-PCR and Ig Gene Amplification

To determine the sequences of the antigen-binding domain of nAbs against A β / α -Syn, single-cell mRNA was isolated first, after which the mRNA was transcribed into cDNA by reverse transcription (RT) (26). A PCR-based amplification followed according to Tiller et al., with minor adjustments (27). The RT reaction for each cell was performed in a total volume of 16 μ l/well, consisting of nuclease-free water (Qiagen), 1 μ l of 0.1 M DTT (Invitrogen); 150 ng random hexamer primer [pd(N)6, GE Healthcare], 0.5 μ l dNTPs (25 mM each) (Thermo Scientific), 0.5% v/v Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich), 6 U 5 PrimeTM Stop RNase Inhibitor (Fisher Scientific), 4 U RNasin (Promega), RT-buffer (Invitrogen), and 50 U Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). This master mix was added to each well, and the plate was sealed with optically clear sealing tape (Sarstedt). RT was performed using a thermal cycler (MyCycler, Bio-Rad Laboratories) with the following steps: 42°C for 10 min, 25°C for 10 min, 50°C for 60 min, and 94°C for 5 min. At the end of the reaction, the plate was cooled to 4°C before storage at -20°C . As the nAbs are subtype G immunoglobulins, each consists of two heavy chains (IgH) as well as two light chains. These are interconnected via disulfide bridges; thereby the light chains are of kappa (Ig κ) or lambda (Ig λ) subtype. All the cells were checked for both light chains because an IgG always comprises two light chains of the same type. IgH, Ig κ , and Ig λ , as well as β -actin (positive control) gene transcripts, were amplified separately. Hence, the RT product was split into four equal parts for the subsequent PCR steps. All PCR reactions were performed in PCR tubes (Sapphire PCR 8-tube strips, 0.2 ml, Greiner Bio-One International GmbH) in a total volume of 40 μ l per tube. Each tube contained 3.5 μ l cDNA, nuclease-free water (Qiagen), 300 μ M dNTPs, 25 mM each (Thermo Scientific), 200 nM specific primer/primer-mix as listed in **Supplemental Table 1** (microSynth), Q-Solution (Qiagen), PCR-buffer (Qiagen), 1 mM MgCl (Qiagen), and 1.2 U HotStar Taq DNA Polymerase (Qiagen). For β -actin (positive control),

the primer concentration was adjusted to 400 nM. The PCR protocols were the same for IgH and Ig κ but were different for Ig λ and β -actin. The detailed protocols can be found as an additional file (see **Supplemental Table 1**) and were performed using a thermal cycler (PTC-200 thermal cycler, MJ Research Inc.). Secondary PCR was then carried out. The master mixes were mostly the same, only the primers were adjusted. The PCR protocols were also adjusted for the secondary primers, and cycles were reduced. Detailed protocols can be found in **Supplemental Table 2**.

Agarose Gel Analysis of PCR Products

1.5% Agarose (Biozym Scientific GmbH) gels were prepared in TBE buffer, and SYBR[®]-gold (Thermo Fisher Scientific) was added. The PCR samples were mixed with blue dye (PeqLab Biotechnologie GmbH) before loading, and a 100-base pair DNA ladder (Invitrogen) was used. Electrophoresis was performed for 90 min at 110 mV in TBE as a running buffer, and the PCR products were evaluated under UV light. The PCR products were purified after amplification (Gene Matrix PCR Clean up, roboklon GmbH) following the manufacturer's instructions.

Sequencing and Analysis

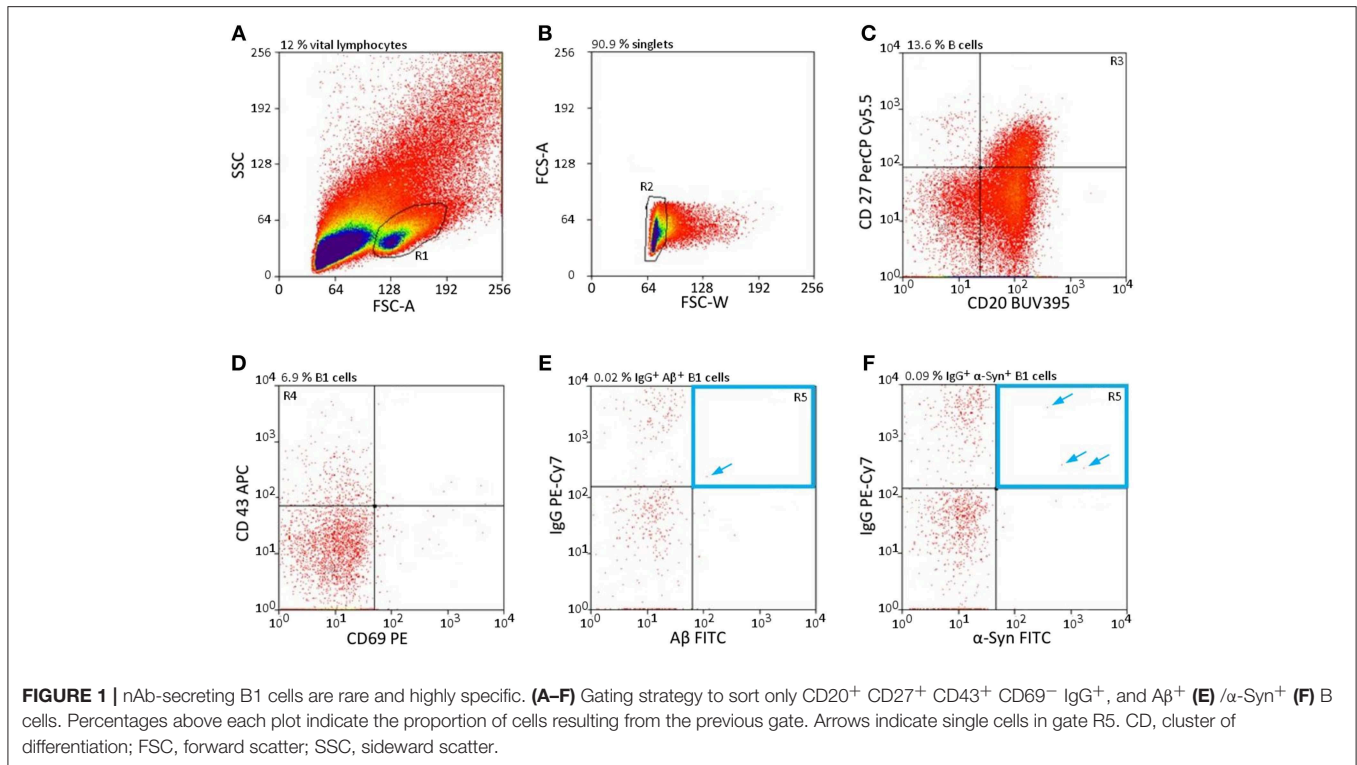
Sequencing was performed by SeqLab Sequence Laboratories GmbH. The sequences obtained were reviewed and compared to each other and checked by sequence analysis at vbase2.org (28). This website allows analysis of complementarity determining regions (CDRs), and several sequences can be compared with each other with regard to CDR similarity. This comparison of sequence patterns allows for determination of the antigen-binding domain of the antibody. Due to the patenting process, the sequences are not provided in the Results section.

Further Verification of Cloned Antibodies

Three antibody constructs were cloned successfully into IgG1 backbones and transfected into HEK293 cells by industrial provider (Yumab GmbH). One of these constructs was additionally cloned as single chain antibody scFv-Fc (Yumab GmbH). All antibodies were further collected from the cell culture supernatant and were purified using protein A.

A β ELISA

The recombinant antibodies were tested in their binding ability to monomeric and oligomeric A β as well as to ADDLs. 96-well round-bottom high-binding ELISA plates (Sarstedt) were coated with 5 μ g/ml peptide (in PBS) over night at 4°C . Next day, plates were washed three times with washing buffer (PBS + 0.05% Tween-20) using a plate washer (Amersham Biotrak II Plate Washer, GE Healthcare) and blocked with blocking buffer (Roti + 0.1% Tween-20; Roti-block, Roth; Tween-20, Applichem GmbH) for 1 h at 37°C . Next to the recombinant antibodies B06-IgG, B07-IgG, B07-scFvFc, and C06-IgG a commercially available IVIg preparation (10% octagam, Octapharma) was used; from this IVIg preparation nAbs-A β were purified (29). Samples were diluted in blocking buffer to a final concentration of 10 μ g/ml (except for B07-scFvFc and nAbs-A β with 1.25 μ g/ml due to high signal) and applied in duplets and incubated for 1 h at room



temperature using constant agitation. Plates were washed again three times with washing buffer and incubated with secondary antibody for 1 h at RT under constant agitation. As secondary antibody HRP-conjugated anti-human antibody (Calbiochem) was used in 1:2,000 in blocking buffer. Plates were washed for three times with washing buffer and incubated for 20 min with TMB (Merck). The reaction was stopped with sulfuric acid (5% H₂SO₄, Sigma-Aldrich). Signals were measured at 450 nm with a plate reader (Tecan Infinite M200), and the background signal was subtracted.

Statistical Analysis

If not stated otherwise, the results are presented as the mean \pm standard deviation. The IGV gene distribution is shown as percentages of all analyzed sequences.

RESULTS

Qualitative Selection of nAb-Secreting B1 Cells; nAb-Secreting B1 Cells Are a Small and Distinct Subtype Among B Cells

The cell gating was qualitatively assessed by FACS single-cell sorting. Approximately 30% of the leukocytes are lymphocytes; of those, 23% are allotted to B cells (30), which again can be divided into three subclasses: B1 cells, follicular B2 cells, and marginal zone B cells (3). As B1 cells are a subgroup of B cells, they are even rarer in the peripheral blood, especially those that secrete specific nAbs subclasses such as nAbs-A β and nAbs- α -Syn. To obtain specific sorting of these limited number of cells, a defined setting had to be chosen. **Figure 1** shows the selection criteria

to overcome the limitation of these low levels of lymphocytes (**Figure 1**). Only a small subpopulation ($0.0063 \pm 0.0042\%$ for A β , $0.0087 \pm 0.0014\%$ for α -Syn) of all vital lymphocytes was scored positively (**Figures 1E,F**).

To determine whether the newly established protocol for the isolation of nAb-A β / α -Syn-producing B1 cells provides reproducible results, replications were performed with blood samples from different individuals. The numbers of nAb-A β - or nAb- α -Syn-secreting B1 cells were rather stable among test replications (**Table 1**).

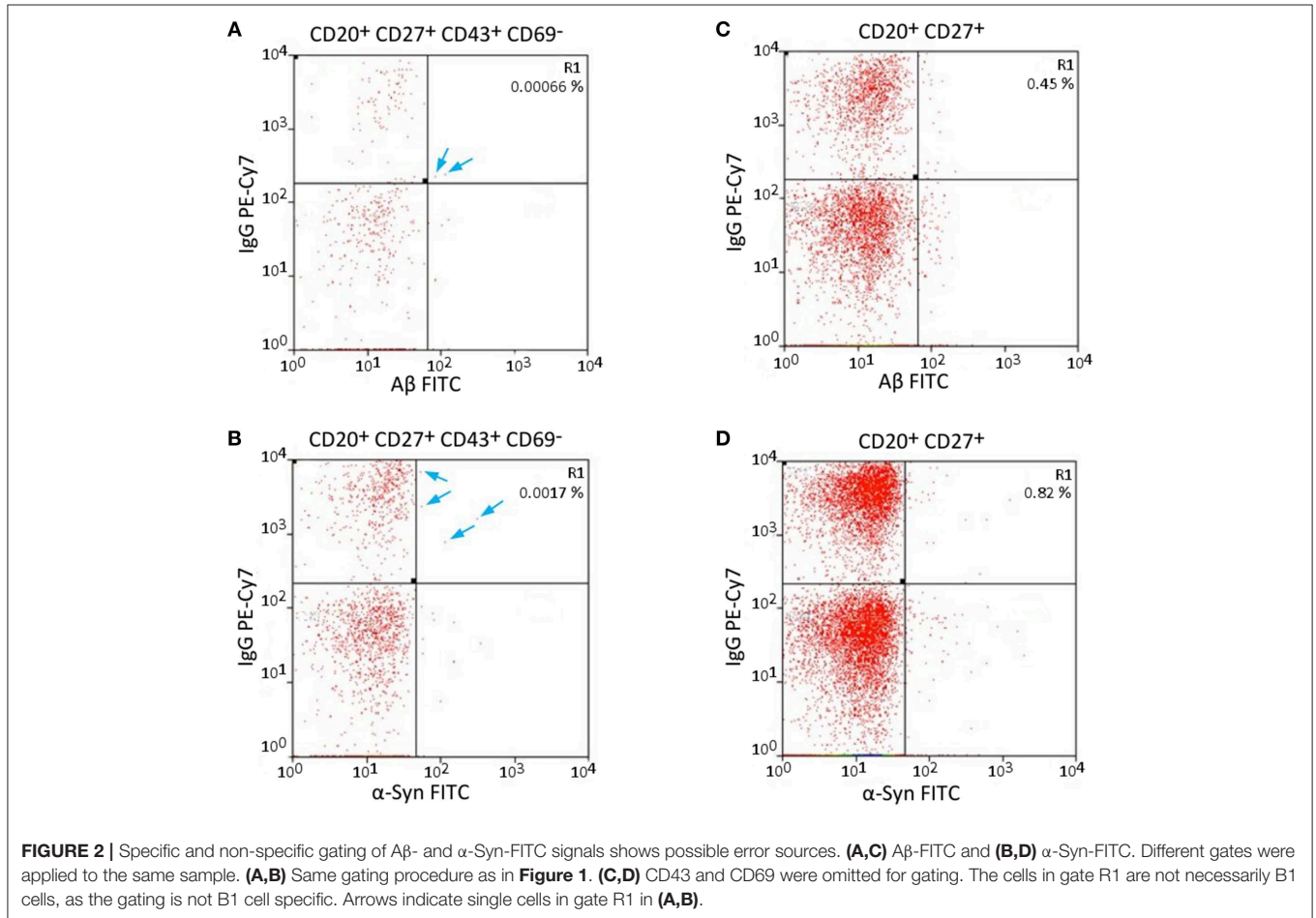
The blood of each donor was divided into two samples, which were examined separately by FACS. The respective mean of both measurements is shown in **Table 1**. The mean of all measurements was calculated, as well as the percentages of the categories of the entire B cell population. Over this, the percentages of B1 cell categories and the respective standard deviations were stated.

The specificity of A β / α -Syn binding can be validated by the results of FACS measurements. A β should only bind to nAb-A β -producing B1 cells and α -Syn only to nAb- α -Syn-producing B1 cells. Therefore, dot plots of the A β -FITC signal and the IgG-PE-CY7 signal/ α -Syn-FITC signal and the IgG-PE-CY7 signal should appear somewhat similar when the gating is changed. **Figure 2** depicts the comparison of the A β -FITC/ α -Syn-FITC signal with B1 cell-specific and non-specific gating. In **Figure 2A** (A β) and **Figure 2B** (α -Syn), the gating procedure was performed as shown in **Figure 1**, whereas in **Figure 2C** (A β) and **Figure 2D** (α -Syn), only the non-specific gates R1, R2, and R3 (**Figures 1A–C**) were applied. If the binding is specific, the cell numbers in gate R1 of **Figure 2** should remain constant. However, gate R1 in **Figure 2A**

TABLE 1 | Percentages of A β ⁺/ α -Syn⁺ and IgG⁺ B1 cells demonstrate their limited appearance.

	B cells	B1 cells	IgG ⁺ B1 cells	A β ⁺ and IgG ⁺ B1 cells	α -Syn ⁺ and IgG ⁺ B1 cells
Mean percentage from the B cell-population	100%	1.69%	0.29%	0.0063%	0.0087%
		(\pm 0.6%)	(\pm 0.11%)	(\pm 0.0042%)	(\pm 0.0014%)
Mean percentage from the B1 cell-population		100%	17.04%	0.37%	0.51%
			(\pm 6.73%)	(\pm 0.22%)	(\pm 0.082%)

Fractions of A β ⁺/ α -Syn⁺ B1 cells were calculated on the basis of 10 measurements. Means \pm SDs are shown.



contained two cells for A β and in **Figure 2B** 4 cells for α -Syn, and gate R1 in **Figure 2B** contained 19 cells and in **Figure 2D** 34 cells. Accordingly, the number of cells in gate R1 was 9.5 (A β)/5.7 (α -Syn) times higher in the case of B1 cell-non-specific gating (CD43 and CD69 markers were omitted). However, if the binding of A β / α -Syn to the cells is completely non-specific, the cell number in gate R1 of **Figures 2B,D** should be \sim 70 (A β)/50 (α -Syn) times higher, as B1 cells account for 1.69% of the entire B cell population (**Table 1**). This result indicates that the binding of A β / α -Syn to the cells originates from specific interactions with the B cell receptor on the surface of nAb-A β / α -Syn-producing B1 cells.

RT-PCR

Each sorted nAb belongs to the IgG type and consists of two heavy chains (IgH) and two light chains of the same subtype (Ig κ or Ig λ) (31). The success of the described single-cell sorting and RT-PCR approach was visualized by agarose gel electrophoresis. Ideally, one clear band for an antibody heavy chain and one band for one type of light chain would be detected. In addition, β -actin was used as a positive control to demonstrate the overall presence of cDNA in the samples (**Figure 3**). Distinct PCR master mixes were checked for impurities by performing negative controls (with nuclease free water) in each PCR series.

Phylogenetic Analysis of Heavy and Light Chains

After purification of the PCR products and sequence analysis, germline expression of variable heavy (IGHV) and light (IGKV/IGLV) chains was determined (Figure 4). Depending on the type of primer used, one could determine to which of the five IGHV families the IGHV of interest belonged (see Supplemental Table 1). Such comparison revealed a preferred usage of IGHV3 for the heavy chain for both A β (85%) and α -Syn (67%) antibodies. In the case of light chains, the kappa chain (IGKV) belongs to one of four different IGKV families,

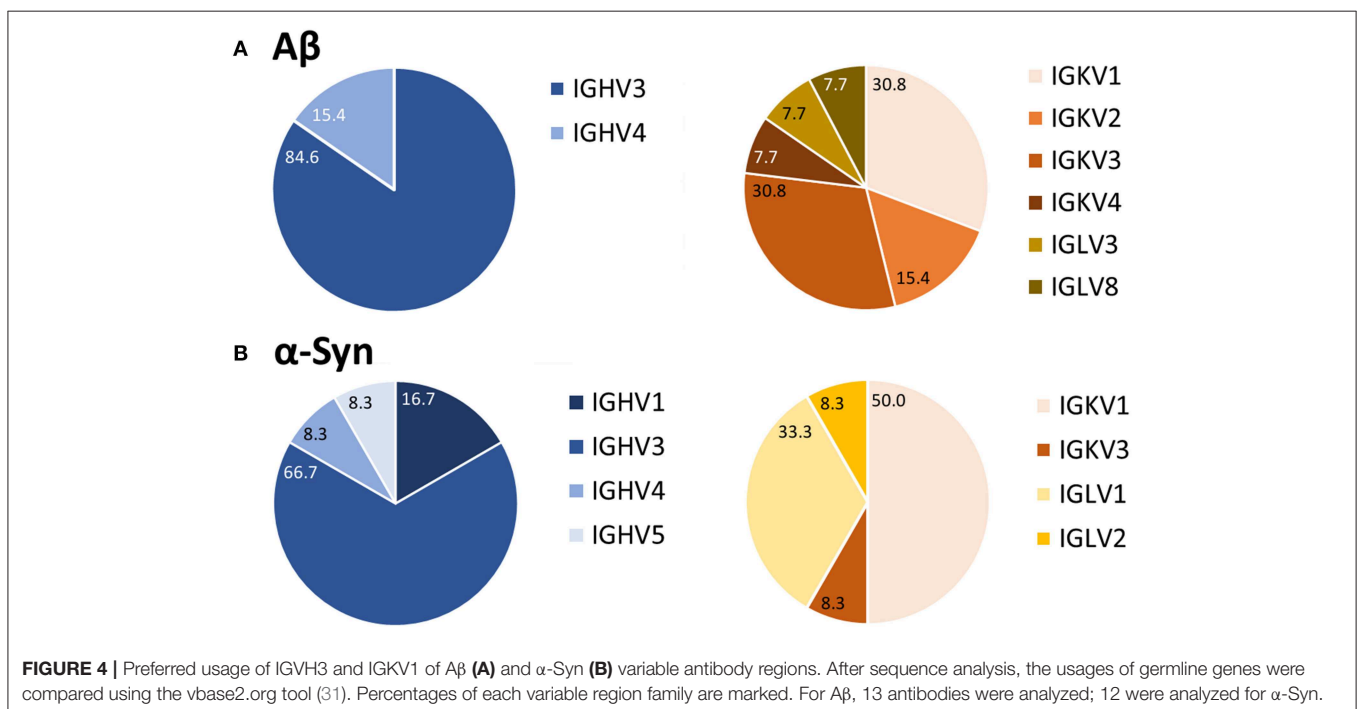
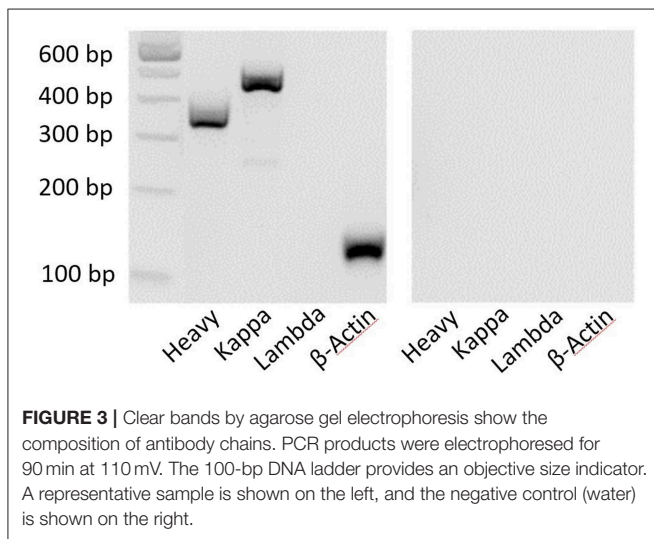
and the lambda chain (IGLV) belongs to one of eight different IGLV families (see Supplemental Table 1). IGKV1, a kappa chain subtype, appeared to be preferred for A β and α -Syn (A β 31%, α -Syn 50%). However, other germline usages of light chains differed for the A β and α -Syn antibody sequences.

Verification of Binding

To verify the successful sequencing and cloning, each antibody had to be checked for antigen-specific binding. The antigen-binding of first cloned antibodies against A β was tested using ELISA. Next to monomeric A β aggregated A β and ADDLs were tested (Figure 5). All cloned antibodies (B06, B07, and C06) showed a distinct and specific binding to monomeric A β . The single chain construct antibody B07 scFv-Fc had such a strong binding in comparison to the others that it was further diluted (1.25 μ g/ml instead of 10 μ g/ml). IVIg (as 10 μ g/ml) and nAbs-A β (as 1.25 μ g/ml) were used as references. Results were set in relation to the IVIg signal on monomers. The binding to aggregated A β and ADDLs was small for all antibodies.

DISCUSSION

In this study we provide a feasible and valid method to obtaining the coding sequences of nAbs. The development of recombinant antibodies requires several checkpoints due to many possible causes of failure. In the first step, a gating panel for isolating distinct B-lymphocytes must be selected. In our setting, we used an already-established gating panel for B1 cells consisting of CD20⁺, CD27⁺, CD43⁺, CD69⁻, and IgG⁺ (32). However, factors defining B1 cells are still under debate (32–35). For example, Griffin et al. termed B1 cells according to the CD



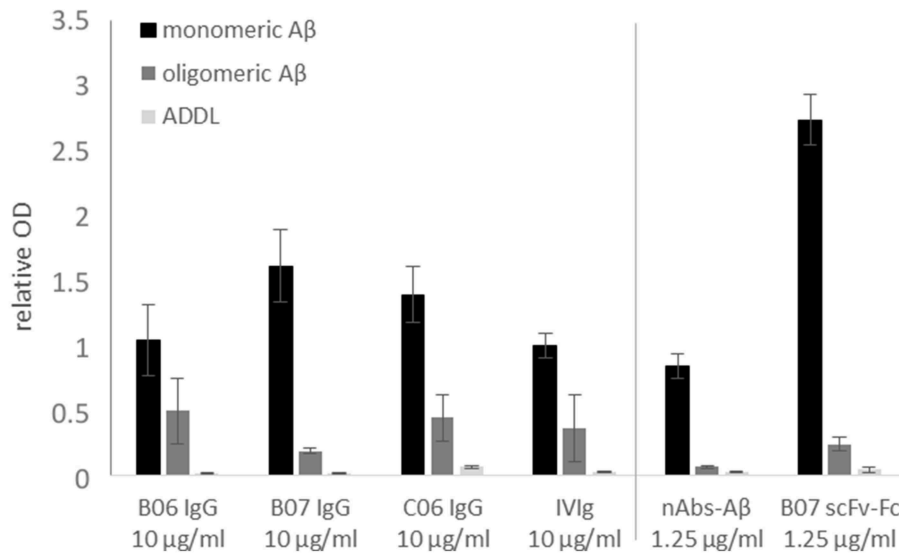


FIGURE 5 | Binding verification of cloned antibodies by ELISA. Monomeric or oligomeric A β as well as ADDLs were coated with 5 μ g/ml onto the surface of an ELISA plate. Antibodies were applied with 10 or 1.25 μ g/ml (nAbs-A β and B07 scFv-Fc) and visualized by HRP-conjugated secondary anti-human antibody. The data were normalized to IVIg binding on monomeric A β . Mean values \pm SD of three independent experiments are shown. B06 IgG, B07 IgG, C06 IgG, and B07 scFv-Fc mentioned different antibody clones.

marker panel, others have hypothesized that these cells are more likely to be plasmablasts or mischaracterized due to T cell doublets. Thus, the proposed markers are not sufficient for characterization. Descatoire et al. (33) and Perez-Andres et al. (34) reported some challenges to excluding false-positive cells, such as doublet gating and pre-enrichment of CD19⁺ cells. In our study, we circumvented this issue by performing pre-enrichment of B cells by removing macrophages, monocytes, T cells, and natural killer cells with a B cell enrichment kit. Furthermore, we excluded B:T doublets by our gating scheme, similar to Griffin et al. (Figure 1B). Any remaining activated T cells were excluded by negative CD69 gating (Figure 1D). In addition, we recorded CD20⁺, CD27⁺ and CD43⁺ cells as a small subset of total B cells, as noted by Descatoire et al. (33). Therefore, we applied the B1 cell gating scheme from Griffin et al., and we agree that experiments with B1 cells require accurate exclusion of non-target cells. Nonetheless, we performed no additional live/dead staining to exclude dead cells from the analysis due to the wide range of fluorophores used, though we did exclude most dead cells by the first SSC-FSC gating. In prior HOECHST experiments, we were able to exclude the majority of dead cells (Supplemental Figure 1). As possible non-specific FITC signal was intensively investigated in preliminary experiments, we used different percentages of FCS and albumin to block non-specific binding (Supplemental Figure 2), with 10% FCS showing the best results. Although additional experiments with unlabeled peptide/protein blocking were missing and represent a limitation of this study specific binding of cloned antibodies demonstrate a distinct interaction with the peptide/protein. To verify successful sorting and PCR amplification of A β ⁺ and α -Syn⁺ B1 cells, the variable regions of the analyzed antibodies were

transfected into IgG1 constructs and several of the antibodies were cloned. Therefore, first binding assays were performed to test the successful sorting, amplification and cloning of the antibodies against A β . The four different antibodies showed different binding intensities to the different A β conformation states (Figure 5). Thereby, the single chain construct B07 scFv-Fc bound strongest to A β . The other cloned antibodies showed stronger bindings compared to IVIg and therefore demonstrated a successful verification of prior assays. However, ELISA results showed higher SD in A β oligo binding (Figure 5). Due to oligomer preparation it is difficult to enable exactly the same aggregation state. Thus, each ELISA could be coated with different oligomeric peptide, which leads to differences in the available paratopes for the antibodies. The ADDL binding was nearly undetectable. Although we used ADDL for the antibody sorting the verification of the ADDL binding was not successful. Nevertheless, the investigated recombinant antibodies bind to monomeric A β and in a decreased pattern to oligomeric A β in ELISA studies.

Regarding the gating scheme for B1 cells during FACS experiments, the use of the appropriate A β preparation is a highly discussed topic. As it is known that nAbs-A β preferably bind to oligomeric forms of A β (36), we used ADDLs for A β ⁺ B1 cell sorting. Because of the complicated binding method used to maintain the oligomeric state, the protocol of Freir et al. resulted in a highly robust conformation of A β oligomers (24). We used the protocol for these stable oligomeric ADDL forms based on this binding characteristic, which we could reproduce in our setting with FITC-labeled A β (Supplemental Figure 3).

The findings of this study are consistent with those of Pascual et al. (22). As already shown in their study about naturally

anti-Tau antibodies the usage of IGHV3 family seemed to be higher for autoantigen reactive antibodies (21). With 35% for naïve B cells the general usage of IGHV family is distributed more equally (37). The B1 cells, which were investigated in this study, have the same origin as other B1 cell derived antibodies. Thereby, this could indicate a common origin of all naturally occurring autoantibodies. Further, the usage of IGKV seems to be preferred for B1 cell derived autoantibodies (21), although we also identified IGLV usage for our analyzed antibodies. In comparison, the general ratio between kappa and lambda chain occurrence amounts to 60:40 (38). These findings may indicate a common origin of all naturally occurring autoantibodies.

CONCLUSION

In conclusion, we present a workflow to identify the coding sequences of antibodies using naturally occurring autoantibodies as an example. The identified antibody sequences will be examined for potential posttranslational modifications to verify the ability to form a functional antibody for testing *in vitro* and *in vivo*. This approach will lead to the generation of monoclonal antibodies based on naturally occurring autoantibodies, which can be used for a passive immunization strategy. Furthermore, this approach is possibly transferable to other autoimmune diseases, which to date are treated with IVIg. Thereby, their treatment might be independent of IVIg preparations (17, 18).

DATA AVAILABILITY

The datasets for this manuscript are not publicly available because they are confidential. However, the datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request. Requests to access the datasets should be directed to Richard.Dodel@uk-essen.de.

ETHICS STATEMENT

This study was carried out in accordance with the recommendations of the Ethics Committee of the Philipps-University Marburg with written informed consent from all subjects. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki. The protocol was

approved by the Ethics Committee of the Philipps-University Marburg (no: 172/15).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AA and RD conceptualized and designed the study. AA, MJ, and MM performed the experiments and analyzed the data. AA and MJ drafted the initial manuscript. AA, MJ, MM, and RD reviewed and revised the manuscript. All authors approved the final manuscript as submitted and agreed to be accountable for all aspects of the work.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gavin Giel (Department of Hematology, Philipps-University, Marburg, Germany) for his technical support at the MoFlo Astrios, Michael Pütz, and Susanne Stei (both Department of Neurology, Philipps-University, Marburg, Germany) for their support during PCR establishment, Yumab GmbH (Braunschweig, Germany) for the support during sequence analysis and cloning of antibodies and Yannick Kronimus and Sascha Neumann (Chair of Geriatric Medicine, University Duisburg-Essen, Germany) for critical reading of the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2019.02033/full#supplementary-material>

Supplemental Figure 1 | HOECHST staining of lymphocytes (A) and other components (B). (A) HOECHST staining was negative for 99.24% of gated lymphocytes (indicated by a blue arrow). (B) Focusing on more abundant components, only 7.32% of cells show HOECHST negative staining.

Supplemental Figure 2 | Different approaches to block non-specific A β binding. During A β -FITC staining of B cells, different blocking agents were tested. Next, 1% albumin, 0.4% FCS, and 10% FCS were used as blocking solutions.

Supplemental Figure 3 | Large A β -oligomers formed by the Freir protocol (23) shown by size exclusion chromatography. The first peak shows molecules of ~82 kDa. Because the shape of the peak is asymmetric, it is likely that it represents A β oligomers of different sizes. The second peak shows molecules of ~9.7 kDa, which corresponds to the molecular weight of A β -dimers. The last peak represents the solvent PBS.

Supplemental Table 1 | Primer sets for each Ig chain PCR.

Supplemental Table 2 | PCR protocols.

REFERENCES

- Shoenfeld Y, Gershwin M, Meroni P. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science (2013).
- Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S. Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol*. (1995) 7:812–8.
- Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol*. (2008) 20:149–57. doi: 10.1016/j.coi.2008.03.014
- Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol*. (1993) 11:501–38. doi: 10.1146/annurev.iy.11.040193.002441
- Hardy RR, Hayakawa K. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol*. (1994) 55:297–339.
- Gold M, Mengel D, Roskam S, Dodel R, Bach J-P. Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against beta-amyloid on microglia. *J Neuroinflamm*. (2013) 10:5. doi: 10.1186/1742-2094-10-5
- Roettger Y, Zerr I, Dodel R, Bach J-P. Prion peptide uptake in microglial cells—the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein. *PLoS ONE*. (2013) 8:e67743. doi: 10.1371/journal.pone.0067743
- Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. *N Engl J Med*. (1999) 340:1970–80. doi: 10.1056/NEJM199906243402507
- Selkoe DJ. Cell biology of protein misfolding: the examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Cell Biol*. (2004) 6:1054–61. doi: 10.1038/ncb1104-1054

10. Lewy FH. *Paralysis Agitans: Pathologische Anatomie*. Berlin: Springer (Handbuch der Neurologie). (1912).
11. Devine MJ, Gwinn K, Singleton A, Hardy J. Parkinson's disease and alpha-synuclein expression. *Mov Disord*. (2011) 26:2160–8. doi: 10.1002/mds.23948
12. Emamzadeh FN, Surguchov A. Parkinson's disease: biomarkers, treatment, and risk factors. *Front Neurosci*. (2018) 12:612. doi: 10.3389/fnins.2018.00612
13. Albus A, Gold M, Bach J-P, Burg-Roderfeld M, Jördens M, Kirchheim Y, et al. Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid, Prion Protein and α -Synuclein. *PLoS ONE*. (2018) 13:e0202954. doi: 10.1371/journal.pone.0202954
14. Mengel D, Roskam S, Neff F, Balakrishnan K, Deuster O, Gold M, et al. Naturally occurring autoantibodies interfere with beta-amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*. (2013) 3:e236. doi: 10.1038/tp.2012.151
15. Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, et al. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology*. (2001) 57:801–5. doi: 10.1212/wnl.57.5.801
16. Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol*. (2002) 37:943–8. doi: 10.1016/S0531-5565(02)00029-3
17. Gelfand EW. Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med*. (2012) 367:2015–25. doi: 10.1056/NEJMra1009433
18. Beaute J, Levy P, Millet V, Debre M, Dudoit Y, Le Mignot L, et al. Economic evaluation of immunoglobulin replacement in patients with primary antibody deficiencies. *Clin Exp Immunol*. (2010) 160:240–5. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.04079.x
19. Spath PJ, Lutz HU. Naturally occurring antibodies/autoantibodies in polyclonal immunoglobulin concentrates. *Adv Exp Med Biol*. (2012) 750:239–61. doi: 10.1007/978-1-4614-3461-0_18
20. Moreth J, Mavoungou C, Schindowski K. Passive anti-amyloid immunotherapy in Alzheimer's disease: what are the most promising targets? *Immun Ageing*. (2013) 10:18. doi: 10.1186/1742-4933-10-18
21. Masliah E, Rockenstein E, Mante M, Crews L, Spencer B, Adame A, et al. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS ONE*. (2011) 6:e19338. doi: 10.1371/journal.pone.0019338
22. Pascual G, Wadia JS, Zhu X, Keogh E, Kükrer B, van Ameijde J, et al. Immunological memory to hyperphosphorylated tau in asymptomatic individuals. *Acta Neuropathol*. (2017) 133:767–83. doi: 10.1007/s00401-017-1705-y
23. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. (2016) 537:50–6. doi: 10.1038/nature19323
24. Freir DB, Nicoll AJ, Klyubin I, Panico S, Mc Donald JM, Risse E, et al. Interaction between prion protein and toxic amyloid beta assemblies can be therapeutically targeted at multiple sites. *Nat Commun*. (2011) 2:336. doi: 10.1038/ncomms1341
25. Goodyear MD, Krleza-Jeric K, Lemmens T. The Declaration of Helsinki. *BMJ*. (2007) 335:624–5. doi: 10.1136/bmj.39339.610000.BE
26. Griffin DO, Rothstein TL. Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front Immunol*. (2012) 3:122. doi: 10.3389/fimmu.2012.00122
27. Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*. (2008) 329:112–24. doi: 10.1016/j.jim.2007.09.017
28. Retter I, Althaus HH, Münch R, Müller W. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucleic Acids Res*. (2005) 33:D671–4. doi: 10.1093/nar/gki088
29. Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O, Neff F, Andrei-Selmer L-C, et al. Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and *in vitro* models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. (2011) 31:5847–54. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4401-10.2011
30. Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP. Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. (2005) 140:289–92. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02767.x
31. Janeway C. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. Chapter 3. New York, NY: Garland Publ (2001). p. 732.
32. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med*. (2011) 208:67–80. doi: 10.1084/jem.20101499
33. Descatoire M, Weill J-C, Reynaud C-A, Weller S. A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med*. (2011) 208:2563–4. doi: 10.1084/jem.20112232
34. Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJ, Orfao A, van Zelm MC. The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med*. (2011) 208:2565–6. doi: 10.1084/jem.20112203
35. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells are CD3-: a reply to “A human equivalent of mouse B-1 cells?” and “The nature of circulating CD27+CD43+ B cells?”. *J Exp Med*. (2011) 208:2566–9. doi: 10.1084/jem.20111761
36. Roeder AM, Roettger Y, Stündel A, Dodel R, Geyer A. Synthetic dimeric A β (28–40) mimics the complex epitope of human anti-A β autoantibodies against toxic A β oligomers. *J Biol Chem*. (2013) 288:27638–45. doi: 10.1074/jbc.M113.463273
37. Glanville J, Zhai W, Berka J, Telman D, Huerta G, Mehta GR, et al. Precise determination of the diversity of a combinatorial antibody library gives insight into the human immunoglobulin repertoire. *Proc Natl Acad Sci USA*. (2009) 106:20216–21. doi: 10.1073/pnas.0909775106
38. Wardemann H, Hammersen J, Nussenzweig MC. Human autoantibody silencing by immunoglobulin light chains. *J Exp Med*. (2004) 200:191–9. doi: 10.1084/jem.20040818

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Albus, Jördens, Möller and Dodel. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Effects of a Multimerized Recombinant Autoantibody Against Amyloid- β

Alexandra Albus,^{a,b} Yannick Kronimus,^{a,b} Sascha Neumann,^a Natascha Vidovic,^{a,b} André Frenzel,^c Philipp Kuhn,^c Marc Seifert,^d Tamar Ziehm,^e Hendrik van der Wurp^{a,f} and Richard Dodel^{a,b,*}

^a Chair of Geriatric Medicine, University Duisburg-Essen, Germany

^b Department of Neurology, Philipps-University, Marburg, Germany

^c Yumab GmbH, Braunschweig, Germany

^d Institute of Cell Biology (Cancer Research), Medical Faculty, University Duisburg-Essen, Germany

^e Institute of Biological Information Processing (IBI-7: Structural Biochemistry), Forschungszentrum Jülich, Jülich, Germany

^f Faculty of Statistics, TU Dortmund University, Dortmund, Germany

Abstract—Alzheimer’s disease (AD) is the most common neurodegenerative disease; thus, the search for a cure or causal therapy has become necessary. Despite intense research on this topic in recent decades, there is no curative therapy up today, and also no disease-modifying treatment has been approved. As promising approach passive immunization strategies have thereby come forth. In this study, we focused on naturally occurring autoantibodies against the AD-associated peptide amyloid- β . These antibodies have already reported to show beneficial functions *in vitro* and in mouse models of AD. However, their availability is limited due to their low abundance in peripheral blood. In a recent study, we were able to generate four recombinant antibodies against amyloid- β . In the present study, we tested these antibodies in ELISA and SPR assays for their binding behavior and by aggregation- and phagocytosis assays as functional evidences to characterize their amyloid- β -related neutralizing and clearance abilities. Further *ex vivo* assay on organotypic hippocampal slice cultures gave first evidence of microglial activation and inflammatory features. The tested recombinant antibodies in IgG format showed, in comparison to naturally occurring autoantibodies against amyloid- β , insufficient binding capacities and -affinities. However, after conversion of one antibody into a single chain format multimerization of the scFv-Fc construct, the investigated binding capacity and -affinity showed improvements. Further functional assays predict a protective effect of this antibody. Although, all four recombinant antibodies showed binding to amyloid- β , promising features were only detectable after conversion into a multimeric format. The multimeric scFv-Fc antibody exhibited thereby strong impact on amyloid- β clearance and inhibition of oligomerization. 2021 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Alzheimer’s disease, passive immunization, naturally occurring autoantibodies, recombinant antibody, scFv-Fc antibody.

INTRODUCTION

Alzheimer’s disease (AD) is the leading neurodegenerative disease affecting 44 million people worldwide (Alzheimer’s Association, 2019). Intense

research on the pathogenesis and progression of AD revealed that the misfolding of distinct peptides induces neuronal cell death in the brain (Skovronsky et al., 2006); amyloid- β (A β) and Tau are the main pathological peptides, and their misfolding and consecutive intra- as well as extracellular deposition in neurons leads to cognitive impairment (Alzheimer, 1907; Nelson et al., 2012).

In recent years, the association between neurodegeneration and immunology has been investigated. The idea of clearing or protecting the brain from misfolded peptides by active or passive immunization strategies seems to be a promising approach, as it was shown previously that specific antibodies can opsonize these peptides and mediate their phagocytosis (Albus et al., 2018; Catepoel et al., 2013; Roettger et al., 2013). However, active immunization trials failed, as several patients showed severe side

*Correspondence to: R. Dodel, Chair of Geriatric Medicine, University Duisburg-Essen, Virchowstrasse 171, 45147 Essen, Germany.

E-mail address: Richard.Dodel@uk-essen.de (R. Dodel).

Abbreviations: A β , Amyloid- β ; AD, Alzheimer’s disease; ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCP, antibody-dependent cellular phagocytosis; δ , Cliff’s delta; Fc, Fragment crystallizable; Fc γ , Fragment crystallizable gamma; Fv, Fragment variable; IL, Interleukin; IVIg, Intravenous immunoglobulin G; Ka, association rate constant; KD, dissociation constant, apparent affinity; Kd, dissociation rate constant; MAHA, Murine anti-human antibody; Mrd, mean rank difference; nAbs, naturally occurring autoantibody; OHSC, Organotypic hippocampal slice culture; Po, retrospective power; RU, Response Unit; scFv-Fc, Single chain fragment variable-fragment crystallizable; TNF- α , Tumor necrosis factor-alpha.

effects: The direct application of small fragments of A β to stimulate the immune system to produce antibodies against misfolded A β , leads to severe side effects, such as meningoencephalitis (Orgogozo et al., 2003). In passive immunization trials, patients received antibodies reactive to A β . However, phase-3 studies on passive A β clearance revealed ineffectivity and unfavourable outcome (van Dyck, 2018). Recently, the novel anti-A β antibody aducanumab, a monoclonal antibody that originates from memory B cells of healthy older individuals, showed limited efficacy with regard to the primary outcome (Sevigny et al., 2016).

The focus of this study is a passive immunization strategy, similar to aducanumab treatment. However, here we investigated A β -reactive B cells from healthy younger individuals (20–30 years of age) instead of older individuals (> 60 years of age) without dementia (Albus et al., 2019).

A β -reactive antibodies have been found in a major fraction of healthy human individuals, and have thus, been called naturally occurring autoantibodies (nAbs) (Lutz, 2012). The investigated A β -reactive antibodies in our study are derived from B cells that show characteristics of human B1 cells (e.g., autoreactivity, ontogenetically early) (Baumgarth, 2011) but then also show clear molecular signs of maturation and selection in germinal centers, i.e. class switched BCR and Ig mutations (Rajewsky, 1996; Seifert and Küppers, 2016).

First experiments on transgenic AD mice showed a beneficial effect of these nAbs by reducing the level of fibrillated A β and proinflammatory cytokines, such as Interferon- γ and Tumor necrosis factor- α (TNF- α). In addition, the cognition of the treated transgenic AD-mice was stabilized (Mengel et al., 2013). Although it is controversially debated whether AD patients have lowered or increased titers of A β -reactive nAbs in the serum (Kronimus et al., 2018), the beneficial effects of nAbs lead to further investigations on passive immunization. As these nAbs were enriched from commercially available intravenous immunoglobulin G (IVIg) preparations, their availability is dependent on blood donations. To enable passive immunization strategies, we aimed at generating recombinant A β -reactive antibodies. We recently identified the Ig genes encoded in sort-purified A β -reactive B cells from healthy donors (Albus et al., 2019), and in the present study we analyze the *in vitro* efficacy of four recombinant monoclonal A β -reactive nAbs. Furthermore, one antibody was selectively converted to a single chain (scFv-Fc) antibody, which subsequently multimerized by peptide linking (Cuesta et al., 2010). Multimerization improved A β -toxicity neutralization and clearance significantly *in vitro*.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies

The four investigated A β -reactive antibodies B06 IgG, B07 IgG, B07 scFv-Fc and C06 IgG were derived from a prior study (Albus et al., 2019). The antibody sequences of the variable domain (Fv) were cloned into a human IgG₁ backbone and expressed in mammalian cells by

Yumab GmbH (Braunschweig). One of the four antibodies (designated B07) was cloned and expressed in single chain (scFv-Fc) conformation. In the scFv-Fc conformation, a human Fc (derived from human IgG₁) is C-terminally fused to the scFv via a peptide linker (Fig. 1). Due to the Fc fragment the single chains dimerize to a bivalent homodimer, comparable to a full IgG (Cuesta et al., 2010). The antibody in scFv-Fc conformation showed an increased multimerization, which was verified by size exclusion chromatography. This phenomenon probably occurs due to the linker length, which also results in more binding sites and a higher avidity.

nAbs-A β , which were used as reference control, were purified from intravenous immunoglobulin G (IVIg, Octagam 10%, Octapharma) as described previously (Dodel et al., 2011). In short, disposable chromatography columns were packed with iodoacetyl gel (Thermo Scientific) and coupled with A β . IVIg (1:5 in PBS) was loaded on the columns overnight at 4 °C. The unbound fraction (IVIg depleted of nAbs-A β) passed through the columns. Afterwards, the bound IgG fraction was released and collected by passing elution buffer (50 mM glycine, pH 2.8) through the column. nAbs-A β media was further normalized with TRIS to pH 7.4 and subsequently washed with PBS and concentrated by centrifugation using an ultrafiltration filter (Vivaspin® 20, Sartorius AG). Antibody concentrations were measured by UV/VIS spectrometry.

Peptides

A β _{1–42} and A β _{1–42}-FITC (Bachem) were dissolved in Hexafluoroisopropanol (HFIP), sonicated, aliquoted, evaporated via a speedVac concentrator (Jouan RC1010, Thermo) and stored at –80 °C. A β was used as monomer or oligomer for subsequent assays. A β was dissolved in PBS to a concentration of 1 mg/ml, aliquoted and directly processed or stored at –80 °C to obtain monomers. A β was also dissolved in PBS to a concentration of 1 mg/ml but then subsequently incubated at 37 °C for 24 h with constant agitation on an orbital shaker at 50 rpm to obtain oligomers. The oligomeric A β was aliquoted and stored at –80 °C. Presence of monomers and oligomers was verified by electron microscopy (Fig. 2).

The prion peptide (referred to as the PrP fragment, PSL GmbH) was used with the format PrP106-126 A117V, which was used in prior assays (Albus et al., 2018; Roettger et al., 2013). PrP was dissolved in PBS and stored at –20 °C.

α -Synuclein (α -Syn, Analytik Jena) was purchased at 5 mg/ml in PBS and stored at –20 °C. The protein was used in its monomeric form for ELISA experiments.

Cell culture

Organotypic hippocampal slice cultures. Organotypic hippocampal slice culture (OHSC) experiments were performed with a total of 24 C57BL/6J mice (Charles River Laboratories) on postnatal days 2–4, according to prior experiments from our group Richter et al. (2019). In brief, mice were sacrificed by decapitation and brains

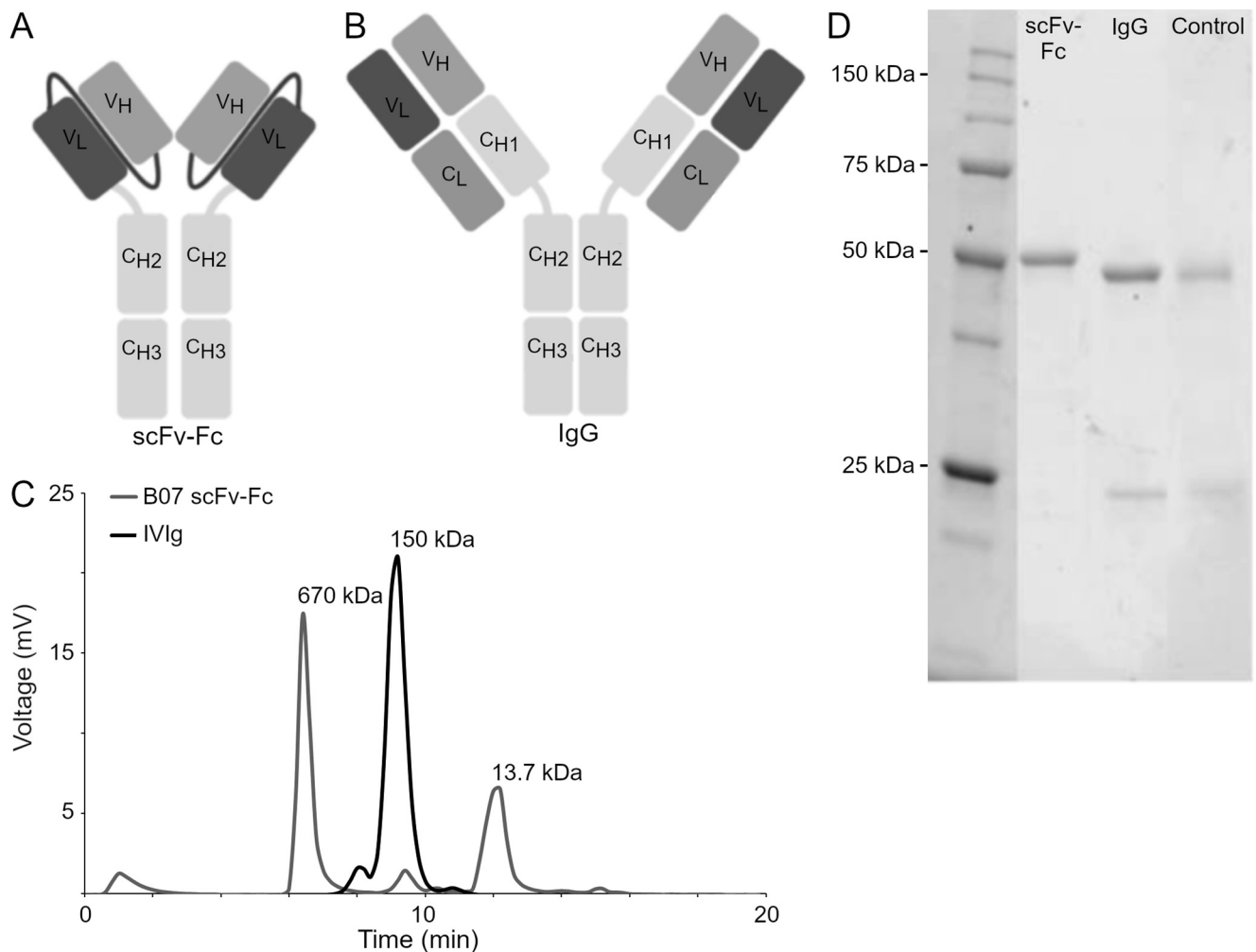


Fig. 1. Comparison of IgG and scFv-Fc antibody. **(A)** At the scFv-Fc antibody construct the CH1 and the CL regions are missing. Alternatively, the VH and VL regions are connected via a peptide linker. **(B)** Schematic construct of full IgG antibody. **(C)** Size-exclusion chromatography displayed a higher molecular weight for B07 scFv-Fc antibody, indicating a multimerized structure than compared IVIg. Thyroglobulin bovine (670 kDa), γ -globulins from bovine blood (150 kDa) and ribonuclease A type I-A from bovine pancreas (13.7 kDa) were used as references. **(D)** Reducing SDS-PAGE of scFv-Fc antibody, full IgG and purified human IgG/kappa (P80–111) Bethyl.

were dissected and transferred into cold preparation medium A (HBSS-1 fold (PAA) supplemented with 1.3% Glucose-45% (Sigma) and 1.5% 1 M HEPES (PAA)). Afterwards, hippocampi were dissected and cut into 375 μ m thick slices using a tissue chopper (McIlwain, Fisher Scientific). In a 6-well plate, 6 slices per well were applied and cultured on special membrane inserts (Milli-cell culture inserts 0.4 μ m pore size, Millipore) with 1.2 ml of culture media (41.6% aqua *ad injectabilia* (Berlin Chemie), 25% BME (Pan Biotech), 5% 10-fold MEM (Thermo Fisher Scientific), 25% horse-serum (Thermo Fisher Scientific), 1% Glutamax (Gibco) and 1.44% Glucose-45% (Sigma)). Medium was adjusted with sodium bicarbonate to pH 7.2. The culture media was replaced in 48 h intervals, and treatment started six days after preparation. Slices were cultured in a humidified incubator at 35 $^{\circ}$ C and 5% CO₂.

BV-2 culture. The murine microglial cell line BV-2 was cultured according to Istrin et al. with minor modifications

(Istrin et al., 2006). Briefly, cells were cultured in T-75 flasks in 20 ml DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM stable glutamine and 20 mM HEPES (all from Pan Biotech) in a humidified incubator at 37 $^{\circ}$ C and 5% CO₂. For experiments, BV-2 cells were plated in a 24-well plate at a density of 12×10^5 cells per ml.

Cross-reactivity ELISA

The recombinant antibodies were tested for their binding ability to monomeric and oligomeric A β as well as for cross-reactivity to PrP, α -Syn and BSA. First, 96-well round-bottom high-binding ELISA plates (Sarstedt) were coated with 5 μ g/ml A β peptide or BSA (in PBS), 20 μ g/ml PrP, or 8 μ g/ml α -Syn (in PBS) overnight at 4 $^{\circ}$ C according to prior studies from the group (Albus et al., 2018; Gold et al., 2013; Wei et al., 2012). After 24 h, the incubated plates were washed three times with washing buffer (PBS + 0.05% Tween 20) using a plate washer (Amersham Biotrak II Plate Washer, GE Healthcare) and blocked with blocking buffer (Roti-block + 0.1%

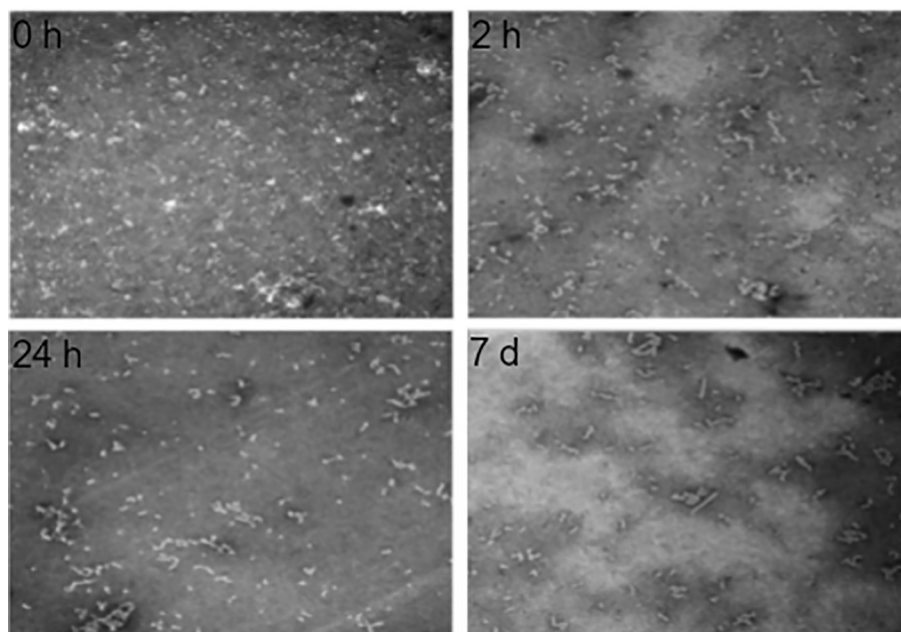


Fig. 2. Aggregation states of amyloid- β at several time points. A β was dissolved in PBS to a concentration of 1 mg/ml and incubated at 37 °C with constant agitation of 50 rpm. After 0, 2, and 24 h and after 7 days, samples were taken and analyzed by electron microscopy (Imaging Center Essen, Electron Microscopy Unit, University Hospital of Essen, Essen, Germany).

Tween 20; Roti-block, Roth; Tween 20, Applichem GmbH) for 1 h at 37 °C. The recombinant antibodies B06 IgG, B07 IgG and C06 IgG as well as nAbs-A β and IVIg as reference antibodies, were diluted in blocking buffer to a final concentration of 20 μ g/ml, used in downward concentration pattern of 1:2 and were incubated for 1 h at room temperature with constant agitation on an orbital shaker at 50 rpm. The plates were washed three times with washing buffer and incubated with the HRP-conjugated anti-human IgG antibody (Calbiochem) as the secondary antibody. Subsequently, the plates were washed three times with washing buffer and incubated for 20 min with 50 μ l/well TMB (Merck). The reaction was stopped with 25 μ l/well sulfuric acid (5% H₂SO₄, Sigma-Aldrich) after 20 min. Signals were measured at 450 nm with a plate reader (Tecan Infinite M200), and the blank signal (no first and secondary antibody) was subtracted. The results were normalized to the IVIg signal. Due to excess signal intensities, the multimerized antibody B07 scFv-Fc was, next to nAbs-A β and IVIg, reduced to 1.25 μ g/ml.

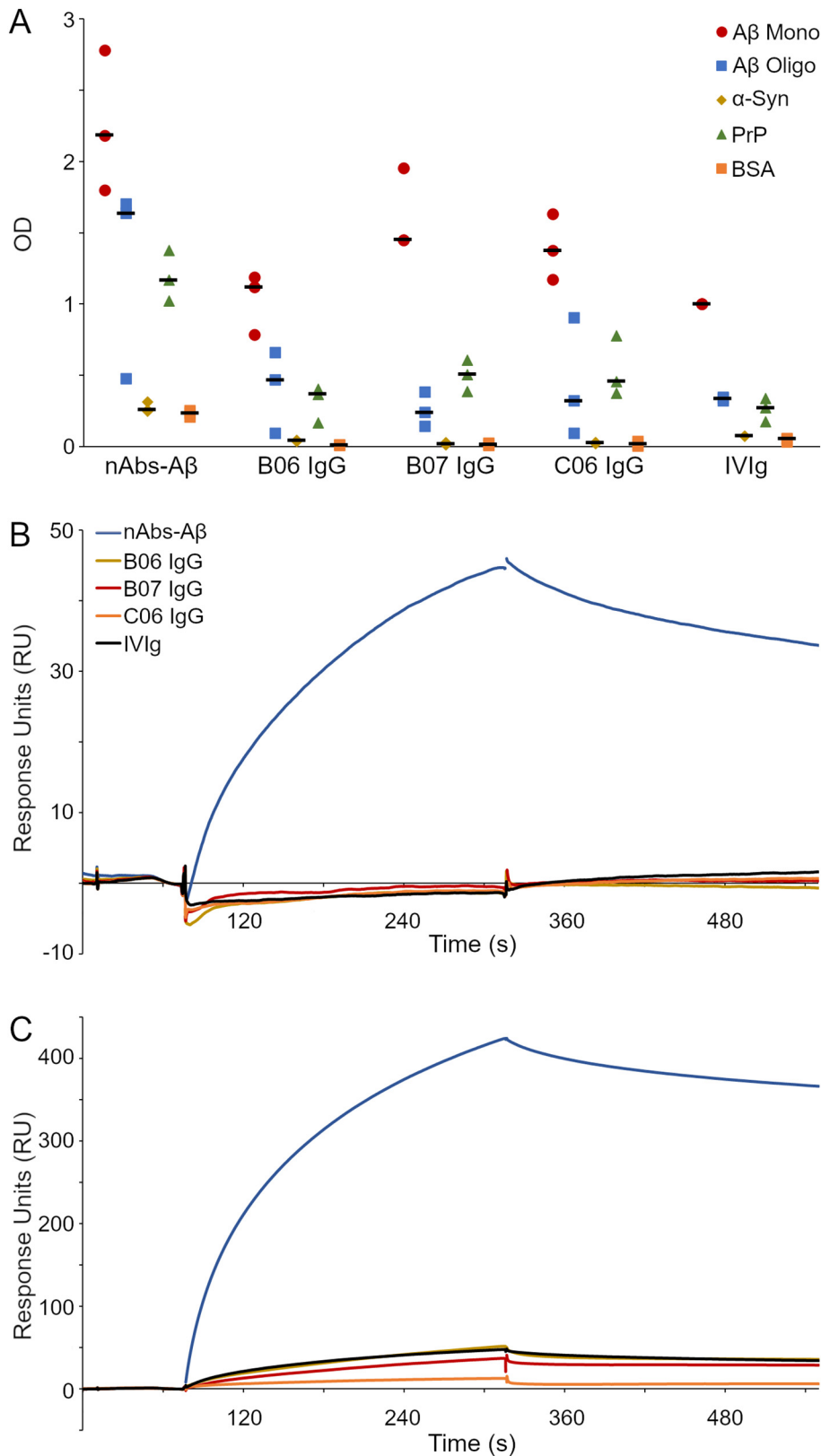
SPR spectroscopy

SPR experiments were performed on a protein interaction platform (BIAcore T200, GE Healthcare) at 25 °C. A β was covalently immobilized as monomers or oligomers onto flow cells of a CM5 sensor chip (GE Healthcare) via amine coupling, according to the manufacturer's instructions, with 3000 (monomeric A β) or 4800 (oligomeric A β) response units (RUs). Both peptides were dissolved in 10 mM acetate buffer (pH 4.0). The remaining active sites on the sensor chip were blocked by treating with 1 M ethanolamine-HCl (pH 8.5).

Channel 1 functioned as the reference channel and was activated and deactivated. PBS with 0.005% Tween 20 (PBST) was used as running buffer. Interactions were performed at a flow rate of 30 μ l/min and 4 min contact time, followed by dissociation for 3 min. Each antibody was measured in a 1:2 downward concentration pattern, starting at 1 μ M. After each interaction, the surface of the chip was regenerated by the injection of 0.85% phosphoric acid at a flow rate of 10 μ l/min and a contact time of 30 sec. KD values were calculated with 1:1 binding model using BIAevaluation software (GE Healthcare).

N-glycosylation pattern

For glycan extraction, 20 μ g of each recombinant antibody was treated with reducing SDS loading buffer (Carl Roth), denatured at 95 °C for 5 min, and loaded on an 8% SDS-PAGE gel. Protein bands were visualized with Coomassie Brilliant Blue (Serva). Products running at 50 kDa size (corresponding to heavy chain) were excised from the gel, cut into small pieces and destained with 50 mM ammonium bicarbonate (NH₄HCO₃, Sigma-Aldrich) and acetonitrile (ACN, Carl Roth). Next, reducing and alkylating steps were performed with 1 mM DL-dithiothreitol (Sigma-Aldrich) at 56 °C and 55 mM iodoacetamide (Sigma-Aldrich) at RT for 30 min, respectively. After washing with 50 mM NH₄HCO₃ and ACN, the gel pieces were dried in a SpeedVac concentrator. The in-gel cleavage of N-linked glycans was performed with PNGase F (New England Biolabs). Then, 2 μ l of the enzyme was dissolved in 48 μ l of 55 mM NH₄HCO₃, and added to each sample and incubated overnight at 37 °C. The extraction of released glycans was achieved by adding ddH₂O and incubating in an ultrasonic bath for 30 min. After repeating this step twice, the glycans were lyophilized and dissolved in 500 μ l of DMSO. Next, approximately 25 mg sodium hydroxide (Sigma-Aldrich) and 300 μ l of methyl iodide (Sigma Aldrich) were added, and the atmosphere of the vessel was kept under argon. After incubating in an ultrasonic bath for 80 min, the reaction was stopped by adding 1 ml 10% acetic acid (Acros Organics). Permethylated glycans were isolated by adding 600 μ l of chloroform (Carl Roth), vortexing, and transferring the organic phase into new vessels for a total of three times. This fraction was washed four times with ddH₂O and evaporated under vacuum. The dry, permethylated glycans were purified and desalted by using Pierce C18 tips (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's protocol.



Glycans were again dried in a SpeedVac concentrator, dissolved in 10 μ l of ddH₂O and stored at -20°C .

Matrix-assisted laser-desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) was performed on an Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) using the positive-ion reflector mode. Directly on the spots of an AnchorChip target (Bruker Daltonics), glycan samples were mixed with 10 mg/ml 6-Aza-2-thiothymine matrix at the ratios of 1:1, 1:2, and 1:4 (Sigma-Aldrich). Sum spectra of each sample were acquired after calibrating with a peptide standard. Data processing was performed using FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). Permethylated glycans were identified using the web service “Glyco-Peakfinder” (glycopeakfinder.com).

Fibril formation assay

As described previously (Albus et al., 2018), 50 μ M A β was incubated with or without 2.5 μ M antibody for 48 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. At 0, 24 and 48 h time points, 10 μ l of each approach was measured together with 80 μ l of glycine buffer (50 mM,

Fig. 3. Antibody binding to monomeric and oligomeric A β in ELISA and SPR. The investigated antibodies were tested for their binding ability to different antigens. **(A)** The surface of a 96-well ELISA plate was coated with monomeric or oligomeric A β and with α -Syn, PrP or BSA. After blocking, antibodies were used in a downward concentration pattern starting with 20 μ g/ml and visualized with the HRP-coupled secondary anti-human IgG antibody. Here, the binding of 10 μ g/ml is presented. **(B, C)** SPR sensorgrams of antibodies binding to monomeric **(B)** or oligomeric A β **(C)**. Monomeric or oligomeric A β was immobilized via amine coupling to chip surface, and each antibody was measured separately. Interaction curves showed the association and dissociation of the antibodies at a concentration of 1 μ M. ELISA was performed with three independent replicates. Single data points are shown next to the respective median (marked as lines).

pH 9.2) and 10 μ l of Thioflavin-T (ThT, 40 μ M) in a flat bottom 96 black well plate (Greiner Bio-One GmbH) with 450 nm as the excitation wavelength and 485 nm as the emission wavelength in the plate reader (Tecan Infinite M200).

Microglial uptake

For the microglial uptake assay, the murine cell line BV-2 was cultured as described above. BV-2 cells were seeded at 3×10^5 cells/well in 24-well plates (Sarstedt) in BV-2 culture media. After 24 h, 0.75 μ M monomeric or oligomeric A β -FITC was preincubated with or without B06 IgG, B07 IgG, B07 scFv-Fc, C06 IgG, nAbs-A β or IVIg (0.075 μ M) for 1 h in FCS-free BV-2 culture media at 37 $^{\circ}$ C. Then, the cells were treated with the mixture at 37 $^{\circ}$ C for 3 h. Afterwards, the cells were washed two times with PBS and incubated for 5 min with ice-cold calcium-free PBS to allow detachment of the cells from the plate. Cells were resuspended and transferred to FACS tubes (Sarstedt). Tubes were filled with FACS buffer (PBS + 0.04% FCS) and cells were sedimented by centrifugation at 300x g for 5 min at 4 $^{\circ}$ C. The supernatant was discarded, and replaced with 100 μ l of fresh FACS buffer. Prior to measurement, 0.6 μ g propidium iodide (PI, Sigma) was added to each tube. Cells with positive FITC and negative PI signals were counted as A β -phagocytizing microglia. Cells were measured with a CytoFlex S flow cytometer (Beckman Coulter). The analysis was performed with Summit 6.3 software (Beckman Coulter). Samples were measured in duplicate and normalized to A β treatment control.

OHSC treatment

Six days after preparing the OHSCs antibody treatment started. 1% penicillin/streptomycin and 1% amphotericin B were added to the culture media. The media was replaced, and 0.05 μ M antibody (B07 scFv-Fc, nAbs-A β or IVIg) was added onto each slice every second day for an overall time of eight days. The supernatant was collected, and the remaining slices were used for immunohistochemistry.

Immunohistochemistry of OHSCs

OHSCs were stained with 10 μ g/ml PI in culture media for 30 min at 35 $^{\circ}$ C, washed with PBS and subsequently fixed

with 4% PFA for 30 min at 4 $^{\circ}$ C, and then washed three times with PBS and stored at 4 $^{\circ}$ C. Slices were cut out with an insert membrane, transferred to a 24-well plate (Sarstedt) and blocked with 3% BSA in PBS for 1 h at RT with constant agitation on an orbital shaker at 50 rpm. Slices were stained with primary antibodies against NeuN (Millipore) and Iba-1 (Wako) at 1:1000 in 3% BSA with 0.1% NaN₃ and 0.4% Triton X overnight at 4 $^{\circ}$ C with constant agitation. The next day, slices were washed three times with PBS and stained with donkey anti-mouse Alexa Fluor 488 (Thermo) and donkey anti-rabbit Alexa Fluor 647 (Thermo) secondary antibodies at 1:1000 in 3% BSA with 0.1% NaN₃ for 2 h at RT with constant agitation. Slices were washed three times with PBS, transferred to object slides with the tissue upright, and covered with mounting media (Dako) and cover glasses. Visualization was performed with an LCM8 confocal laser scanning microscope (Leica) with a dry plan 20x objective and 0.75 magnification. Images were analyzed using ImageJ software.

Cytokine-ELISA with OHSC supernatants

Complementary to the immunohistochemistry of OHSCs, the release of Interleukin (IL)-1 β and -6 as well as TNF- α was measured using commercial ELISA kits (Invitrogen). The collected supernatants from the antibody treatment on OHSCs were used at a 1:2 dilution, following the manufacturer's instructions. Signals were measured at 450 nm with a plate reader (Tecan Infinite M200), and the blank signal was subtracted. The results were normalized to the IVIg-treated control sample.

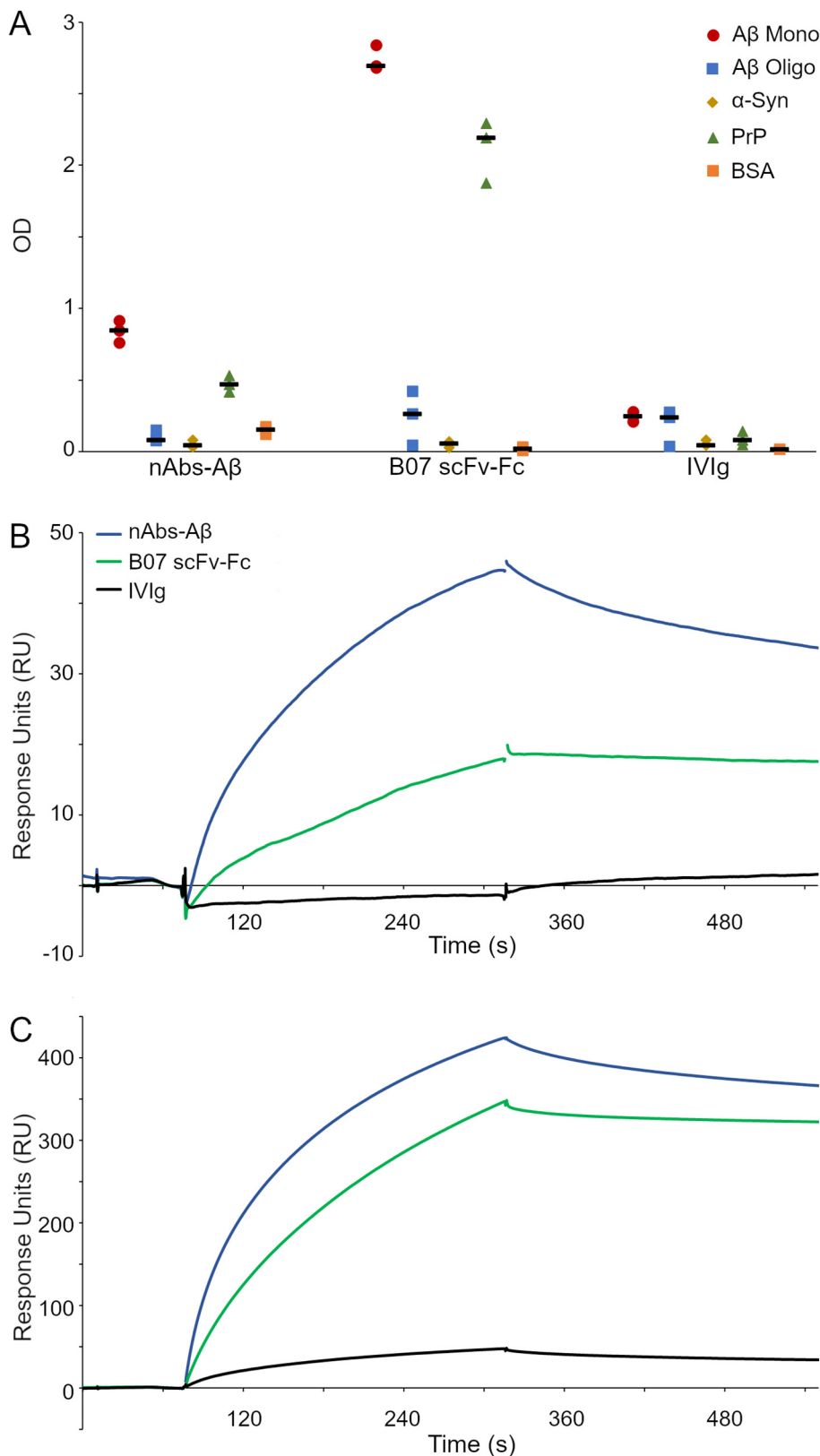
Statistical analysis

Due to the small sample sizes of $n = 3$ and $n = 4$, respectively, all results should be treated with caution (Button et al., 2013). We present the data and empirical findings and apply tests where applicable. To compare multiple groups the Kruskal–Wallis test was used as a nonparametric alternative to ANOVA. If differences were found in the global approach, pairwise comparisons with Dunn's test are performed to identify the differences. Adjusting p -values is performed using Bonferroni–Holm. Retrospective power analyses are performed where applicable. As no prior knowledge was available, the underlying samples were used for the power analyses. Effect sizes are presented via eta-squared

Table 1. KD values of the antibody-antigen interaction.

Analyte	Monomeric A β				Oligomeric A β			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax(RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax(RU)
nAbs-A β	$7.24 \cdot 10^{+3}$	$1.314 \cdot 10^{-3}$	$1.82 \cdot 10^{-7}$	85.71	$2.08 \cdot 10^{+4}$	$4.05 \cdot 10^{-4}$	$1.95 \cdot 10^{-8}$	441.1
B06 IgG	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$6.52 \cdot 10^{+3}$	$6.42 \cdot 10^{-4}$	$9.85 \cdot 10^{-8}$	79.11
B07 IgG	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$1.14 \cdot 10^{+3}$	$6.20 \cdot 10^{-4}$	$5.46 \cdot 10^{-7}$	279.3
C06 IgG	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	7.20^{+1}	1.38^{-3}	1.92^{-5}	1325.6
IVIg	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	$7.86 \cdot 10^{+3}$	$1.057 \cdot 10^{-3}$	$1.35 \cdot 10^{-7}$	83.46

KD values were calculated by using all measured concentrations (1 μ M–0.5 μ M–0.25 μ M–0.125 μ M–0.0625 μ M) in the BIAevaluation software (GE Healthcare). k_a association rate constant; k_d dissociation rate constant; KD dissociation constant, apparent affinity; R_{max} maximal Response Units; RU Response Units; *n.b.* no binding measurable.



$\eta^2 = (H - k + 1)/(n_* - k) \in [0, 1]$ for the Kruskal–Wallis test (H denoting the test statistic, k the number of groups and n_* the pooled sample size) and Cliff's Delta as its absolute value for Dunn's test, which is based on the ranks (Cliff, 1993).

RESULTS

Recombinant antibodies show variable Aβ affinity and low level of cross-reactivity

Recombinant antibodies were analyzed for their reactivity to Aβ, and to PrP, α-Syn and BSA as comparators by ELISA. The antibodies in IgG format (B06, B07 and C06) were tested for their potential to bind monomeric or oligomeric Aβ (Fig. 3A). The investigated recombinant antibodies B06, B07 and C06 showed specificity for monomeric Aβ, similar to nAbs-Aβ or less specific as IVIg references. We observed that normalized to IVIg binding signal intensity, B06, B07 and C06 antibodies showed high binding capacity of monomeric Aβ, however, binding to oligomeric Aβ was 2 to 10-fold lower (Fig. 3A). In contrast, we observed 2–3-fold lower PrP-binding capacity, and binding of α-Syn and BSA was magnitudes lower, thereby suggesting low levels of cross-reactivity. For a better overview we only present the 10 μg/ml antibody binding.

Fig. 4. Antibody binding of scFv-Fc in comparison to nAbs-Aβ and IVIg. The investigated antibodies were tested for their binding ability to different antigens. **(A)** The surface of a 96-well ELISA plate was coated with monomeric or oligomeric Aβ and α-Syn, PrP or BSA. After blocking, antibodies were used at 1.25 μg/ml and visualized by the secondary HRP-coupled anti-human IgG antibody. **(B, C)** SPR sensorgrams of antibodies binding to monomeric **(B)** or oligomeric **(C)** Aβ. Monomeric or oligomeric Aβ was immobilized via amine coupling to the surface of the chip, and each antibody was measured separately. Interaction curves showed the association and dissociation of 1 μM antibodies. ELISA was performed with three independent replicates. Single data points are shown next to the respective median (marked as lines).

Table 2. KD values of the antibody-antigen interaction with the scFv-Fc antibody.

Analyte	Monomeric A β				Oligomeric A β			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmax (RU)
nAbs-A β	$7.24 \cdot 10^{+3}$	$1.314 \cdot 10^{-3}$	$1.82 \cdot 10^{-7}$	85.71	$2.08 \cdot 10^{+4}$	$4.05 \cdot 10^{-4}$	$1.95 \cdot 10^{-8}$	441.1
B07 scFv-Fc	$7.84 \cdot 10^{+2}$	$4.35 \cdot 10^{-4}$	$5.56 \cdot 10^{-7}$	224.6	$3.05 \cdot 10^{+2}$	$1.47 \cdot 10^{-5}$	$4.83 \cdot 10^{-8}$	$1.17 \cdot 10^{+4}$
IVIg	$5.82 \cdot 10^{+3}$	$3.02 \cdot 10^{-8}$	$5.20 \cdot 10^{-12}$	1.642	$7.86 \cdot 10^{+3}$	$1.057 \cdot 10^{-3}$	$1.35 \cdot 10^{-7}$	83.46

KD values were calculated by using all measured concentrations in the BIAevaluation software (GE Healthcare). *ka* association rate constant; *kd* dissociation rate constant; *KD* dissociation constant, apparent affinity; *Rmax* maximal Response Units; *RU* Response Units.

Detailed downward concentration pattern results can be found in the supplement (Fig. S1).

To determine affinity of B06, B07 and C06 antibodies to monomeric and oligomeric A β , we performed surface plasmon resonance (SPR) measurements. nAbs-A β showed strongest interaction with both, monomeric and oligomeric A β . However, the resulting RUs were 10-fold higher for the oligomeric state than for the monomeric state (Fig. 3B, C; 440 RUs nAbs-A β to oligomers and 37 RUs to monomers). The investigated recombinant antibodies B06, B07 and C06 showed no binding to A β , whereby binding signal to oligomers was considerably higher than for the monomeric peptide. The binding strength (KD) of the recombinant antibodies varied between monomeric and oligomeric A β (Table 1). The calculated apparent affinity (KD) of each antibody was in nanomolar range (10^{-7} M) to either monomeric or oligomeric A β . Nevertheless, as the determined affinity and binding signals mostly suggested insufficient A β binding of B06, B07 and C06 antibodies, we focused on a multimerized antibody (B07 scFv-Fc). Detailed interactions with fits can be found in the supplements (Fig. S2).

Multimerization of B07 leads to improved A β binding

Since the recombinant IgG antibodies B06, B07 and C06 showed insufficient binding compared to nAbs-A β , the B07 antibody was converted and produced as a scFv-Fc antibody. This construct allowed the targeted multimerization of the Fv part. Size-exclusion chromatography analysis confirmed multimerization of the B07 antibody in the scFv-Fc format (Fig. 1). As a result, the avidity of the B07 scFv-Fc complex increased significantly compared to that of the parental IgG antibody.

As the scFv-Fc antibody showed intensive binding at 10 μ g/ml in ELISA experiments, we decided to present the 1.25 μ g/ml binding signal of this antibody in comparison to 1.25 μ g/ml of nAbs-A β and IVIg. Here, the B07 scFv-Fc antibody exhibited a three-fold improved binding to monomeric A β at a concentration of 1.25 μ g/ml compared to nAbs-A β and IVIg (Fig. 4A). The B07 scFv-Fc antibody also showed a high binding capacity to PrP but marginal binding to α -Syn or BSA. SPR results displayed a strong binding affinity of B07 scFv-Fc to oligomers (with 350 RUs) and monomers (28 RUs) (Fig. 4B, C). With $4.83 \cdot 10^{-8}$ M to oligomeric A β the apparent affinity (KD) of the B07 scFv-Fc antibody

showed comparable results to the binding affinity of nAbs-A β ($1.95 \cdot 10^{-8}$ M; Table 2). Detailed SPR interaction of B07 scFv-Fc antibody with fit can be found in the supplements (Fig. S2).

Increased functionality of multimerized B07 antibody

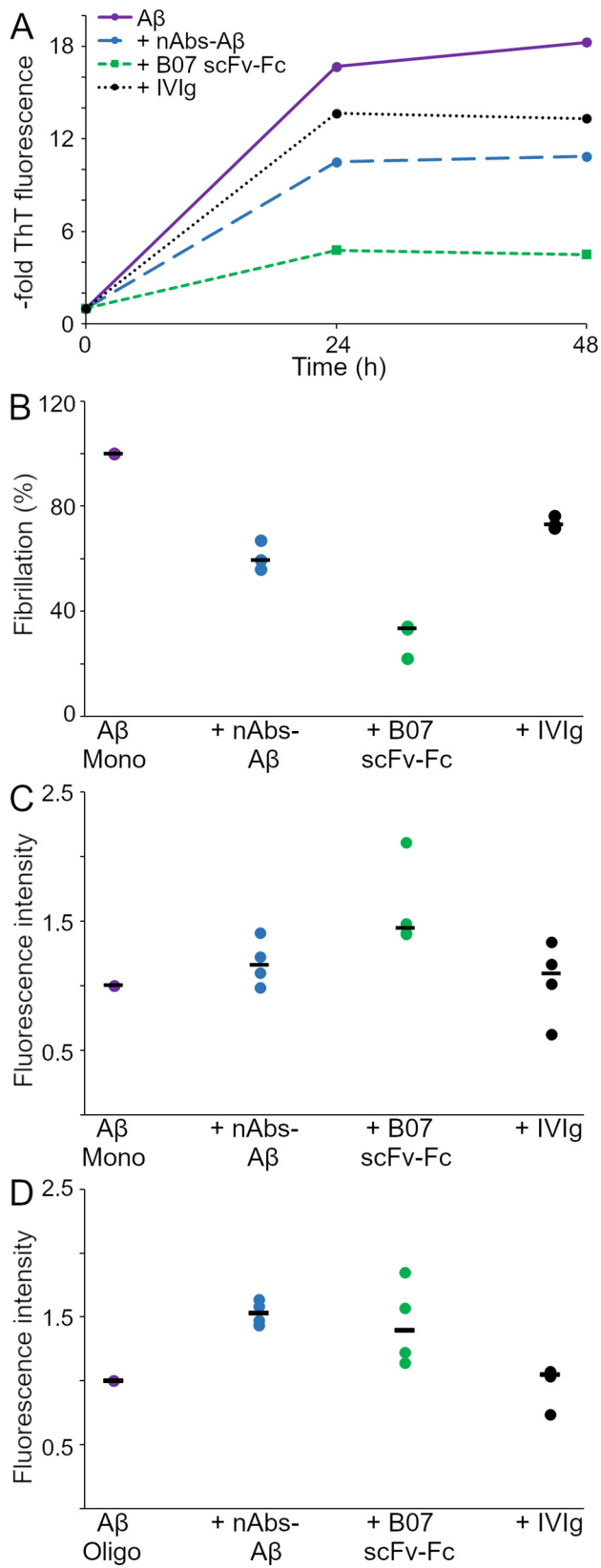
The potential of nAbs-A β and B07 scFv-Fc antibody to inhibiting A β fibrillation was measured by ThT after 0, 24 and 48 h (Fig. 5A) and the relative A β fibrillation was calculated (Fig. 5B). A β without antibody treatment was used as 100% fibrillation for the calculations. By incubating A β with B07 scFv-Fc antibody, the fibrillation of A β was reduced to 30%. The incubation of A β with nAbs-A β showed also a strong inhibition (reduced to 60%), whereas IVIg was insufficient to inhibit fibrillation.

The global hypothesis that differences exist between these groups was tested using a Kruskal–Wallis test for $k = 7$ groups with each $n = 3$. A retrospective power analysis (simulated with one million repetitions) was performed with Gaussian margins and parameters estimated from the underlying samples. This yielded an expected power of 82.01%. The results using the Kruskal–Wallis H test are: $H_6 = 13.524, p \leq 0.04$. So, the null hypothesis that all samples could origin from the same population can be rejected with a significance level of $\alpha = 5\%$. The effect size¹ was calculated via $\eta^2 = 0.54$ indicating a rather strong effect.

Pairwise post-hoc tests to determine which groups are different from one another was performed using Dunn's test (Table 3). The test's power was simulated with estimated parameters as above, here with 10^5 repetitions and using the Bonferroni-Holm method for adjusting p -values as well.

We tested microglial uptake of FITC-labeled monomeric or oligomeric A β by microglia by flow cytometry (Fig. 5C, D-). The B07 scFv-Fc antibody enhanced microglial uptake 1.6-fold for monomeric A β (Fig. 5C) and 1.4-fold for oligomeric A β (Fig. 5D) in comparison to A β alone. nAbs-A β showed no enhanced uptake of monomeric A β , but a remarkable uptake of oligomeric A β . IVIg neither enhanced monomeric A β nor oligomeric A β uptake.

These data are consistent with observations made on recombinant IgG antibodies B06, B07 and C06 (Fig. 6). This low functionality was in line with previously observed low affinity. The global hypothesis was tested again using a Kruskal–Wallis test for $k = 6$ groups (without the control group A β) and each group with



$n = 4$. A retrospective power analysis (as above) yielded an expected power of 78.86%. The test results using the Kruskal–Wallis H test are: $H_5 = 15.45, p \leq 0.01$, with an effect size of $\eta^2 = 0.56$. The null hypothesis can be rejected again, and we therefore found significant differences between the groups. The results for post hoc pairwise two-sided Dunn’s test can be found in Table 4.

Antibodies induce microglial activation on hippocampal slice cultures

To estimate effects of antibody treatment on complex neuroglial tissue, we measured the reaction of murine hippocampal slice cultures to B07 scFv-Fc in comparison to nAbs-Aβ and

IVIg as exploratory outcomes. Thereby, no exclusion criteria were pre-determined. We analyzed the OHSCs neurons and microglia by specific neuronal and microglial markers NeuN and Iba-1 and PI to estimate cell death via immunohistochemistry and detected differences between the treatment with B07 scFv-Fc antibody, nAbs-Aβ and IVIg (Fig. 7A). IVIg-treated slices showed nearly similar morphology of neurons and microglia in comparison to PBS-treated OHSCs, whereas B07 scFv-Fc- and nAbs-Aβ-treated slices showed an altered microglial morphology, which was similar to an amoeboid shape. However, no enhanced cell death was measured in any approach. Next to the immuno-

fluorescence analysis the supernatants of OHSCs treated with B07 scFv-Fc, nAbs-Aβ, IVIg or PBS were tested for released cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α as primary pro-inflammatory markers (Fig. 7B). While IVIg- and PBS-treated slices induced no obvious release of all three cytokines, the antibodies B07 scFv-Fc and nAbs-Aβ induced a significant release of IL-6 as well as TNF-α. The IL-1β level remained unaffected in all samples.

Recombinant antibodies display altered glycosylation pattern

A further consideration regarding recombinant antibodies is the glycosylation pattern, as this could influence different effector functions of the antibody. MALDI-TOF analyses were performed to obtain information about potential Fc N-glycosylation differences between recombinant HEK293-derived antibodies and IVIg (Fig. 8). Each detected N-glycan associated with the investigated recombinant antibodies was similarly present in IVIg samples (Fig. 8, glycans 1–3,5–6). However, the glycosylation pattern revealed significantly

Fig. 5. Effect of scFv-Fc antibody on fibrillation and phagocytosis on microglial cells. (A) The ThT fibrillation assay was used to measure 50 μM Aβ ± 2.5 μM of different antibodies after 0, 24 and 48 h. (B) In addition, inhibition effects after 48 h were plotted. (C, D) Phagocytosis of 0.75 μM FITC-labeled monomeric (C) or oligomeric (D) Aβ ± 0.075 μM antibodies was measured by FACS after preincubating without cells for 1 h and incubating with murine microglial BV-2 cells for 3 h at 37 °C. All experiments were carried out with three independent replicates. Single data points are shown next to respective medians (marked as lines).

Table 3. Results for post-hoc pairwise Dunn's Tests of A β fibrillation

	B06 IgG	B07 scFv-Fc	B07 IgG	C06 IgG	IVIg	nAbs-A β
A β	<i>mrd</i> = -5.00 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.78	<i>mrd</i> = -16.3 <i>p</i> \leq 0.03 <i>po.</i> \approx 65.6% δ = 1	<i>mrd</i> = -4.33 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.56	<i>mrd</i> = -11.0 <i>p</i> = 0.51 <i>po.</i> \approx 0% δ = 1	<i>mrd</i> = -5.00 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.56	<i>mrd</i> = -9.67 <i>p</i> = 0.90 <i>po.</i> \approx 0% δ = 1
B06 IgG		<i>mrd</i> = -11.3 <i>p</i> = 0.48 <i>po.</i> \approx 5.7% δ = 1	<i>mrd</i> = 0.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.11	<i>mrd</i> = -6.00 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.78	<i>mrd</i> = 0 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.11	<i>mrd</i> = -4.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.56
B07 scFv-Fc			<i>mrd</i> = 12.00 <i>p</i> = 0.36 <i>po.</i> \approx 2.5% δ = 1	<i>mrd</i> = 5.33 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 1	<i>mrd</i> = 11.33 <i>p</i> = 0.48 <i>po.</i> \approx 2.6% δ = 1	<i>mrd</i> = 6.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 1
B07 IgG				<i>mrd</i> = -6.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.78	<i>mrd</i> = -0.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.11	<i>mrd</i> = -5.33 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.56
C06 IgG					<i>mrd</i> = 6.00 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.78	<i>mrd</i> = 1.33 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.11
IVIg						<i>mrd</i> = -4.67 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.56

Presented are mean rank difference (*mrd*), *p*-value, retrospective power (*po.*) and Cliff's delta δ .

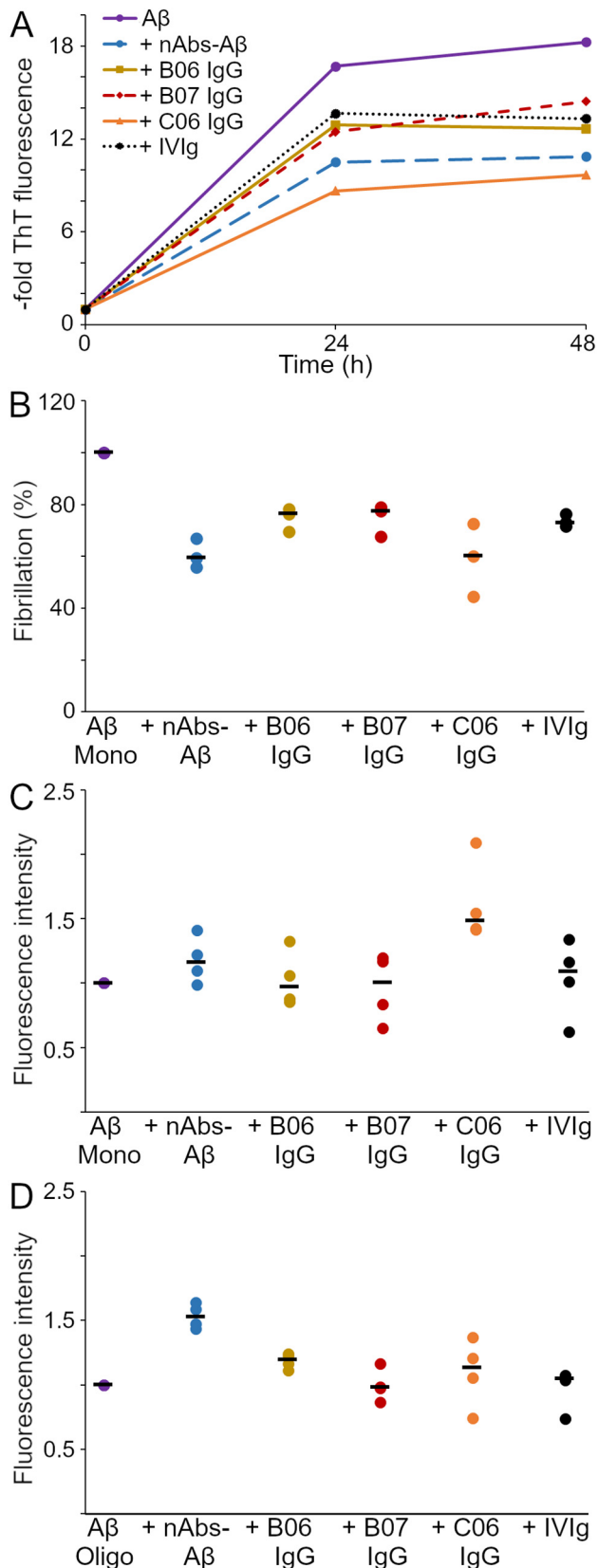
decreased glyco-variants, including the complete absence of sialylated glycans (Fig. 8, glycans 10 and 20).

DISCUSSION

Aim of the study was to quantify A β binding capacity and structural features of the previously described recombinant antibodies B06, B07 and C06 (Albus et al., 2019). Making use of ELISA and SPR, we determined reactivity and binding affinity of each antibody tested against monomeric and oligomeric A β preparations. Furthermore, we determined the increase of A β binding capacity of the selected B07 antibody in mono- and multimeric (scFv-Fc) format.

The investigated antibodies B06, B07 and C06 in monomeric IgG format showed considerable differences in their A β binding capacity. However, SPR measurements revealed insufficient binding affinity of each recombinant antibody B06, B07 and C06. Further assays confirmed that the observed low affinity to A β seemed to be responsible for the low inhibited fibrillation and the low microglial uptake of BV-2 cells *in vitro* (Fig. 6). In fibrillation assay, we found significant differences between the mentioned groups via Kruskal-Wallis test. The post-hoc pairwise Dunn's test yielded only one significant effect, namely between B07 scFv-Fc and A β . No other pairwise differences were found. Interestingly, our observations on ELISA and SPR measurements arise contrary. However, they could originate in the different coating mechanisms and -procedures. Coating of A β monomers in ELISA was done overnight which might have an impact on the monomeric state of A β during the experiment. In SPR,

the immobilization takes only minutes and the molecules are covalently attached to the sensor upon immobilization which might preserve more of the monomeric state of peptide. Considering the difference between these two methods, we believe that the SPR results are more reliable as supported by a full dose-response of the antibodies. Thus, we focused more on the SPR results which provide values for the antibody binding affinity and kinetics. Nevertheless, to compare specificity of the antibodies, we have analyzed binding by ELISA and obtained information about cross-reactivity of the antibodies. Multimeric B07 scFv-Fc showed reactivity to monomeric as well as oligomeric A β . In contrast, the majority of other anti-A β antibodies only show reactivity to either monomeric or oligomeric/fibrillary A β (van Dyck, 2018). The incubation of microglial cells with B07 scFv-Fc antibody showed a strong enhancement of A β uptake in comparison to the parental monomeric IgG construct as well as to the other investigated recombinant antibodies B06 and C06 (Fig. 6). Again, we found significant differences between the groups via Kruskal-Wallis test. The post-hoc Dunn's test was not able to detect any significance. As the scFv-Fc consists of more binding sites as an IgG antibody it is supposed that it can mediate a higher peptide rate to microglia. As demonstrated in a previous study, Fc γ binding is increased by multimerization of antibodies. Moreover, Fc γ receptor-mediated effects, such as antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP), are enhanced as well (Luo et al., 2009). Next, a strong but smaller binding capacity was detected to PrP. Interestingly, it was seen in prior studies that nAbs-A β show interactions to PrP (106–126 A117V) as they seem to detect a similar



structural epitope (Albus et al., 2018). Thereby, the investigated recombinant antibodies could reflect the same structural epitope specificity as nAbs.

To investigate microglial activation, the B07 scFv-Fc antibody was tested in murine OHSCs. Subsequent immunohistochemically analysis revealed microglial activation under B07 scFv-Fc and under nAbs-A β treatment (Fig. 7A). The morphology of microglia was different from PBS- or IVIg-treated OHSCs, as the microglial shape was more amoeboid than differentiated, which itself is a hallmark of the ramified (resting) state (Fernández-Arjona et al., 2017). Thus, B07 scFv-Fc and nAbs-A β but not IVIg induced microglial activation. This might be due to the fact that sialic acids of the Fc N-glycans, which enhance the Fc γ receptor binding of the antibody (Kaneko et al., 2006), are missing. Furthermore, partial degradation of IVIg may also be responsible for the low binding to microglial cells in general. Further, OHSC experiments showed increased IL-6 release in the supernatant of B07 scFv-Fc- and nAbs-A β -treated slices in contrast to slices treated with IVIg or PBS (Fig. 7B). IL-6 can function as pro- and anti-inflammatory markers, and in combination with the immunohistochemical analysis of each slice (Fig. 7A), suggesting that IL-6 release was of anti-inflammatory nature. IL-6 can support gliosis and microglial migration, which can lead to an increased clearance of antibody-bound peptides, including A β (Chakrabarty et al., 2010). In addition, the release of IL-6 can also be induced by the multimerization of the scFv-Fc construct, as this phenomenon was also seen by other researchers, who studied aggregated IgG and IgA (Gómez-Guerrero et al., 1994). In further experiments with A β -treated OHSC we were not able to detect a cytokine increase in A β -treated slices (own observations, data not shown), which were also observed in previously published experiments from our group (Gold et al., 2013; Richter et al., 2019). In accordance with the mentioned studies, we were not able to detect significant cell death in A β OHSC assays and we concluded that the amount of A β was too low to induce neurotoxicity, as neither induced cell death nor enhanced cytokine release was observed under A β treatment.

In conclusion, the modified B07 antibody could demonstrate enhanced functionality in all assays tested, due to multimerization and apparently increased avidity. The scFv-Fc antibody investigated here only reflects possible effects by increased avidity. For further therapeutic approaches the B07 scFv-Fc antibody has to be investigated in more detail to exclude possible

Fig. 6. Effect of B06, B07 and C06 IgG antibodies on fibrillation and phagocytosis. **(A)** The ThT fibrillation assay was used to measure 50 μ M A β \pm 2.5 μ M of different antibodies after incubating for 0, 24 and 48 h. **(B)** The inhibition was additionally plotted after the 48 h timepoint. **(C, D)** Phagocytosis of 0.75 μ M FITC-labeled monomeric **(C)** or oligomeric **(D)** A β \pm 0.075 μ M antibodies was measured by FACS after preincubating without cells for 1 h and incubation with murine microglial BV-2 cells for 3 h at 37 $^{\circ}$ C. Except for microglial uptake with four replicates, all experiments were carried out with three independent replicates. Single data points are shown next to the respective median (marked as lines).

Table 4. Results for post-hoc pairwise Dunn's Tests of microglial A β phagocytosis.

	B07 IgG	B07 scFv-Fc	C06 IgG	IVIg	nAbs-A β
B06 IgG	<i>mrd</i> = -0.75 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.25	<i>mrd</i> = 11.75 <i>p</i> = 0.21 <i>po.</i> \approx 7.2% δ = 1	<i>mrd</i> = 13.25 <i>p</i> = 0.11 <i>po.</i> \approx 8.4% δ = 1	<i>mrd</i> = 0.50 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.125	<i>mrd</i> = 3.75 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.5
B07 IgG	–	<i>mrd</i> = 12.50 <i>p</i> = 0.15 <i>po.</i> \approx 16.4% δ = 1	<i>mrd</i> = 14.00 <i>p</i> = 0.08 <i>po.</i> \approx 19.0% δ = 1	<i>mrd</i> = 1.25 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0	<i>mrd</i> = 4.50 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.5
B07 scFv-Fc	–	–	<i>mrd</i> = 1.50 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.25	<i>mrd</i> = -11.25 <i>p</i> = 0.24 <i>po.</i> \approx 8.5% δ = 1	<i>mrd</i> = -8.00 <i>p</i> = 0.88 <i>po.</i> \approx 0.2% δ = 0.75
C06 IgG	–	–	–	<i>mrd</i> = -12.75 <i>p</i> = 0.14 <i>po.</i> \approx 9.7% δ = 1	<i>mrd</i> = -9.50 <i>p</i> = 0.52 <i>po.</i> \approx 0.3% δ = 1
IVIg	–	–	–	–	<i>mrd</i> = 3.25 <i>p</i> = 1 <i>po.</i> \approx 0% δ = 0.25

Presented are mean rank difference (*mrd*), *p*-value, retrospective power (*po.*) and Cliff's delta δ .

immunogenic side effects of the multimeric format (Polumuri et al., 2018).

Antibody glycosylation

Naturally occurring autoantibodies normally exhibit at least a small portion of sialylated glycans (unpublished observations) unfortunately, we were not able to measure such structures for the investigated recombinant antibodies (Fig. 8). However, sialic acids capping N-glycans are important for the dynamic and kinetic properties of antibodies, as they protect the IgG from clearance by the asialoglycoprotein receptor (Correia, 2010; Washburn et al., 2015). If these sialic acids are missing in administered antibodies during clinical studies, this could explain inefficient outcomes, as this has already been discussed (Chang et al., 2019; Kronimus et al., 2019). In addition, sialic acids increase the anti-inflammatory effect of IgG (Goetze et al., 2011; Kaneko et al., 2006; Raju and Lang, 2014). As already mentioned above, missing sialic acids increase Fc γ receptor binding, which is associated with ADCP and ADCC (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (Kaneko et al., 2006). As we investigated ADCP by microglial uptake assay, we were able to demonstrate an increased microglial phagocytosis of A β by B07 scFv-Fc antibody in comparison to nAbs-A β . For clinical administration, recombinant antibodies are normally produced in CHO cells instead of HEK cells. Nevertheless, glycosylation should also be considered in future *in vivo* trials; notably CHO cell-derived antibodies exhibit less sialic acids and no bisecting N-acetylglucosamin, and this loss is associated with decreased ADCC and ADCP (Kronimus et al., 2019).

In this study, we tested four recombinant human antibodies against A β based on physiological nAbs of

young, healthy individuals. These four antibodies showed a defined binding and under multimerization also a protective and neutralizing effect to A β . In further investigation it is of great importance that the transmission ability of the multimerized scFv-Fc antibody into the brain will be investigated. As already known, the blood–brain barrier is barely permeable for big compounds (Pardridge, 2005). However, following the peripheral sink hypothesis, it is also possible that the multimerized anti-A β antibody could act outside the brain and decrease the peripheral A β concentration to prevent AD (Liu et al., 2015). Nevertheless, the B07 scFv-Fc antibody needs further investigation, especially on its multimeric characteristics.

Biological significance

The observation of multimerization was made by chance but opens a new field for investigations. As shown by SEC (Fig. 1) the investigated multimerized scFv-Fc antibody is nearly comparable to an IgM antibody. As we were not able to refute that the antibody keeps its multimerization grade, we see well known similarities to IgM, which is as well quite instable and fragile by buffer exchange (Mader et al., 2013). The intention of this paper was to show the differences between several single sorted human antibodies and how the binding was increased by changing the construct into the already established scFv-Fc construct. The observed multimerization was a random result, but with an interesting and potentially important outcome, including for the study and further development of recombinant IgM antibodies. The stability of the multimerization should be investigated in further studies as the multimerized antibody reflects such IgM structure and could be used for IgM construction, similar to so called HexaBody™ molecules, which

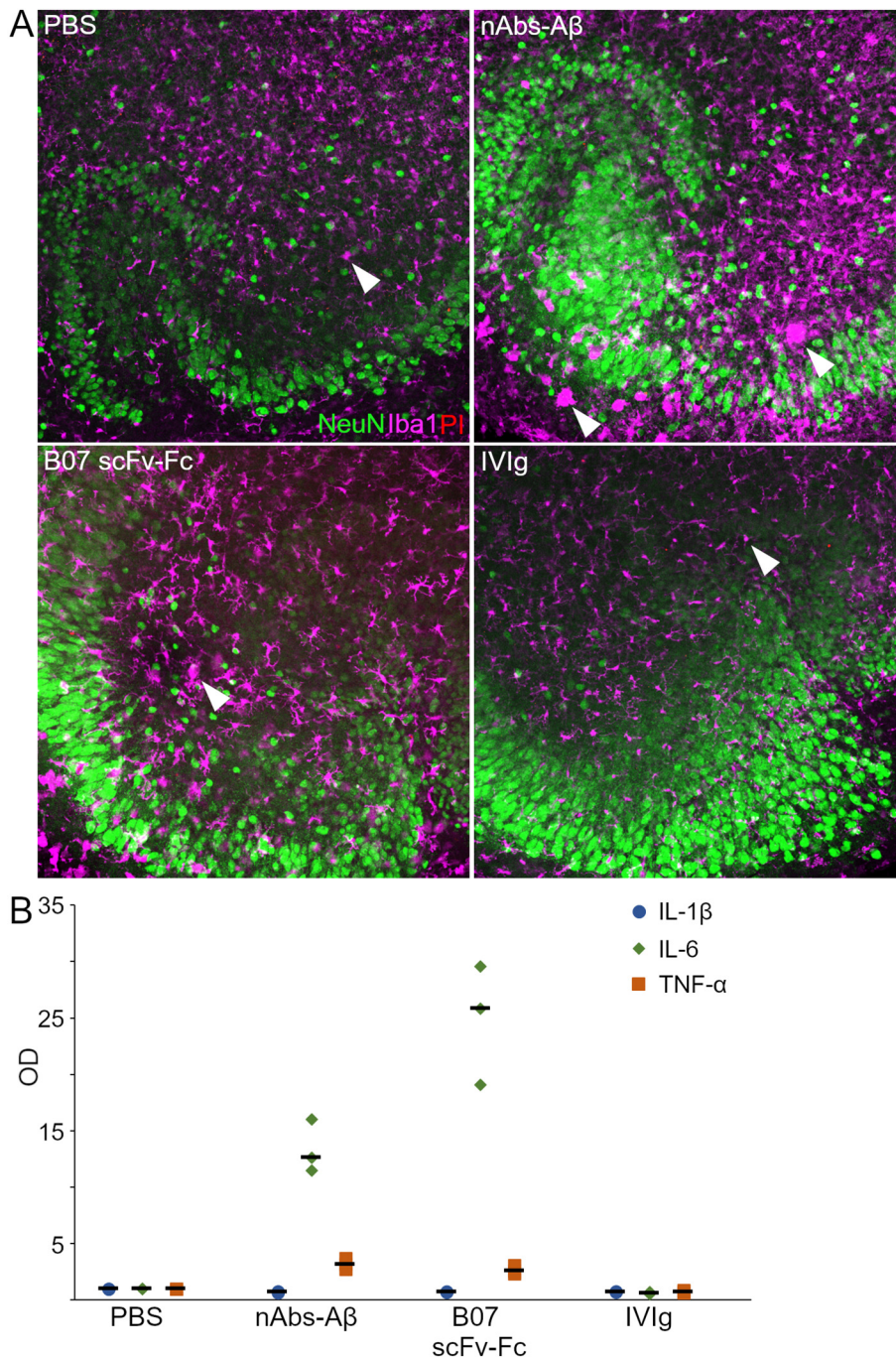


Fig. 7. Effects of antibody treatment on organotypic hippocampal slice cultures. OHSCs were incubated for eight days with 0.05 μ M antibody (B07 scFv-Fc, nAbs-A β , or IVIg). **(A)** For the immunohistochemical analysis, OHSCs were stained with propidium iodide (PI, red) and fixated in 4% PFA. Afterwards, slices were stained with anti-NeuN to visualize neurons (green) and anti-Iba1 to visualize microglial cells (magenta). Each figure represents one of 18 OHSCs as each condition was tested three independent times ($n = 3$) on six OHSCs. **(B)** Supernatants were collected and further analyzed by ELISA for the release of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α . For immunofluorescence representative images are shown. Cytokine ELISA with supernatants were carried out with three independent replicates. Single data points are shown next to the median (marked as lines). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

are also tested as IgM-like alternatives for therapeutic indications (de Jong et al., 2016).

Limitation of the study

It is possible that some effects, including cytokine release, could occur as a result of the MAHA (murine anti-human antibody) reaction as we used murine neuronal and microglial cell cultures as well as murine OHSCs (Bournazos et al., 2014; Loeffler et al., 2012). To test further effects - such as neuroprotective functions- and the interspecies tolerance, the human-derived antibody could be modified to a human-mouse chimeric antibody for more suitable *ex vivo* and *in vivo* experiments in mice (Brüggemann et al., 1989). As another possibility, mice expressing human Fc γ receptors could allow a better understanding of the downstream effects of ADCC and ADCP (Smith et al., 2012) although it is controversially discussed whether mice Fc γ receptors on human IgG function differently (Dekkers et al., 2017). Further human cell culture experiments could improve the conclusions of this study without possible interspecies reactions.

Although, we could show significances between the groups by using the Kruskal-Wallis-test with 5 % level, the power of pairwise comparisons with Dunn's test were negatively impaired by the small sample sizes with $n = 3$ and $n = 4$, respectively. In total, the test power is strongly limited. We therefore encourage further research with increased sample sizes. However, the effect strength between A β and B07 scFv-Fc in the fibrillation assay (Fig. 3 and Table 3) is remarkably strong. With such a small

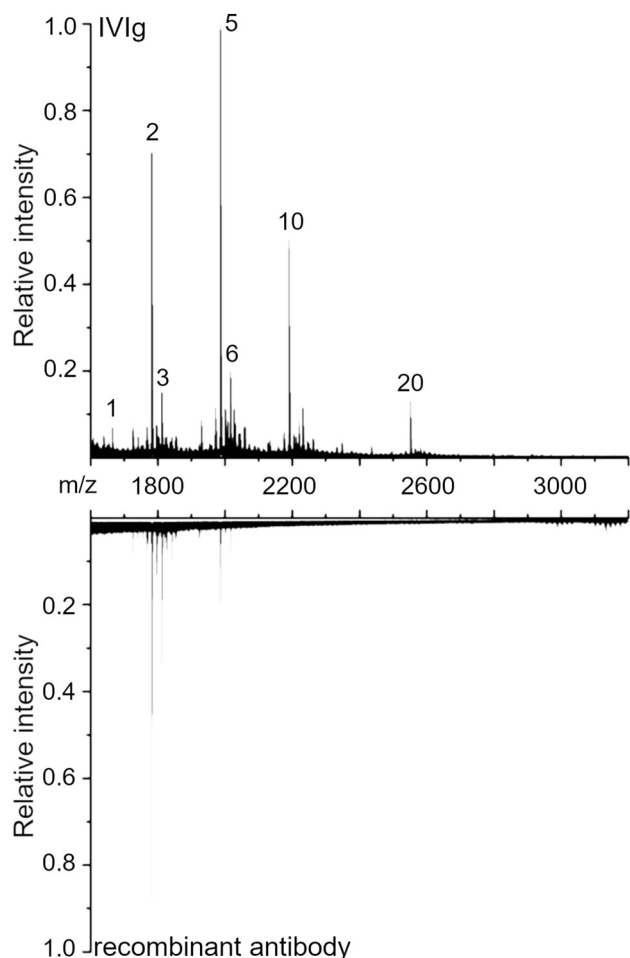


Fig. 8. Glycosylation pattern of recombinant IgG₁. MALDI-TOF measurements were executed to investigate the Fc N-glycosylation pattern of the produced recombinant antibodies B06, B07, and C07 IgGs as well as the B07 scFv-Fc antibody in comparison to the naturally occurring detectable pattern in the IVIg preparations. Mass values are presented on the x-axis, relative intensities calculated by normalizing to the total peak intensity as a measure for the relative frequency are presented on the y-axis. In contrast to IVIg, which exhibited at least 13 different Fc N-glycans, the recombinant antibody species showed an altered glycosylation pattern; however, among themselves, a similar glycosylation pattern of predominantly five glycans 1–3, 5–6 (A2G0, FA2G0, A2G1, FA2G1, and A2G2) was observed. Noticeably, sialylated glycans were missing from the Fc N-glycosylation pattern of the recombinant antibodies, marked as glycans 10 and 20. As all recombinant antibodies exhibit the same Fc N-glycosylation pattern, only one was plotted next to IVIg.

sample size we were able to show the positive effect of the multimerized antibody on the inhibition of A β fibrillation, the key step to neurotoxic A β forms.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Animal care procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the University of Marburg and University Duisburg-Essen.

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIALS

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

DECLARATION OF INTEREST

AF and PK are partners of the industrial provider Yumab GmbH. RD is a co-inventor of a patent which belongs to the Philipps-University of Marburg. The authors declare no further conflict of interest concerning the content of the article.

ACKNOWLEDGEMENTS

We further thank Dr. Mike Hasenberg and Bernd Walkenfort (Imaging Center Essen, Electron Microscopy Unit, University Hospital of Essen, Essen, Germany) for their support with electron microscopy.

FUNDING

This work was supported by an unrestricted grant of the Ernst und Margot Faber-Stiftung, Marburg, Germany.

REFERENCES

- Albus A, Gold M, Bach J-P, Burg-Roderfeld M, Jördens M, Kirchhein Y, Kronimus Y, Mengel D, Zerr I, Dodel R (2018) Extending the functional characteristics of naturally occurring autoantibodies against β -Amyloid, Prion Protein and α -Synuclein. *PLoS ONE* 13:e0202954.
- Albus A, Jördens M, Möller M, Dodel R (2019) Encoding the sequence of specific autoantibodies against beta-amyloid and alpha-synuclein in neurodegenerative diseases. *Front Immunol* 10:2033.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgemeine Zeitschrift für Psychiatrie und psychisch-gerichtliche Medizin*:146–148.
- Alzheimer's Association (2019) 2019 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dementia* 15:321–387.
- 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.
- Bournazos S, DiLillo DJ, Ravetch JV (2014) Humanized mice to study Fc γ R function. *Curr Top Microbiol Immunol* 382:237–248.
- Brüggemann M, Winter G, Waldmann H, Neuberger MS (1989) The immunogenicity of chimeric antibodies. *J Exp Med* 170:2153–2157.
- Button KS, Ioannidis JPA, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ESJ, Munafò MR (2013) Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 14(5):365–376.
- Cattepoel S, Schaub A, Ender M, Gaida A, Kropf A, Guggisberg U, Nolte MW, Fabri L, Adlard PA, Finkelstein DI, Bolli R, Miescher SM (2013) Intravenous immunoglobulin binds beta amyloid and modifies its aggregation, neurotoxicity and microglial phagocytosis in vitro. *PLoS ONE* 8.
- Chakrabarty P, Jansen-West K, Beccard A, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Verbeeck C, Zubair AC, Dickson D, Golde TE, Das P (2010) Massive gliosis induced by interleukin-6 suppresses A β deposition in vivo: evidence against inflammation as a driving force for amyloid deposition. *FASEB J* 24:548–559.
- Chang MM, Gaidukov L, Jung G, Tseng WA, Scarcelli JJ, Cornell R, Marshall JK, Lyles JL, Sakorafas P, Chu A-H, Cote K, Tzvetkova B, Dolatshahi S, Sumit M, Mulukutla BC, Lauffenburger DA, Figueroa B, Summers NM, Lu TK, Weiss R (2019) Small-molecule control of antibody N-glycosylation in engineered mammalian cells. *Nat Chem Biol* 15(7):730–736.
- Cliff N (1993) Dominance statistics: Ordinal analyses to answer ordinal questions. *Psychol Bull* 114(3):494–509.
- Correia I (2010) Stability of IgG isotypes in serum. *MAbs* 2:221–232.
- Cuesta ÁM, Sainz-Pastor N, Bonet J, Oliva B, Álvarez-Vallina L (2010) Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. *Trends Biotechnol* 28:355–362.

- Dekkers G, Bentlage AEH, Stegmann TC, Howie HL, Lissenberg-Thunnissen S, Zimring J, Rispen T, Vidarsson G (2017) Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs* 9:767–773.
- Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O, Neff F, Andrei-Selmer L-C, Röskam S, Stüer C, Al-Abed Y, Noelker C, Balzer-Geldsetzer M, Oertel W, Du Y, Bacher M (2011) Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 31:5847–5854.
- Fernández-Arjona MM, Grondona JM, Granados-Durán P, Fernández-Llebrez P, López-Ávalos MD (2017) Microglia morphological categorization in a rat model of neuroinflammation by hierarchical cluster and principal components analysis. *Front Cell Neurosci* 11.
- Goetze AM, Liu YD, Zhang Z, Shah B, Lee E, Bondarenko PV, Flynn GC (2011) High-mannose glycans on the Fc region of therapeutic IgG antibodies increase serum clearance in humans. *Glycobiology* 21:949–959.
- Gold M, Mengel D, Röskam S, Dodel R, Bach J-P (2013) Mechanisms of action of naturally occurring antibodies against β -amyloid on microglia. *J Neuroinflammation* 10:5.
- Gómez-Guerrero C, López-Armada MJ, González E, Egido J (1994) Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF-alpha and IL-6, and proliferation. *J Immunol* 153:5247–5255.
- Istrin G, Bosis E, Solomon B (2006) Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res* 84:434–443.
- de Jong RN, Beurskens FJ, Verploegen S, Strumane K, van Kampen MD, Voorhorst M, Horstman W, Engelberts PJ, Oostindie SC, Wang G, Heck AJR, Schuurman J, Parren PWI (2016) A novel platform for the potentiation of therapeutic antibodies based on antigen-dependent formation of IgG hexamers at the cell surface. *PLoS Biol* 14 e1002344.
- Kaneko Y, Nimmerjahn F, Ravetch JV (2006) Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313:670–673.
- Kronimus Y, Dodel R, Galuska SP, Neumann S (2019) IgG Fc N-glycosylation: Alterations in neurologic diseases and potential therapeutic target? *J Autoimmun* 96:14–23.
- Kronimus Y, Dodel R, Neumann S (2018) A quantitative view on naturally occurring autoantibodies in neurodegenerative diseases. *J Neurol Neurochem* 3:5–11.
- Liu Y-H, Wang Y-R, Xiang Y, Zhou H-D, Giunta B, Mañucat-Tan NB, Tan J, Zhou X-F, Wang Y-J (2015) Clearance of amyloid-beta in Alzheimer's disease: shifting the action site from center to periphery. *Mol Neurobiol* 51:1–7.
- Loeffler DA, Smith LM, Klaver AC, Brzezinski HA, Morrison EI, Coffey MP, Steficek BA, Cook SS (2012) Development of antihuman IgG antibodies and hematologic deficits but not clinical abnormalities in C57BL/6 mice after repeated administration of human intravenous immunoglobulin. *Comp Med* 62:31–36.
- Luo Y, Lu Z, Raso SW, Entrican C, Tangarone B (2009) Dimers and multimers of monoclonal IgG1 exhibit higher in vitro binding affinities to Fc gamma receptors. *MAbs* 1:491–504.
- Lutz HU (2012) Naturally occurring antibodies. *Adv Exp Med Biol* 750: vii–x.
- Mader A, Chromikova V, Kunert R (2013) Recombinant IgM expression in mammalian cells: A target protein challenging biotechnological production. *ABB* 4:38–43.
- Mengel D, Röskam S, Neff F, Balakrishnan K, Deuster O, Gold M, Oertel WH, Bacher M, Bach JP, Dodel R (2013) Naturally occurring autoantibodies interfere with β -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry* 3 e236.
- Nelson PT, Alafuzoff I, Bigio EH, Bouras C, Braak H, Cairns NJ, Castellani RJ, Crain BJ, Davies P, Tredici KD, Duyckaerts C, Frosch MP, Haroutunian V, Hof PR, Hulette CM, Hyman BT, Iwatsubo T, Jellinger KA, Jicha GA, Kövari E, Kukull WA, Leverenz JB, Love S, Mackenzie IR, Mann DM, Masliah E, McKee AC, Montine TJ, Morris JC, Schneider JA, Sonnen JA, Thal DR, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Wisniewski T, Woltjer RL, Beach TG (2012) Correlation of Alzheimer disease neuropathologic changes with cognitive status: a review of the literature. *J Neuropathol Exp Neurol* 71:362–381.
- Orgozo J-M, Gilman S, Dartigues J-F, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C (2003) Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology* 61:46–54.
- Pardridge WM (2005) The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* 2:3–14.
- Polumuri SK, Haile LA, Ireland DDC, Verthelyi D (2018) Aggregates of IVIG or Avastin, but not HSA, modify the response to model innate immune response modulating impurities. *Sci Rep* 8:11477.
- Rajewsky K (1996) Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381:751–758.
- Raju TS, Lang SE (2014) Diversity in structure and functions of antibody sialylation in the Fc. *Curr Opin Biotechnol* 30:147–152.
- Richter M, Vidovic N, Biber K, Dolga A, Culmsee C, Dodel R (2019) The neuroprotective role of microglial cells against amyloid beta-mediated toxicity in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Pathol*.
- Roettger Y, Zerr I, Dodel R, Bach JP (2013) Prion peptide uptake in microglial cells—the effect of naturally occurring autoantibodies against prion protein. *PLoS ONE* 8 e67743.
- Seifert M, Küppers R (2016) Human memory B cells. *Leukemia* 30:2283–2292.
- Sevigny J, Chiao P, Bussièrè T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M, Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulska A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A (2016) The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature* 537:50–56.
- Skovronsky DM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2006) Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol* 1:151–170.
- Smith P, DiLillo DJ, Bournazos S, Li F, Ravetch JV (2012) Mouse model recapitulating human Fc γ receptor structural and functional diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:6181–6186.
- van Dyck CH (2018) Anti-amyloid- β monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: pitfalls and promise. *Biol Psychiatry* 83:311–319.
- Washburn N, Schwab I, Ortiz D, Bhatnagar N, Lansing JC, Medeiros A, Tyler S, Mekala D, Cochran E, Sarvaiya H, Garofalo K, Meccariello R, Meador JW, Rutitzky L, Schultes BC, Ling L, Avery W, Nimmerjahn F, Manning AM, Kaundinya GV, Bosques CJ (2015) Controlled tetra-Fc sialylation of IVIg results in a drug candidate with consistent enhanced anti-inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1297–E1306.
- Wei X, Roettger Y, Tan B, He Y, Dodel R, Hampel H, Wei G, Haney J, Gu H, Johnstone BH, Liu J, Farlow MR, Du Y (2012) Human anti-prion antibodies block prion peptide fibril formation and neurotoxicity. *J Biol Chem* 287:12858–12866.

APPENDIX A. SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.03.006>.

(Received 12 August 2020, Accepted 2 March 2021)
(Available online xxxx)