

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

Sequenzierung der Antigen-bindenden Region von natürlich
vorkommenden alpha-Synuklein-reaktiven Autoantikörpern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Marit Jördens,

aus Gifhorn

Marburg, 2023

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
nicht-kommerziell
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
4.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/legalcode.de>



Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am: 26.05.2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. D. Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. R. Dodel

1. Korreferent: Prof. Dr. R. Lill

Anmerkung:

Die in dieser Arbeit verwendeten Daten und Abbildungen sind zum Teil so oder in abgewandelter Form ebenfalls in der Publikation

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, 2033.

zu finden. Diese Publikation wurde in einer geteilten Erstautorenschaft (*) mit Frau Dr. rer. nat. Albus erstellt. Alle Experimente dieser Publikation wurden von Frau Dr. Albus und mir durchgeführt und ausgewertet. Alle Abbildungen und Tabellen wurden von Frau Dr. Albus und mir erstellt. Das Manuskript haben Frau Albus und ich gemeinsam mit Herrn Prof. Dodel entworfen und geschrieben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1. Einleitung.....	1
1.1 Idiopathisches Parkinson Syndrom	1
1.1.1 Definition des idiopathischen Parkinson Syndroms.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	2
1.1.3 Pathophysiologie und Ätiologie.....	2
1.1.4 Klinisches Bild	4
1.1.5 Diagnostik.....	5
1.1.6 Therapie	7
1.2 Immunisierung gegen α -Syn in Tierversuchen und klinischen Studien.....	8
1.2.1 Aktive Immunisierung	8
1.2.2 Passive Immunisierung.....	9
1.3 Natürlich vorkommende Autoantikörper.....	10
1.3.1 Physiologische natürlich vorkommende Autoantikörper.....	10
1.3.2 α -Syn-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper	11
1.4 B1-Lymphozyten.....	12
1.5 Ziel des Projekts	13
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material	16
2.1.1 Verwendete Geräte	16
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.3 Chemikalien.....	18
2.1.4 Puffer, Lösungen und Zusätze	18
2.1.5 Enzyme	19
2.1.6 Peptide	19
2.1.7 Antikörper	20
2.1.8 Oligonukleotide	20
2.1.9 Kommerziell erworbene Kits und Lösungen.....	22
2.1.10 Software	22
2.1.11 Dienstleister	22

2.2 Methoden.....	22
2.2.1 Fluorescein-Markierung von alpha-Synuklein.....	22
2.2.2 Blutproben und Spender	23
2.2.3 Isolation von PBMCs mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	23
2.2.4 B-Zell-Gewinnung.....	24
2.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe und Färbung	26
2.2.6 Prinzip der Durchflusszytometrie	28
2.2.7 Einzelzell-Sortierung.....	30
2.2.8 Einzelzell RT-PCR und Immunglobulin-Gen Amplifikation	31
2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese	36
2.2.10 Sequenzierung und Klonierung	37
2.2.11 Etablierung eines Protokolls zur Fibrillation von α -Syn.....	38
2.2.12 Auswertung und Statistik des Fibrillations-Assays.....	39
3. Ergebnisse	40
3.1 Übertragung einer Gating-Strategie auf den MoFlo Astrios Cell Sorter	40
3.2 Überprüfung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese	43
3.3 Sequenzen und phylogenetische Analyse.....	44
3.4 Fibrillationskinetik	48
4. Diskussion.....	49
4.1 Kontroverse um humane nAbs-produzierende Zellen.....	50
4.2. Fehlersuche und -behebung während der Etablierung des RT-PCR-Protokolls.....	51
4.3 Einordnung der Ergebnisse der phylogenetischen Analyse	52
4.4 Herausforderungen bei der Etablierung eines Protokolls zur Fibrillation von α -Syn.....	53
4.5 Ausblick	54
5. Zusammenfassung.....	56
6. Summary	58
7. Referenzen	60
8. Anhang	77
8.1 Danksagung	77
8.2 Verzeichnis der Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg	78
8.3 Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
8.4 Ehrenwörtliche Erklärung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹²³ I-FP-CIT	[123I]-2β-carbomethoxy-3β-(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)nortropane
α-Syn	α-Synuklein
Abb.	Abbildung
AD	engl. <i>Alzheimer's Disease</i> (Alzheimer Erkrankung)
Aβ	Amyloid-beta
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i> (Proteine der CD-Klassifizierung)
cDNA	engl. <i>circular desoxyribonucleinacid</i> (zirkuläre Desoxyribonukleinsäure)
CDRs	engl. <i>complementarity determining regions</i> (Komplementaritäts-bestimmende Domänen)
COVID-19	engl. <i>Coronavirus Disease 2019</i> (Coronavirus Erkrankung 2019)
DAT	Dopamin-Transporter
DS	engl. <i>developability score</i> (Punktzahl für "Entwickelbarkeit")
DTT	Dithiothreitol
EDTA	engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i> (Ethylendiamintetraessigsäure)
EDTA-Na2	engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid disodium salt solution</i> (Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalzlösung)
Einzelzell-RT-PCR	Einzelzell-Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (antikörperbasiertes Nachweisverfahren)
FACS	engl. <i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i> (Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung)
FCS	engl. <i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
F-dopa	[18F]-fluoro-L-dopa
FITC	Fluorescein-Isothiocyant
FSC	engl. <i>Forward Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
GABA	engl. <i>gamma aminobutyric acid</i> (Gamma Aminobuttersäure)
GI	engl. <i>germinality index</i> (Index zur Bewertung Keimbahnen Übereinstimmung)
H ₂ O	Wasser
HEK293-Zellen	engl. <i>human embryonic kidney cell line 293</i> (humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293)

h α -Syn	humanes alpha Synuklein
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IgH	engl. <i>immunoglobulin heavy chains</i> (schwere Ketten der Antikörper)
IGHV	engl. <i>Immunoglobulin heavy chain variable region</i> (variable Bereiche der schweren Ketten)
IGKV	engl. <i>Immunoglobulin kappa chain variable region</i> (variable Bereiche der kappa Ketten)
IGLV	engl. <i>Immunoglobulin lambda chain variable region</i> (variable Bereiche der Lambda Ketten)
Ig κ	leichte Ketten des Immunglobulins vom Subtyp kappa
Ig λ	leichte Ketten vom Subtyp lambda
IPS	idiopathisches Parkinson Syndrom
IVIG	Intravenöse Immunglobuline der Klasse IgG
\bar{L}	arithmetischer Mittelwert der Leerwerte
L-DOPA	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
MDS	Movement Disorder Society
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
min	Minuten
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
μ M	Mikromolar
mM	Millimolar
mRNA	engl. <i>messenger ribonuclein acid</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
nAbs	engl. <i>Naturally occurring autoantibodies</i> (natürlich vorkommende Autoantikörper)
nAbs- α -Syn	engl. <i>alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies</i> (alpha-Synuklein-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper)
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
\bar{P}	arithmetischer Mittelwert der Probenmesswerte
$\bar{P}_0 - \bar{L}_0$	Differenz aus dem arithmetischen Mittelwert der Probenmesswerte zum Zeitpunkt t=0 und dem arithmetischen Mittelwert der Leerwerte zum Zeitpunkt t=0 (Bezugswert)

PBMCs	engl. <i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF- β	engl. <i>Platelet-Derived Growth Factor-β Promotor</i> (Thrombozyten-abgeleiteter Wachstumsfaktor- β -Promotor)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PI	engl. <i>probability index</i> (Wahrscheinlichkeitsindex)
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PTM	post-translationale Modifikation
RNA	engl. <i>Ribonucleinacid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SARS-CoV-2	engl. <i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i> (Schweres Akutes Respiratorisches Syndrom durch das Coronavirus 2)
Sek.	Sekunden
SN	lat. <i>Substantia nigra</i>
SNc	lat. <i>Substantia nigra Pars compacta</i>
SPECT	Singlephotonen-Emissionscomputer-Tomographie
SSC	engl. <i>Sideward Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
t	lat. <i>tempus</i> (Zeit)
TCS	engl. <i>transcranial sonography</i> (transkranielle Sonographie)
Temp.	Temperatur
TFA-Salz	Trifluoressigsäure-Salz
Thalamus VA/VL	lat. <i>Nucleus ventralis anterior</i> und <i>Nucleus ventralis lateralis</i> des Thalamus
THS	Tiefen-Hirn-Stimulation
ThT	Thioflavin-T
U	engl. <i>unified atomic mass unit</i> (atomare Masseneinheit)
UKBBS	United Kingdom Brain Bank Society
Wdh	Wiederholungen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung des indirekten und direkten motorischen Signalweges der Basalganglienschleife.	4
Abb. 2: Nach dem ersten Schritt der Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Biocoll entstandene Fraktionen.	24
Abb. 3: Ablauf der B-Zell-Gewinnung mit Hilfe von STEMCELL's "EasySep™ - Human B-Cell Enrichment kit without CD43 Depletion".	26
Abb. 4: Emissionsspektren der benutzten Farbstoffe.	28
Abb. 5: Hydrodynamische Fokussierung, ein Prozess zur Zell-Vereinzelung.	29
Abb. 6: Funktionsweise eines FACS-Gerätes.	30
Abb. 7: Entwicklung einer Gating-Strategie an einer ungefärbten Probe.	41
Abb. 8: Gating-Strategie an einer gefärbten Probe.	42
Abb. 9: Repräsentatives Beispiel für ein Gel-Bild.	43
Abb. 10: Gel-Bild nach erfolgloser primärer PCR.	44
Abb. 11: Prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Keimbahn-Gen-Familien.	47
Abb. 12: Fibrillationskinetik des ThT-Fibrillations-Assays mit α -Syn (n=3).	48

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zusammensetzung des “EasySep™ Human B-Cell Enrichment Cocktail without CD43 Depletion”.....	25
Tab. 2: Exzitations- und Emissionsmaxima der sechs benutzten Fluoreszenzfarbstoffe.....	27
Tab. 3: Zusammensetzung des „RT-Mastermixes“.....	31
Tab. 4: RT-Protokoll.....	31
Tab. 5: „PCR-Mastermixe“ für die primäre PCR von IgH Igκ, Igλ und β-Aktin.....	32
Tab. 6: Primer-Zusammensetzung für die primäre PCR.....	33
Tab. 7: Protokolle für die primäre PCR der IgH und Igκ, sowie Igλ und β-Aktin.....	34
Tab. 8: Primer-Zusammensetzung für die sekundäre PCR.....	35
Tab. 9: Protokolle für die sekundäre PCR der schweren, kappa- und lambda-Ketten.....	36
Tab. 10: Ergebnisse der Plausibilitätsprüfung und Analyse der Sequenzen durch die Yumab GmbH.....	46

1. Einleitung

1.1 Idiopathisches Parkinson Syndrom

Mehr als 200 Jahre ist es her, dass James Parkinson im Jahr 1817 in seinem „Essay on the shaking palsy“ („Abhandlung über die Schüttellähmung“), erstmals die Symptom-Trias, bestehend aus Rigor, Tremor und Akinese, der Erkrankung zusammenfasste, die später einmal nach ihm benannt werden sollte (Parkinson 2002). Auch wenn seitdem einiges an Wissen über die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung hinzugekommen ist, kann Betroffenen noch immer keine krankheitsmodifizierende Therapie angeboten werden.

1.1.1 Definition des idiopathischen Parkinson Syndroms

Bei dem idiopathischen Parkinson Syndrom (= IPS) handelt es sich um eine chronisch progrediente neurodegenerative Erkrankung, die strikt vom so genannten Parkinson Syndrom abgegrenzt werden muss. Die Bezeichnung Parkinson Syndrom wiederum bezieht sich nicht auf eine einheitliche Erkrankung, sondern stellt vielmehr einen Oberbegriff zur Sammlung aller Ätiologien dar, welche das klinische Symptombild der Bradykinese, sowie mindestens eines der folgenden, in unterschiedlicher Ausprägung auftretenden Kardinalsymptome Rigor, Tremor und posturale Instabilität aufweisen (Deuschl et al. 2020).

Laut der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie können die Parkinson Syndrome in vier Gruppen unterteilt werden (Deutsche Gesellschaft für Neurologie 2016):

1. idiopathisches Parkinson Syndrom
2. genetische Formen des Parkinson Syndroms
3. Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson Syndrome), wie:
 - Multisystematrophie,
 - progressive supranukleäre Blickparese,
 - Demenz vom Lewy-Körper-Typ und
 - kortikobasale Degeneration.
4. Symptomatische (sekundäre) Parkinson Syndrome.

Im Folgenden wird ausschließlich auf das IPS eingegangen, da es sich hierbei mit ca. 60 bis 75% um die häufigste Ätiologie des Parkinson-Syndroms handelt (Hughes et al. 1992).

1.1.2 Epidemiologie

Nach der Alzheimer-Erkrankung ist das IPS die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, deren Prävalenz aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung weiter zunehmen wird (Rijk et al. 2000; Dorsey et al. 2007; Mhyre et al. 2012). Das IPS tritt in allen ethnischen Gruppen auf, allerdings gibt es geographische Unterschiede in der Prävalenz (Alves et al. 2008). Bei 4% aller Patientinnen und Patienten mit der Parkinson Krankheit treten erste Symptome schon vor dem 50. Lebensjahr auf (van den Eeden et al. 2003). Das Lebenszeitrisiko für das IPS beträgt ungefähr 2%, wobei die Wahrscheinlichkeit zu erkranken mit zunehmendem Alter steigt (Elbaz et al. 2002). So liegt die Prävalenz in der Altersgruppe von über 65 Jährigen bei 1 bis 2% und steigt auf 3 bis 5% in der Altersgruppe der über 85 Jährigen (Alves et al. 2008). Aufgrund des demographischen Wandels nimmt nicht nur die gesellschaftliche, sondern auch die ökonomische Bedeutung dieser Erkrankung stetig zu (Dorsey et al. 2018).

In Anbetracht der aktuellen Pandemie mit dem Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (= SARS-CoV-2) und der hohen Fallzahlen der Coronavirus Disease 2019 (= COVID-19), erscheint es möglich, dass es als Folge der systemischen Entzündungsreaktion zur Neuroinflammation mit erhöhter Anfälligkeit für neurologische Syndrome und dadurch in den kommenden Jahren und Jahrzehnten zu einer weltweit steigenden Inzidenz von neurodegenerativen Erkrankungen kommen wird (Felice et al. 2020). Unter Beachtung der zwei-Treffer-Hypothese des IPS, die besagt, dass eine initiale Schädigung, zum Beispiel durch ein neurotropes Virus, das Gehirn anfällig für altersbedingte Veränderungen macht und so zum IPS führen könnte, erscheint das häufige Auftreten einer Hyposmie oder gar Anosmie bei einer Erkrankung mit COVID-19 besonders interessant (Beauchamp et al. 2020), zumal ein Verlust des Geruchsinns das häufigste prodromale Symptom des IPS repräsentiert (Haehner et al. 2009).

1.1.3 Pathophysiologie und Ätiologie

Die vollständige Pathogenese des IPS ist trotz intensiver Forschung in diese Richtung noch immer nicht bekannt. Dem ungeachtet scheint das Protein α -Synuklein (= α -Syn) eine zentrale Rolle zu spielen. Insbesondere wird diese Rolle durch die Entdeckung untermauert, dass eine Duplikation, Triplikation oder Punktmutation im α -Syn-kodierenden Gen familiäre Formen des Parkinson Syndroms hervorrufen (Polymeropoulos et al. 1997; Singleton et al. 2003). Intra neurale Protein-Ablagerungen, welche hauptsächlich aus aggregiertem und fehlgefaltetem α -Syn bestehen (Devine et al. 2011) sind allgemein als Lewy-Körper bekannt und neuropathologisch charakteristisch für das IPS (Lewy 1914). Das kleine, aus 140 Aminosäuren

bestehende Protein α -Syn liegt normalerweise in einer ungefalteten Konformation vor (Weinreb et al. 1996), während es in den Lewy-Körpern aufgrund von inkorrekt posttranslationaler Modifikation eine fibrilläre Konformation einnimmt (Serpell et al. 2000). Die physiologische Aufgabe von α -Syn, welches vornehmlich an den präsynaptischen Endigungen exprimiert wird (Maroteaux et al. 1988; Withers et al. 1997), ist noch nicht vollständig verstanden, es wird jedoch vermutet, dass es sowohl in den präsynaptischen Vesikel-Transport als auch in den Prozess der synaptischen Plastizität involviert ist (Abeliovich et al. 2000).

Die Lewy-Körper schädigen die dopaminergen Neurone in der Substantia nigra (= SN) durch einen noch unbekannt Mechanismus, wobei ein Zusammenhang mit oxidativem Stress und synaptischer sowie mitochondrialer Dysfunktion diskutiert wird (Obeso et al. 2010; Hirsch 2009). Diese Schädigungen führen letztendlich zum Untergang dieser dopaminergen Neurone und damit zur Störung der Funktion der Basalganglien durch ein Ungleichgewicht der Neurotransmitter (DeLong und Wichmann 2007).

Dass Dopamin bzw. der Mangel an Dopamin eine wichtige Rolle in der Entstehung der Symptome des IPS spielt, ist schon seit langer Zeit bekannt. Nachdem Carlsson im Jahr 1957 herausfand, dass es sich bei Dopamin nicht nur um die Vorstufe zur Synthese von Norepinephrin, sondern ebenfalls um einen Neurotransmitter handelt, entwickelte er ein Protokoll, welches den quantitativen Nachweis von Dopamin im Gehirn erlaubt (Carlsson et al. 1958). Die höchsten Dopamin-Konzentrationen konnte er hierbei in den Basalganglien nachweisen (Carlsson 1959). Bei seinen Experimenten mit dem Antisymphotonikum Reserpin, welches die Wiederaufnahme von Dopamin und Noradrenalin hemmt, entdeckte er, dass motorische Symptome resultierten, die denen des IPS sehr ähnelten und dass diese Symptome sich durch L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (= L-DOPA) antagonisieren ließen (Carlsson et al. 1957).

Durch diese Entdeckungen gerieten auch die Basalganglien und ihre Verschaltung immer mehr in den Fokus der Forschung. Sie befinden sich im Mittelhirn und sind über ein komplexes Transmitter-reguliertes System aus Inhibition und Disinhibition (siehe (= s.) Abbildung 1 (=Abb. 1)) (Albin et al. 1989; Crossman 1989) nicht nur an der Steuerung von Bewegungen, sondern auch an Lernprozessen, Kognition und vielem mehr beteiligt (Wise et al. 1996; Chakravarthy et al. 2010; Alexander et al. 1986).

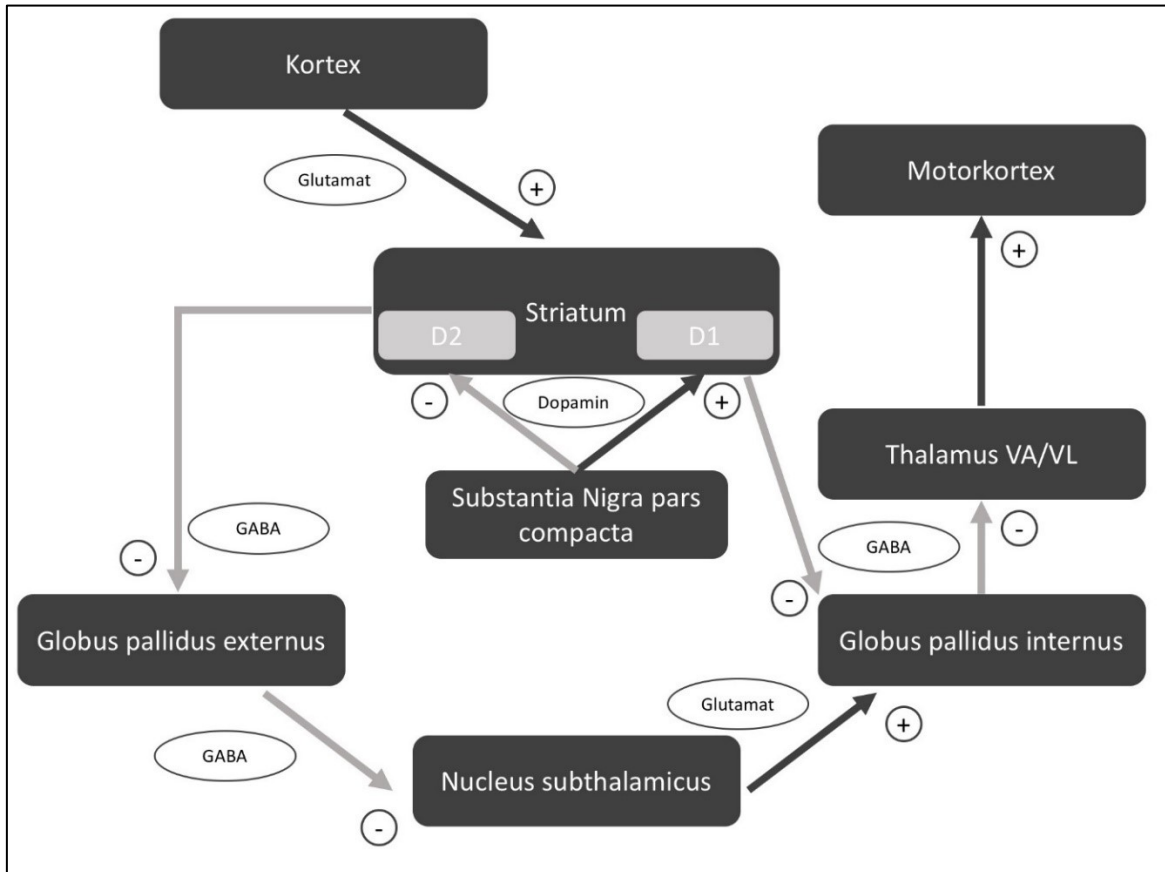


Abb. 1: Schematische Darstellung des indirekten und direkten motorischen Signalweges der Basalganglienschleife.

Die hellgrauen Pfeile bezeichnen dabei die inhibitorischen Projektionen und die schwarzen Pfeile exzitatorische Projektionen. Vom Kortex ausgehende Projektionen wirken über den Transmitter Glutamat erregend auf das Striatum. Dieses wird in zwei Teile unterteilt, die jeweils unterschiedliche Funktionen innehaben. Dabei haben beide Anteile gemeinsam, dass ihre Efferenzen über den Transmitter γ -Aminobuttersäure (= GABA) inhibitorisch wirken. Der eine Teil projiziert dabei zum Globus pallidus externus und wirkt über eine indirekte Verschaltung über den Nucleus subthalamicus motorisch hemmend, indem er mit aktivierenden Glutamat-Efferenzen in den Globus pallidus internus projiziert. Die zweite und direkte Verschaltung aus dem Striatum wirkt fördernd auf die Motorik über eine Hemmung der inhibitorischen GABA-Efferenzen des Globus pallidus internus in den Nucleus ventralis anterior und den Nucleus ventralis lateralis des Thalamus (= Thalamus VA/VL), welcher wiederum exzitatorische Signale an den Motorkortex aussendet. Der Substantia nigra pars compacta (= SNc) kommt innerhalb der Basalganglienschleife eine modulierende Rolle zu, indem sie Dopamin-vermittelt einerseits die indirekte, Motorik-hemmende Verschaltung inhibiert und andererseits die direkte, Motorik-fördernde Verschaltung aktiviert. Fehlen immer mehr von den dopaminergen Projektionen in das Striatum, wie beispielsweise beim IPS, so kommt es über eine verstärkte Aktivierung der indirekten Verschaltung und eine verminderte Aktivierung der direkten Verschaltung zu einer insgesamt vermehrten Aktivität des Globus pallidus internus und somit zu einer verminderten Aktivierung des Motorkortex durch den Thalamus VA/VL, was sich in der für das IPS typischen Akinese äußert (modifiziert und vereinfacht nach (Albin et al. 1989; DeLong und Wichmann 2007)).

1.1.4 Klinisches Bild

Das wohl auffälligste Symptom des IPS ist der Tremor, der 80-90% aller Patienten betrifft und meist einseitig betont mit einer Frequenz zwischen vier und sechs Hertz auftritt (Grosset et al. 2009; Jankovic 2008). Der typische Tremor des IPS ist der Ruhetremor, allerdings treten seltener

auch posturaler Tremor, Intentionstremor, sowie ein Bewegungstremor auf (Milanov 2000). Bradykinese und Rigor sind, im Gegensatz zum Tremor, Symptome, die während und vor Bewegungen beobachtet werden können. Die Bradykinese, bis hin zur Akinese, ist charakterisiert durch eine Verlangsamung von Bewegung und Schwierigkeiten bei der Planung, Initiation und Ausführung von Bewegungen (Jankovic 2008; Gelb et al. 1999). Der Rigor ist ein unwillkürlicher Anstieg des Muskeltonus (Jankovic 2008) und er betrifft 89-99% der Patienten mit IPS (Martin et al. 1973; Louis et al. 1997). In fortgeschrittenen Stadien der Erkrankungen leiden viele der Patienten außerdem unter posturaler Instabilität (Jankovic 2008).

Das IPS kann je nach dominierendem Symptom in weitere Subtypen eingeteilt werden: den Tremordominanz-Typ, den akinetisch-rigiden Typ und in den Äquivalenztyp (Jankovic et al. 1990; Marras und Lang 2013).

Aus heutiger Sicht gewinnen die nicht-motorischen Symptome des IPS, wie autonome Dysfunktionen, Schlafstörungen, kognitive Dysfunktionen, Schmerz und Gemütsstörungen (Chaudhuri et al. 2006; Chaudhuri et al. 2005; Caballol et al. 2007; Shulman et al. 2001) immer mehr an Bedeutung (Sung und Nicholas 2013), da sie schwer zu therapieren sind und sich erheblich auf die Lebensqualität der Patienten auswirken (Witjas et al. 2002; Zesiewicz et al. 2010).

Des Weiteren zählt auch die Abnahme der olfaktorischen Funktionen zu den nicht-motorischen Symptomen, welche in mehr als 90% der Fälle auftritt (Doty et al. 1988) und rückblickend oft schon Jahre vor den ersten motorischen Symptomen auffällt (Ross et al. 2008). Zudem spricht vor allem dieses Symptom nicht auf die eine dopaminerge Therapie an. Das IPS stellt sich somit klinisch als ein sehr heterogenes Krankheitsbild dar.

1.1.5 Diagnostik

Eine korrekte Diagnose des IPS und dessen Abgrenzung zu den atypischen Parkinson-Syndromen und sekundärem Parkinsonismus ist vor allem für die Prognose und die Therapie von großer Bedeutung. Die Erstdiagnose eines IPS stellt insofern eine Herausforderung dar, als dass außer der post-mortem Autopsie keine Tests zur Verfügung stehen, die eine eindeutig sichergestellte Diagnose zulassen (Lang und Lozano 1998). Daher stützt sich die Diagnose des IPS auch heute noch auf die klinische Untersuchung, auf das Vorhandensein von mindestens zwei der drei Kardinalsymptome (Bradykinese, Tremor, und Rigor), zusammengenommen mit der Abwesenheit von Ausschlusskriterien, sowie einem Ansprechen der Symptomatik auf die Therapie mit L-Dopa (Postuma et al. 2015). Da die motorischen Symptome allerdings erst dann auftreten, wenn be-

reits 50-60 % der dopaminergen Neuronen der SNc untergegangen sind, ist die Effektivität von krankheitsmodifizierenden Therapien zum Diagnosezeitpunkt meist begrenzt (Fearnley und Lees 1991).

In 2017 gab es eine Aktualisierung der zuvor üblichen diagnostischen Kriterien des IPS der United Kingdom Brain Bank Society (= UKBBS) durch die Movement Disorder Society (= MDS) (Zach et al. 2017). Eine Neuerung der MDS-Kriterien ist die Einstufung der Diagnosesicherheit in ein „klinisch definitives“ IPS und ein „klinisch wahrscheinliches“ IPS.

Auch wenn eine Bildgebung zur Diagnose des IPS nicht erforderlich ist, so kann vor allem die craniale Magnet-Resonanz-Tomographie die Abgrenzung zu den atypischen Parkinson-Syndromen erleichtern (Heim et al. 2017). Eine weitere Methode der Bildgebung zur Erkennung struktureller Veränderungen ist die transkranielle Sonographie (= TCS).

Die TCS wurde in der IPS-Diagnostik lange Zeit außer Acht gelassen, weil von der Undurchdringbarkeit des Schädelknochens ausgegangen wurde, bis erstmals 1995 von Becker ein spezifisches, hyperechogenes Areal in der SN beschrieben wurde (Becker et al. 1995). Nach weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass diese Hyperechogenität bei 90% der Patientinnen und Patienten mit IPS auftritt. Allerdings war auch bei 8-14% der gesunden Probandinnen und Probanden eine höhere Echogenität zu verzeichnen, was die Spezifität dieser diagnostischen Untersuchung einschränkt (Berg et al. 1999; Berg et al. 2005; van de Loo et al. 2010; Mehnert et al. 2010).

Weitere bildgebende Optionen, die vor allem zur Verlaufsbeurteilung geeignet sind, umfassen z.B. die Darstellung des präsynaptischen Dopamin-Transporters (= DAT) mittels [^{123}I]-2 β -carbomethoxy-3 β -(4-iodophenyl)-N-(3-fluoropropyl)nortropine (= ^{123}I -FP-CIT) Singlephotonen-Emissionscomputer-tomographie (= SPECT) oder mittels [^{18}F]-fluoro-L-dopa (= F-dopa) Positronen-Emissions-Tomographie (= PET) (Saeed et al. 2020). Über die ^{123}I -FP-CIT-SPECT und die F-dopa PET kann dabei eine Quantifizierung der dopaminergen Neurone erfolgen (Fazio et al. 2015; Kato 2007). Trotz aller Fortschritte, die es vor allem in der Bildgebung gibt, fehlt es in der Diagnostik des IPS an einem geeigneten Biomarker, der eine Diagnose vor Auftreten erster Symptome erlaubt (Delenclos et al. 2016; Rees et al. 2018).

1.1.6 Therapie

Zur Behandlung des IPS stehen aktuell Pharmakotherapie, die funktionelle stereotaktische Neurochirurgie, Tiefen-Hirn-Stimulation (= THS) sowie supportive Maßnahmen wie Physiotherapie, Sprachtherapie und Ernährungstherapie zur Verfügung. Bei keiner dieser Optionen handelt es sich jedoch um eine kausale Therapie, welche die Krankheitsprogression aufzuhalten vermag oder sogar die Krankheitsmanifestation verhindern kann (Oertel und Schulz 2016; Goedert 2001).

Derzeitige medikamentöse Therapien des IPS zielen hauptsächlich darauf ab, das dopaminerge Defizit des IPS auszugleichen und somit die motorischen Symptome weitestgehend zu kontrollieren (Birkmayer und Hornykiewicz 1961). Die einfachste Lösung das Defizit eines Stoffes zu beheben, ist es diese Substanz zu substituieren. Da Dopamin jedoch nicht in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke (= BHS) zu überwinden, wird die Substitution mit L-DOPA durchgeführt. Bei L-DOPA handelt es sich um ein sogenanntes Prodrug, welches erst durch Decarboxylierung zu Dopamin seine Wirksamkeit entfaltet (Melamed et al. 1980). Damit die Decarboxylierung von L-DOPA nicht bereits in der Peripherie stattfindet, wird L-DOPA gemeinsam mit einem peripheren Decarboxylasehemmer wie z.B. Benserazid oder Carbidopa verabreicht (Yahr 1973; Mars 1973). Die Behandlung mit L-DOPA stellt bis heute die effektivste medikamentöse Therapie der motorischen Symptome des IPS dar (Obeso et al. 2017), wenngleich es hierunter meist bereits nach einigen Jahren zu Wirkungsfluktuationen mit entsprechenden Nebenwirkungen in Form von Dyskinesien beim maximalen L-DOPA-Plasmaspiegel (Cotzias et al. 1969) sowie Akinesien beim Absinken des Plasmaspiegels kommen kann. Auch das Erreichen eines konstanten Wirkstoffspiegels stellt bei dieser Therapieform aufgrund der kurzen Halbwertszeit von L-DOPA (Nyholm et al. 2002) eine Herausforderung dar und kann zuverlässig nur mit einer Duo-DOPA-Pumpe gewährleistet werden, bei der kontinuierlich L-DOPA in das Jejunum eingeleitet wird (Eggert et al. 2008; Nyholm et al. 2003).

Gerade für Patientinnen und Patienten, die bereits in jungen Jahren die Diagnose IPS erhalten, bieten Dopaminagonisten wie z.B. Bromocriptin, Apomorphin oder Ropinirol eine anfängliche Alternative (Corrodi et al. 1973; Calne et al. 1974; Rascol et al. 2000). Durch ihre Gabe kann der Beginn der L-DOPA-Therapie hinausgezögert werden, was in Folge auch zu einem späteren Eintreten von belastenden Nebenwirkungen wie Dyskinesien führt (Rinne et al. 1998; Oertel et al. 2006).

Die THS stellt eine chirurgische Therapie dar, bei der eine oder mehrere Elektroden in spezifische Regionen des Gehirns implantiert werden. Bei fortgeschrittenem IPS und abnehmender Wirksamkeit von L-DOPA gibt es gute Evidenz für eine Verbesserung von Wirkungsfluktuationen, Dyskinesien und der Lebensqualität durch den Einsatz von THS sowohl im Globus pallidus internus als auch im Nucleus subthalamicus (Rodriguez-Oroz et al. 2005; Follett et al. 2010).

1.2 Immunisierung gegen α -Syn in Tierversuchen und klinischen Studien

In den letzten Jahren hat sich die Immunisierung gegen pathologisch aggregierte Proteine bei neurodegenerativen Erkrankungen als neuer, erfolgversprechender therapeutischer Ansatz herausgestellt (Lee und Lee 2016). Dabei lag die größte Aufmerksamkeit lange Zeit auf der Entwicklung einer Immuntherapie für die Alzheimer Erkrankung (engl. *Alzheimer's Disease* = AD), da hier das fehlgefaltete Protein Amyloid-beta extrazellulär vorliegt und somit ein geeignetes Ziel für Antikörper-Therapien darstellt (Selkoe 2001). Im Gegensatz dazu wurde lange Zeit davon ausgegangen, dass α -Syn nur intrazellulär vorkommt, sodass bei der Therapieforschung die Immuntherapien nur eine untergeordnete Rolle spielten (Chatterjee und Kordower 2019). Die Entdeckung der Existenz eines extrazellulären Reservoirs an α -Syn war daher von zentraler Bedeutung (El-Agnaf et al. 2003; Tokuda et al. 2010). Zudem gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass sich fehlgefaltetes α -Syn ähnlich wie das Prion-Protein verhalten könnte, d.h. es wird davon ausgegangen, dass pathologische α -Syn-Spezies die Fähigkeit besitzen von Zelle zu Zelle zu migrieren, dort eine Fehlfaltung und Oligomerisierung von naivem α -Syn zu induzieren und somit den Krankheitsprogress voranzutreiben (Chu und Kordower 2015; Brundin et al. 2016; Ugalde et al. 2016; Vargas et al. 2019). Dementsprechend stellt die Verhinderung der Bildung von pathologischen α -Syn-Oligomeren und α -Syn-Fibrillen sowie die Prävention der Übertragung dieser pathologischen α -Syn-Spezies mittels Immuntherapie erfolgversprechende Therapieansätze dar (Chatterjee und Kordower 2019).

1.2.1 Aktive Immunisierung

Bei der aktiven Immunisierung soll das eigene Immunsystem dazu angeregt werden, spezifische Antikörper gegen α -Syn zu bilden (Castonguay et al. 2021). Der Vorteil bei dieser Therapieform, welche in ihrer Funktionsweise wie eine Impfung anzusehen ist, wäre eine langanhaltende humorale Immunantwort (Chatterjee und Kordower 2019). Die ersten Versuche zur aktiven Immunisierung beim IPS fanden mit rekombinantem humanen α -Syn (= h α -Syn) in transgenen Mäusen statt, bei denen Wildtyp α -Syn unter dem Thrombozyten-abgeleiteten Wachstumsfaktor- β -Promotor (engl. *Platelet-Derived Growth Factor- β Promotor* = PDGF- β) im Gehirn exprimiert

wird (Masliah et al. 2005). Es konnte gezeigt werden, dass die aktiv immunisierten Mäuse Antikörper gegen α -Syn bildeten, was zu einer geringeren Akkumulation von aggregiertem α -Syn in Neuronen und damit zu weniger Neurodegeneration führte (Masliah et al. 2005). Allerdings besteht bei einer Immunisierung mit dem Peptid in voller Länge die Gefahr, dass eine autoimmune Reaktion gegen physiologisch vorkommendes α -Syn und damit neuroinflammatorische Prozesse initiiert werden (Valera und Masliah 2013). Ein weiterer Ansatz besteht daher in der aktiven Immunisierung mit kurzen immunogenen Peptiden, die das Epitop von α -Syn imitieren, die so genannten AFFITOPES[®] und so eine B-Zell-Antwort in Form von Antikörperbildung initiieren (Schneeberger et al. 2010). Allerdings sind diese Peptide zu kurz, um eine T-Zell-Antwort und damit eine Autoimmunität gegen physiologisches α -Syn hervorzurufen (Mandler et al. 2014). Das Unternehmen Affiris (Wien, Österreich) hat bereits zwei verschiedene AFFITOPES[®] (PD01A und PD03A) in klinischen Studien der Phase-1 getestet. Beide AFFITOPES[®] zeigten hierbei eine sichere Anwendung und sind in der Lage eine Antikörperbildung hervorzurufen, wobei die Immunogenität von PD03A höher ausfällt, weshalb hierfür eine Phase-2 klinische Studie in Planung ist (Volc et al. 2020; Chatterjee und Kordower 2019; Poewe et al. 2021).

1.2.2 Passive Immunisierung

Da bei der aktiven Immunisierung gegen Proteine, welche auch physiologisch vorkommen, immer die Gefahr von autoimmunen Antworten besteht, wurden Alternativen gesucht, um die humorale Immunantwort zu umgehen (Castonguay et al. 2021). Hierzu eignen sich passive Immunisierungsansätze, bei denen direkt Antikörper gegen verschiedene Spezies von α -Syn verabreicht werden (Mortada et al. 2021). Im Gegensatz zur aktiven Immunisierung müssen die Antikörper allerdings in regelmäßigen Abständen fortgesetzt verabreicht werden, da diese über die Zeit abgebaut werden. Ein weiterer Nachteil dieser Therapie besteht darin, dass Antikörper nur zu einem geringen Anteil die BHS passieren können (Brightman und Reese 1969; Yu und Watts 2013).

Aktuell befindet sich der gegen den C-Terminus von α -Syn gerichtete monoklonale Antikörper Prasinezumab in einer klinischen Phase-2 Studie (Prasad und Hung 2021; Jankovic et al. 2018). Der Vorläufer von Prasinezumab namens 9E4 zeigte in transgenen Mäusen, welche wie auch die Mäuse in Kapitel 1.2.1. α -Syn unter dem PDGF β -Promotor exprimieren, eine gute Effizienz bei der Verhinderung der Ablagerung von α -Syn und eine Reduktion der motorischen Defizite (Masliah et al. 2011).

Der monoklonale Antikörper BIIB054 ist hingegen gegen den N-Terminus von α -Syn gerichtet und weist eine α -Syn-Aggregat-Selektivität auf (Weihs et al. 2019). Aufgrund einer nicht nachzuweisenden Wirkung wurde zuletzt die klinische Studie in Phase-2 abgebrochen (Prasad und Hung 2021).

Im Kontext dieser Arbeit ist besonders der Ansatz von Huang et al. von Bedeutung. Es konnte im A53T-transgenen Maus-Modell gezeigt werden, dass die passive Immunisierung mit α -Syn-reaktiven, natürlich vorkommenden Autoantikörpern (= nAbs- α -Syn) sowohl die Konzentration von löslichem α -Syn, α -Syn-Oligomeren und intrazellulären α -Syn-Ablagerungen signifikant verringern als auch die Gedächtnisstörungen und motorischen Symptome mildern kann (Huang et al. 2019). Im A53T-Maus-Modell wird humanes α -Syn mit einer IPS-assoziierten Mutation (A53T) spezifisch in dopaminergen Neuronen überexprimiert (Chen et al. 2015).

Zusammenfassend kann der Ansatz der passiven Immunisierung, genau wie der Ansatz der aktiven Immunisierung als vielversprechender Therapieansatz angesehen werden.

1.3 Natürlich vorkommende Autoantikörper

1.3.1 Physiologische natürlich vorkommende Autoantikörper

Natürlich vorkommende Autoantikörper (= nAbs) machen bis zu zwei Drittel des menschlichen Antikörper-Pools aus (Avrameas und Ternynck 1993), wobei sie außerdem eine besondere Stellung unter allen Antikörpern einnehmen, da sie in Abwesenheit von exogener Antigenstimulation und unabhängig von spezifischer Immunisierung gebildet werden und im Serum von Individuen zirkulieren (Coutinho et al. 1995; Boyden 1966). Eine weitere Besonderheit stellt die Bildung von nAbs ohne vorausgegangene T-Zell-Aktivierung dar (Allman und Pillai 2008).

Gegenwärtig ist nicht vollständig geklärt, welche exakte Funktion nAbs innerhalb des Immunsystems einnehmen, allerdings erscheint es wahrscheinlich, dass sie die drei folgenden Bereiche abdecken:

1. First-line Abwehr

Vermutlich spielen nAbs eine wichtige Rolle bei der primären Immunreaktion (Ochsenbein et al. 1999) und somit bei der ersten Abwehr von fremden Antigenen. Dabei sind viele nAbs

polyreaktiv und können so ein weites Spektrum an Antigenen erkennen (Harindranath et al. 1993). Durch die Präsentation von Antigenen an T4-Helfer-Zellen ist es nAbs außerdem möglich eine adaptive Immunreaktion zu initiieren (Nielsen und Bendtzen 2012).

2. Immunregulation

In der Vergangenheit wurden viele verschiedene nAbs identifiziert, die sich gegen Zytokine und deren Rezeptoren richten (Hansen et al. 1995; Svenson et al. 1989; Caruso et al. 1990). Daher ist es möglich, dass nAbs den Transport (Bendtzen et al. 1990), die Halbwertszeit und sogar die Funktion von Zytokinen modulieren können (Svenson et al. 1992).

3. Homöostase

Da nAbs schon in der Frühphase der embryonalen Entwicklung entstehen (Gu et al. 1990), wird vermutet, dass sie regulierend auf die während der Embryonalentwicklung notwendigerweise stattfindenden Apoptose-Prozesse einwirken (Silverman et al. 2009). Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte dafür, dass nAbs dazu beitragen die Homöostase aufrecht zu erhalten, indem sie auf Zelloberflächen befindliches oxidiertes Phosphatidylserin (Marker für ablaufende Apoptose) opsonieren (Peng et al. 2007).

Um all diesen Funktionen gerecht werden zu können, weisen nAbs einige besondere Eigenschaften auf: Zum einen sind sie, wie oben erwähnt, polyreaktiv. Diese Polyreaktivität geht jedoch meist mit einer eher geringeren Affinität zu ihren verschiedenen Antigenen einher (Elkon und Casali 2008). Zum anderen erkennen nAbs sowohl Eigen- als auch Fremdartigene und haben eine Keimbahn-Gen-ähnliche kodierende Sequenz (Kantor et al. 1997), was vor allem für die Rolle der nAbs in der Infektabwehr von wesentlicher Bedeutung ist (Holodick et al. 2017).

1.3.2 α -Syn-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper

Die Bestimmung des nAbs- α -Syn-Titers im Serum oder Plasma von IPS-Patientinnen und -Patienten stellt insofern eine Herausforderung dar, als dass sie immer wieder zu inkonsistenten Ergebnissen im Vergleich zu gesunden Kontrollprobandinnen und -probanden führte. Die Hoffnung, mit der Bestimmung des nAbs- α -Syn-Spiegel einen aussagekräftigen Biomarker für die IPS-Diagnostik zu entdecken, bleibt somit bis dato unerfüllt (Heinzel et al. 2014). Während in mehreren Studien kein signifikanter Unterschied zwischen den Titern bei Gesunden und Erkrankten gefunden werden konnte (Papachroni et al. 2007; Smith et al. 2012; Woulfe et al. 2002), zeigten sich in anderen Studien erhöhte (Gruden et al. 2011; Gruden et al. 2012; Yanamandra et al. 2011), aber auch erniedrigte nAbs- α -Syn-Spiegel (Besong-Agbo et al. 2013) bei IPS-Erkrankten (Brudek et al. 2017). Die inkonsistenten Ergebnisse der Studien bezüglich der

nAbs- α -Syn-Titer könnten u.a. durch die Heterogenität der Parkinson-Erkrankung und einer damit einhergehenden unzureichenden Vergleichbarkeit der Parkinson-Patientinnen und -Patienten der verschiedenen Studien begründet sein (Maetzler et al. 2014; Heinzl et al. 2014). Auch wurde in den oben genannten Studien keinerlei Aussage über die Affinität der nAbs getroffen (Brudek et al. 2017).

Die Verknüpfung von der Messung der Konzentration und der jeweiligen Affinität bietet eine höhere Aussagekraft und da hierbei gezeigt werden konnte, dass die Spiegel hochaffiner nAbs- α -Syn im Serum von IPS-Erkrankten erniedrigt sind, kann daraus die Hypothese abgeleitet werden, dass die Fähigkeit zur Beseitigung pathologisch gefalteter α -Syn-Spezies vermindert ist (Brudek et al. 2017). Es lässt sich bisher allerdings nicht belegen, dass erniedrigte nAbs- α -Syn-Spiegel tatsächlich zur verstärkten Fehlfaltung und Ablagerung von α -Syn beitragen. Allerdings konnte, wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, in Maus-Modellen durch die Gabe von nAbs- α -Syn eine Verringerung der α -Syn-Oligomer-Konzentration und der intrazellulären α -Syn-Ablagerungen erzielt werden (Huang et al. 2019), sodass eine weitere Untersuchung des therapeutischen Potentials von nAbs- α -Syn aussichtsreich erscheint.

1.4 B1-Lymphozyten

Auch nAbs werden, genau wie alle anderen Antikörper, von B-Lymphozyten produziert. Lymphozyten machen ungefähr 30% aller Leukozyten aus, wovon wiederum 23% zu den B-Lymphozyten gehören (Berrington et al. 2005). Diese wiederum lassen sich in drei wesentliche Subtypen unterteilen: B1-Lymphozyten, folliculäre B2-Lymphozyten und B-Lymphozyten der Marginal-zone (Allman und Pillai 2008). Da nAbs aller Voraussicht nach von B1-Lymphozyten sezerniert werden, wird diese Zellpopulation tiefergehend in dieser Arbeit behandelt.

Erstmals wurden B1-Lymphozyten in autoimmunen Modellmäusen und dabei als kleine Population von B-Lymphozyten in der Milz beschrieben, welche spontan Immunglobuline der Klasse M sezernieren (Hayakawa et al. 1983). Später konnte gezeigt werden, dass es sich bei B1-Lymphozyten um die vorherrschende B-Zell-Population in den Pleura- und Peritonealhöhlen von Mäusen handelt und dass es nur selten zu einer Migration dieser Zellen in die Lymphknoten kommt (Hayakawa et al. 1985). Insgesamt machen B1-Lymphozyten 5% der gesamten B-Zell-Population in Mäusen aus (Hayakawa et al. 1984).

Das bisher angenommene humane Äquivalent zum B1-Lymphozyt in Mäusen wurde im Jahr 2011 von Griffin et al. in Nabelschnurblut und in peripherem Blut von Erwachsenen gefunden (Griffin et al. 2011). Um humane B1-Lymphozyten von anderen B-Lymphozyten-Populationen und von T-Lymphozyten zu unterscheiden, können folgende Zelloberflächenmarker (engl. *Cluster of differentiation* = CD) verwendet werden: CD3-, CD19+, CD20+, CD27+, CD43+, CD69- und CD70- (Griffin und Rothstein 2012). Einige dieser Zelloberflächenmarker wurden auch in dieser Arbeit für die Isolation von B1-Lymphozyten aus peripherem Blut verwendet.

Eine weitere Besonderheit von B1-Lymphozyten ist ihre Unabhängigkeit von T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Proliferation und der Antikörper-Sekretion sowie ihre Unfähigkeit in die Keimzentren der Lymphfollikel einzudringen, was dazu führt, dass B1-Lymphozyten keiner Affinitätsreifung unterzogen werden (Hardy 2006). Zudem exprimieren B1-Lymphozyten nur ein eingeschränktes VH-Gen-Repertoire (VH-Gene kodieren für die schweren Ketten eines Antikörpers) (Sanz et al. 1989). Anders als folliculäre B2-Lymphozyten und Marginalzonen-Zellen stammen B1-Lymphozyten nicht von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab, sondern werden in der fetalen Leber produziert und ihre de-novo-Generation ist auf die fetale und neonatale Periode begrenzt (Hayakawa et al. 1984; Hardy und Hayakawa 1994), sodass ihre Erhaltung im adulten Organismus auf Selbst-Erneuerung beruht (Hayakawa et al. 1990). Ein Großteil der von den B1-Lymphozyten produzierten Immunglobuline entfällt auf Immunglobuline der Klasse M, aber auch Immunglobuline der Klassen G und A können von diesen Zellen produziert werden (Kasaian et al. 1992).

1.5 Ziel des Projekts

Eine kausale Therapie des IPS könnte bei der zunehmend älter werdenden Bevölkerung und damit einer immer länger werdenden Erkrankungsdauer die gesundheitlichen Folgekosten dieser Erkrankung mindern, sodass die Entwicklung einer solchen Therapie nicht nur für alle Betroffenen, sondern auch für die gesamte Gesellschaft einen großen Gewinn darstellen könnte. Bisherige medikamentöse Therapien, aber auch chirurgische Therapien wie die THS, sind zwar symptomlindernd, können jedoch die Krankheitsprogression weder verhindern, noch sind sie besonders nebenwirkungsarm. Die Entwicklung einer kurativen Therapie, die eine Krankheitsprogression zu verhindern vermag, ist daher das primäre Ziel der IPS-Therapieforschung.

Wie bereits in Kapitel 1.2.2 erwähnt, könnte die passive Immunisierung mit nAbs- α -Syn ein erfolgversprechender Therapieansatz sein, da sich im Maus-Modell positive Effekte auf die

motorischen Symptome und die Gedächtnisstörungen zeigten (Huang et al. 2019). Bislang werden spezifische nAbs durch die Affinitätschromatographie von Intravenösen Immunglobulinen der Klasse IgG (= IVIG) gewonnen (Krestova et al. 2017). Auch IVIG selbst stellt schon seit längerem eine bewährte Therapie bei Autoimmunerkrankungen wie z.B. Myasthenia gravis und Multipler Sklerose dar (Lünemann et al. 2016) und wurde auch bei der Alzheimer-Erkrankung in klinischen Studien zur passiven Immunisierung getestet, allerdings in der Phase 3-Studie wegen einer zu geringen Auswirkung auf die Kognition abgebrochen (Relkin 2014; Follett et al. 2010). Da spezifische nAbs einen sehr kleinen Anteil der Bestandteile von IVIG ausmachen, könnte der limitierte Effekt auch darin begründet sein. Analog zu nAbs-A β sind auch nAbs- α -Syn in IVIG zu finden (Patrias et al. 2010). Aber auch hier ist der Anteil am gesamten Antikörperpool eher gering, sodass ein Effekt wahrscheinlich erst bei sehr hohen Dosen an IVIG zu verzeichnen wäre (Huang et al. 2019). Eine IVIG-unabhängige Bezugsquelle von nAbs- α -Syn wäre auch insofern von großem Vorteil, als dass es sich bei IVIG um eine limitierte und teure Ressource handelt, welche einzig aus aufbereiteten Blutspenden mehrerer Spenderinnen und Spender gewonnen werden kann (Stein et al. 2009). Aufgrund der geringen Halbwertszeit von Immunglobulinen der Klasse G (= IgG) (Knapp und Colburn 1990), wäre bei passiven Immunisierungsansätzen zudem eine regelmäßige Verabreichung von IVIG nötig.

Ein Ziel des Projektes war es daher, aus dem Blut von neurologisch Gesunden zunächst nAbs- α -Syn produzierende B1-Lymphozyten zu isolieren. Dazu sollte zunächst eine Aufreinigung von Frischblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation gefolgt von einer Magnetaufreinigung durchgeführt werden. Im Anschluss sollte dann ein reproduzierbares Protokoll zur Einzelzell-Sortierung der gewünschten Zellen entwickelt werden.

Ein weiteres Ziel war es, aus den gewonnenen spezifischen B1-Lymphozyten die Antigen-bindende Region zu extrahieren und zu sequenzieren, sodass es zukünftig möglich wäre, daraus einen monoklonalen Antikörper zu entwickeln. Die Antikörper-Sequenzen sollten mittels Einzelzell-Reverse Transkription-Polymerase Kettenreaktion (= Einzelzell-RT-PCR) gewonnen werden. Hierfür sollte zunächst die gesamte Ribonukleinsäure (= RNA) aus den betreffenden Zellen isoliert und mit einer reversen Transkription (= RT) in zirkuläre Desoxyribonukleinsäure (= cDNA) umgeschrieben werden. Mittels Polymerasekettenreaktion (= PCR) sollten dann lediglich die Gensegmente der leichten und der schweren Kette des gesuchten Antikörpers amplifiziert werden. Anschließend sollten diese Segmente dann sequenziert werden.

Dies würde in Zukunft die Möglichkeit eröffnen, diese Antikörper künstlich herzustellen, indem die Sequenzen in einen geeigneten Expressionsvektor eingebracht und mit diesem Konstrukt dann humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293 (= HEK293-Zellen) transfiziert würden. Die transfizierten HEK293 Zellen würden dadurch einen monoklonalen Antikörper produzieren, welcher an α -Syn bindet. Bevor diese Antikörper jedoch zur passiven Immunisierung beim IPS eingesetzt werden könnten, müssten sie zunächst weiter bezüglich ihrer Bindungseigenschaften charakterisiert und ihr Effekt auf die Entstehung und den Verlauf in geeigneten Zell-Kulturen und Tiermodellen untersucht werden und schlussendlich in einer klinischen Studie getestet werden. Die Herstellung und weitere Charakterisierung der Antikörper ist jedoch nicht Bestandteil dieser Promotionsarbeit.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Geräte

Gerät	Firma
Centrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Flow Cytometer BD LSR II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Inkubator Heraeus function line	
Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon Corporation, Chiyoda, prefecture Tokyo, Japan
Milli-Q Advantage A10 Ultrapure Water Purification System	Millipore™ Corporation, Billerica, USA
MoFlo Astrios	Beckman Coulter, Brea, USA
MyCycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
myFuge™ mini	Benchmark Scientific Inc., Sayreville, USA
Neubauer Zählkammer BLAU-BRAND	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PCR workstation Pro	PEQLAB-Life Science, Erlangen, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
PTC-200 thermal cycler	MJ Research Inc., Quebec, Kanada
Sterilbank HERA safe® KS12	Thermo Electron Corporation, Erlangen, Deutschland
Tecan Infinite® M200 Plattenleser	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland

Unimax 1010 Plattformschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Vakuumpumpe Vario Air	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, Deutschland
Vornado™ Mini Vortex-Schüttler	Benchmark Scientific Inc., Sayreville, USA
Vortex-Schüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge 5415D	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
96-well PCR Platte, 200 µl, runder Boden, ohne seitlichen Rand	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Biosphere® filter tips 0,1-10 µl and 2-100 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (= engl. <i>Ethylene diamine tetraacetic acid</i> = EDTA) S-Monovetten® 9 mL	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
FACS Röhrchen Flow Cytometry 5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Falcon® 15 und 50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Glasflaschen	Schott AG, Mainz, Deutschland
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Latexhandschuhe sempercare®	SARTA Technology Centre, Northamptonshire, UK
Low-bind Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Nunc™ F96 MicroWell™, Polystyrolplatte, weiß	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Parafilm „M“	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen 10, 200 und 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Polytetrafluoroethylen (= PTFE) Kugeln, weiß, 3/16 Inches Durchmesser	McMaster-Carr, Los Angeles, USA
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sapphire PCR Gefäße 8er Kette 0,2 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Serologische Pipetten 5, 10 und 25 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma
Agarose LE	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (= DTT)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Ethanol absolute	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution (= EDTA-Na ₂)	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA
MgCl	Qiagen, Hilden, Deutschland
NaCl	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA
Natronlauge 1mol/L	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nuclease-freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Thioflavin T	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA
TrisHCl	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA

2.1.4 Puffer, Lösungen und Zusätze

Puffer	Firma
Biocoll separating solution	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Blue Loading dye	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
FACS Puffer: - PBS - 0,4% FCS (4 ml/l)	
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fibrillationspuffer, pH 7,5: - 20 mM TrisHCl - 0,1 M NaCl	
Heparin-Natriumsalz aus Schweinedarm	Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA
Humanes Albumin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

PCR Puffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
Phosphate-buffered saline (= PBS), 10x, pH 7.4: - NaCl (80,0 g/l) - KCl (2,0 g/l) - Na ₂ HPO ₄ (14,4 g/l) - KH ₂ PO ₄ (2,4 g/l)	
Q-Solution	Qiagen, Hilden, Deutschland
RT Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sorting-Puffer: - 0,5-Fach PBS - 10 mM DTT - 8 U RNAsin - 0,4 U 5'-3' Stop RNase Inhibitor	
SYBR®-Gold	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
TBE-Puffer, 10x: - Tris base (108 g/l) - Borsäure (55 g/l) - EDTA disodium Salz + H ₂ O (7,5 g/l) - auf 1 L auffüllen mit ddH ₂ O	

2.1.5 Enzyme

Enzym	Firma
5 Prime™ Stop RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
5'-3' Stop RNase Inhibitor	5 Prime GmbH, Hilden, Deutschland
HotStar Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNAsin	Promega, Madison, USA
Superscript III Reverse Transkriptase	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.1.6 Peptide

α-Synuklein	rPeptide, Bogart, USA
-------------	-----------------------

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Farbstoff	Klon	Herkunft	Firma
Anti-human CD20	BUV395	2H7 (monoklonal)	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-human CD27	PerCP-Cy TM 5.5	M-T271 (monoklonal)	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-human CD43	APC	1G10 (monoklonal)	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-human CD69	PE	L78 (monoklonal)	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
Anti-human IgG	PE-Cy TM 7	G18-145 (monoklonal)	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA

2.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Firma
150 ng Random hexamer primer (pd(N) ₆)		GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
3' C γ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGG TC	microSynth, Balgach, Schweiz
3' C κ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT	microSynth, Balgach, Schweiz
3' C κ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA	microSynth, Balgach, Schweiz
3' C λ	CACCAAGTGTGGCCTTGTTGCTTG	microSynth, Balgach, Schweiz
3' C μ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGG TC	microSynth, Balgach, Schweiz
3' Sal JH1/2	TGCGAAGTCGACGCCTGAGGAGA CGGTGACCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
3' Sal JH3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGAC GGTGACCATTG	microSynth, Balgach, Schweiz
3' Sal JH4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGAC GTGACCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
3' Sal JH6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGAC GGTGACCGTG	microSynth, Balgach, Schweiz
3' XhoI C λ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACAG AGTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGC AGCTGGTGCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGC AGCTGGTGGAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGC AGCTGTTGGAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGC AGCTGCAGGAG	microSynth, Balgach, Schweiz

5' Age VH4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGC AGCTACAGCAGTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ1	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTG TGCTGACKCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ2	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAGTCTG CCCTGACTCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCTCCTATG AGCTGACWCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCSCAGCYTGT GCTGACTCA	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ6	CTGCTACCGGTTCTGGGCCAATTTTAT GCTGACTCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Age Vλ7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYAGRCTGT GGTGACYCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L- VH1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L- VH3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L- VH4/6	CCCAGATGGGTCTGTCCCAGGTGCA G	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L- VH5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ1	GGTCCTGGGCCAGTCTGTGCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ2	GGTCCTGGGCCAGTCTGCCCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ3	GCTCTGTGACCTCCTATGAGCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ4/5	GGTCTCTCSCAGCYTGTGCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ6	GTTCTTGGGCCAATTTTATGCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' L Vλ7	GGTCCAATTCYAGGCTGTGGTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' LVκ1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' LVκ3	CTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' LVκ4	ATTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
5' Pan Vκ	ATGACCCAGWCTCCABYCWCCCTG	microSynth, Balgach, Schweiz
dNTPs je 25 mM		Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FP 3	CTCCTCCCTGGAGAAGAGCTAC	microSynth, Balgach, Schweiz
RP 3	TGAAGGTAGTTTCGTGGATGC	microSynth, Balgach, Schweiz

2.1.9 Kommerziell erworbene Kits und Lösungen

Kit	Firma
100 Basenpaare DNA-Leiter	Invitrogen, Carlsbad, USA
EasySep™ Human B Cell enrichment kit without CD43 depletion	STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada
Gene Matrix PCR Clean up	roboklon GmbH, Berlin, Deutschland
Lightning-Link®-Fluorescein labeling kit	Innova Bioscience, Cambridge, UK

2.1.10 Software

Software	Firma
Citavi 6	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
FACSDiva™	BD Biosciences, San Jose, USA
Microsoft® 365 für Windows	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Summit 4.3	Beckman Coulter Inc., Orange County, USA
www.vbase2.org	Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Deutschland

2.1.11 Dienstleister

Dienstleistung	Firma
Plausibilitätsprüfung Sequenzen	Yumab GmbH, Braunschweig, Deutschland
Sequenzierung	Seqlab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Fluorescein-Markierung von alpha-Synuklein

Für die Einzelzell-Sortierung mittels Durchflusszytometrie wurde ein Fluoreszenz-gekoppeltes Protein benötigt. Daher wurde das α -Syn (rPeptide, Bogart, USA) zunächst in Wasser (= H₂O zu einer Konzentration von 1 Milligramm pro Milliliter (= mg/ml) gelöst. Produktionsbedingt enthält das Peptid Trifluoressigsäure-Salz (= TFA-Salz). Da dieses möglicherweise die Konjugationsreaktion mit dem Fluoreszenzfarbstoff behindert, wurde die Peptid-Lösung über Nacht bei einer Temperatur (= Temp.) von 4 Grad Celsius (= °C) in H₂O dialysiert. Danach wurde die Lösung

gefriergetrocknet und anschließend mit PBS auf eine Konzentration von 20 mg/ml gebracht. Die so gewonnene Protein-Lösung wurde nach Anweisung des Herstellers mit dem Lightning-Link®-Fluorescein labeling kit von Innova Bioscience (Cambridge, UK) konjugiert.

Laut dem Herstellerprotokoll konjugiert der Fluorescein-Ligand an freie Aminogruppen des zu markierenden Peptids. Daher bleibt bei einem optimalen Verhältnis von Peptid zu Farbstoff am Ende der Konjugationsreaktion kein ungebundenes Material übrig. Das Fluoreszenz-markierte Protein wurde bei -20 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.2 Blutproben und Spender

Die Frischblut-Proben wurden mittels standardisierter peripherer Venenpunktion in 9 Milliliter (= ml) EDTA S-Monovetten (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gewonnen. Da humane Blutzellen sehr empfindlich auf Temperaturveränderungen und mechanischen Stress reagieren, wurden die Proben unmittelbar weiter behandelt. Auch Griffin et al. konnten zeigen, dass aus Frischblut mehr B1-Lymphozyten gewonnen werden können als aus gefrorenen Blutproben (Griffin und Rothstein 2012). Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Philipps-Universität Marburg (Nummer 172/15) genehmigt und wurde in Einklang mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Blutspender und Blutspenderinnen waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund und zwischen 20 und 30 Jahren alt. Sie wurden außerdem nur nach einem Aufklärungsgespräch und schriftlicher Einwilligungserklärung in die Studie eingeschlossen.

2.2.3 Isolation von PBMCs mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Zu Beginn wurden 20 ml venöses EDTA-Blut zu gleichen Anteilen mit 20 ml PBS in einem 50 ml Falcon®, (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verdünnt. In einem weiteren 50 ml Falcon® wurden anschließend 10 ml Biocoll® (Lösung zur Trennung von Blutbestandteilen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vorsichtig mit der Blutverdünnung überschichtet, ohne die zwei Phasen zu mischen. Dieses Falcon® wurde dann für 30 Minuten (= min) mit 1500 Umdrehungen pro Minute (engl. *revolutions per minute* = rpm) bei 20 °C und ohne Bremse zentrifugiert. Die durch das Zentrifugieren entstandene oberste Lage wurde dann mit einer Pipette bis auf einen Zentimeter oberhalb der PBMC-Fraktion abgenommen und verworfen. Danach wurde die PBMC-Fraktion in ein neues 50 ml Falcon® (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt, mit PBS, versetzt mit 1 Millimolar (= mM) EDTA, auf 50 ml aufgefüllt und nochmals für 20 min bei 1500 rpm und bei 20 °C mit Bremse zentrifugiert. Der so entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in PBS mit 1 mM EDTA resuspendiert und auf ein

Gesamtvolumen von 30 ml gebracht. Die Probe wurde dann ein weiteres Mal mit 1500 rpm für 15 min und bei 20 °C und mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in FACS-Puffer (PBS + 0,04% fetales Kälberserum (engl. *Fetal calf serum* = FCS)) resuspendiert.

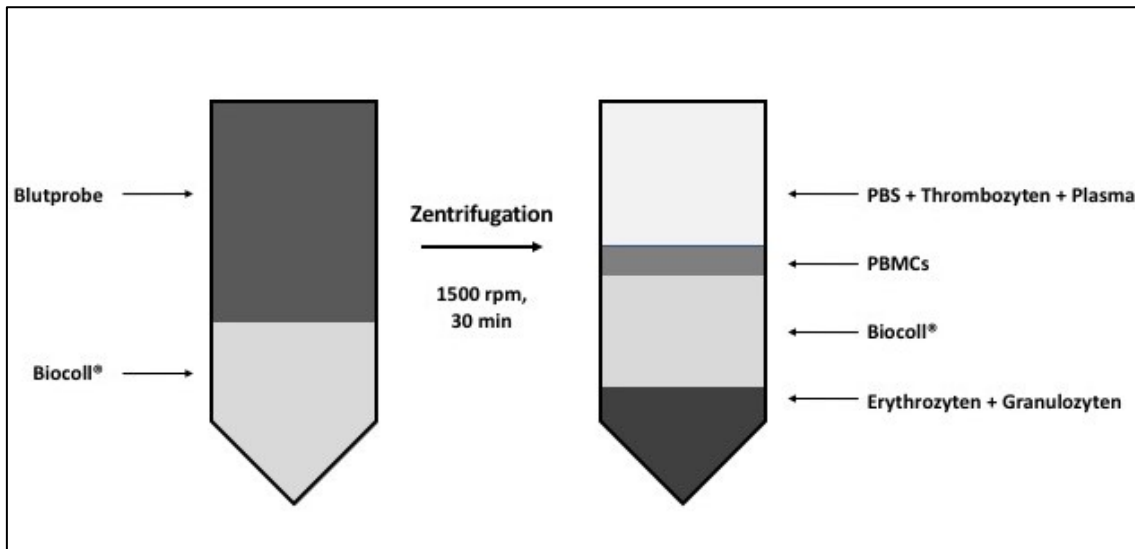


Abb. 2: Nach dem ersten Schritt der Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Biocoll entstandene Fraktionen.

Die schwersten und größten Zellen im Blut sind die Erythrozyten und Granulozyten. Sie sinken daher während der Zentrifugation auf den Boden des Falcons. Die Biocoll-Lösung trennt diese Zellen von den leichteren PBMCs (Lymphozyten, Monozyten, natürliche Killerzellen und dendritische Zellen). Die oberste Fraktion enthält Plasma, Thrombozyten und PBS. (Eigene Darstellung)

2.2.4 B-Zell-Gewinnung

Die infolge der Dichtegradienten-Zentrifugation entstandene Suspension aus peripheren mononukleären Blutzellen (engl. *peripheral blood mononuclear cells* = PBMCs) enthält Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Makrophagen und Monozyten. Zur Separation der B-Lymphozyten vom Rest der PBMCs wurde STEMCELLS "EasySep™ - Human B-Cell Enrichment kit without CD43 Depletion" (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) verwendet. Hierfür wurde die PBMC-Suspension mit Medium (PBS + 0.4% FCS) in einem 5 ml FACS-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen/ml gebracht. Anschließend wurden 50 Mikroliter vom "EasySep™ Human B-Cell Enrichment Cocktail without CD43 Depletion" (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) pro Milliliter Zellsuspension hinzugegeben und durch Auf- und Ab-Pipettieren miteinander vermischt. Der sogenannte „Enrichment-Cocktail“ ist ein Gemisch aus monoklonalen Antikörpern, welche gegen die Zelloberflächen-Antigene CD2, CD3, CD14, CD16, CD56, Glykophorin A und Dextran gerichtet sind (s. Tab. 1).

Während CD14 ein für Makrophagen und Monozyten typisches Antigen darstellt, sind CD2 und CD3 Antigene, die gewöhnlich auf T-Lymphozyten vorkommen. Auf den Oberflächen von natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Monozyten sind außerdem CD16 Moleküle zu finden. Die zuvor genannten CD-Antigene sind kein Bestandteil der Oberfläche von B-Lymphozyten. Demzufolge binden auch keine der im "Cocktail" enthaltenen Antikörper an ihre Oberfläche und sie bleiben so während des Prozesses im Gegensatz zu den Monozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten unmarkiert.

Tab. 1: Zusammensetzung des "EasySep™ Human B-Cell Enrichment Cocktail without CD43 Depletion". Die Antikörper in der „Anreicherungslösung“ erkennen die Zelloberflächen-Antigene CD2, CD3, CD14, CD16, CD56 und Glykophorin A und damit markieren sie T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Makrophagen, Monozyten und Erythrozyten. B-Lymphozyten bleiben unmarkiert.

Zelltyp	Oberflächenmarker
T-Lymphozyten	CD2, CD3
Natürliche Killerzellen	CD2, CD16, CD56
Monozyten	CD14, CD16
Makrophagen	CD14, CD16
Erythrozyten (Erythrozytenvorläufer)	Glykophoran A

Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden dann 50 µl der magnetischen Nanopartikel (EasySep™, STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) pro Milliliter Zellsuspension zugefügt, vermischt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit FACS-Puffer auf ein Endvolumen von 2,5 ml gebracht. Das FACS-Röhrchen wurde dann in die dafür vorgesehene Vertiefung des Magneten (EasySep™, STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) platziert. Durch das Invertieren des Magneten mitsamt des Röhrchens nach einer Wartezeit von 5 min wurden die unmarkierten Zellen in ein neues 5 ml FACS-Röhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) überführt, wohingegen die mit magnetischen Nanopartikeln markierten Zellen aufgrund der magnetischen Anziehung im Röhrchen innerhalb des Magneten verblieben (s. Abb. 3). Diese negative Selektionsmethode hat den Vorteil, dass die B-Lymphozyten, welche für die weiteren Experimente benötigt werden, unberührt bleiben und während des Prozesses folglich nicht aktiviert werden. Um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen, wurde diese Methode bei Raumtemperatur und dem Herstellerprotokoll entsprechend durchgeführt.

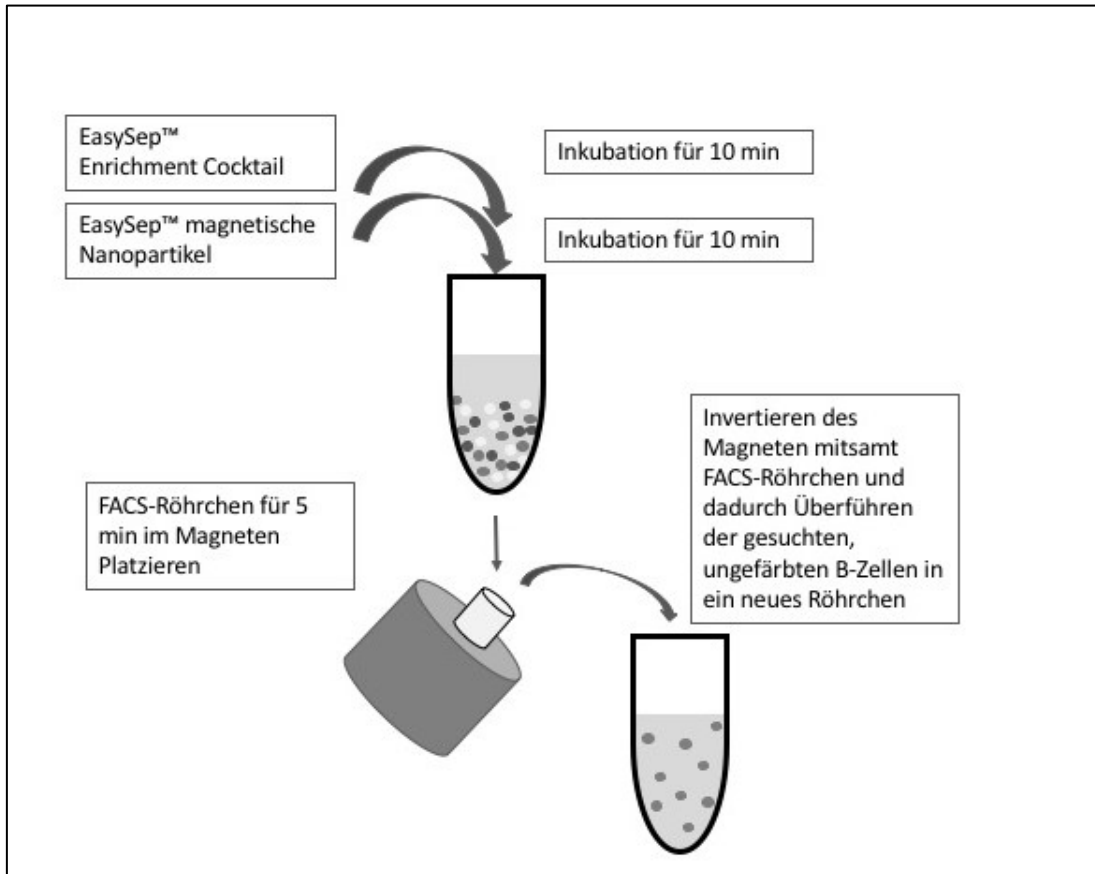


Abb. 3: Ablauf der B-Zell-Gewinnung mit Hilfe von STEMCELL's "EasySep™ - Human B-Cell Enrichment kit without CD43 Depletion".

Nach der Inkubation der Zellsuspension mit dem Enrichment-Cocktail und den Nanopartikeln für jeweils 10 min wurde das Röhrchen für 5 min in die Vertiefung des Magneten platziert. Hierdurch wurden die unerwünschten, mit Nanopartikeln markierten T-Lymphozyten, Makrophagen, natürliche Killerzellen und Monozyten durch den Magneten im FACS-Röhrchen zurückgehalten. (Eigene Darstellung)

2.2.5 Fluoreszenzfarbstoffe und Färbung

Für das weitere Prozedere musste die Zellsuspension frei von Rückständen der vorangegangenen Schritte sein. Daher wurden die Zellen, die durch die B-Zell-Gewinnung erhalten wurden, zweimal mit FACS-Puffer für 5 min bei 4 °C und 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das resultierende Pellet wurde in 300 µl FACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Konzentration der B-Lymphozyten in einer Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland) ermittelt. Die Zellsuspension wurde dann auf verschiedene, auf Eis befindliche FACS-Gefäße aufgeteilt, diese wurden dann erneut für 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl PBS mit 10% FCS resuspendiert. Diese Suspension von aufgereinigten B-Lymphozyten wurde dann auf Eis und im Dunkeln für 20 min mit 300 nanomolar (= nM) Fluorescein-gekoppeltem α -Syn inkubiert, um diejenigen Zellen zu selektieren, die Antikörper an ihrer Zelloberfläche

exprimieren, die gegen α -Syn gerichtet sind. Danach wurden die Zellen für fünf min bei 1200 rpm und 4 °C gewaschen.

Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 30 min im Dunkeln und auf Eis mit einer Auswahl von Antikörpern inkubiert, die gegen von B1-Lymphozyten exprimierten CD-Marker gerichtet sind. Um die B1-Lymphozyten von den anderen Zellen in der Suspension zu differenzieren, wurden Antikörper gegen CD20, CD27, CD43, CD69 und IgG verwendet (Griffin et al. 2011). CD20 ist ein Oberflächenmarker, der von allen reifen B-Lymphozyten exprimiert wird, während CD43 nur von B1-Lymphozyten und aktivierten B-Lymphozyten exprimiert wird. Da sich CD69 nur auf aktivierten B-Lymphozyten und nicht auf B1-Lymphozyten befindet, wurde CD69 in dieser Studie als Negativmarker verwendet. Die Antikörper gegen humane IgG-Antikörper sind gegen IgG Moleküle auf der Zelloberfläche gerichtet, die sogenannten B-Zell-Rezeptoren, welche nur von B-Lymphozyten produziert werden, die lösliche IgG-Antikörper sezernieren.

Eine Unterscheidung der gegen die CD-Marker gerichteten Antikörper ist möglich, da diese alle mit unterschiedlichen Fluorophoren gefärbt wurden. Fluorophore können anhand ihrer spezifischen Exzitations- und Emissionsmaxima (s. Tab. 2) differenziert werden. Da es allerdings nicht möglich ist, sechs Farbstoffe ohne überlappende Emissionsspektren (Abb. 4) zu finden, können Messfehler durch Einstrahlungen in einen inadäquaten Kanal auftreten. Allerdings können diese Fehler relativ klein gehalten werden, indem Farbstoffe ausgewählt werden, die sich so stark wie möglich in ihren Emissionsspektren unterscheiden. Zu Beginn der Studie wurde außerdem jeweils eine Zellprobe gemessen, die nur mit einem der Fluorophore gefärbt wurde, um zu ermitteln, wie stark die jeweilige Einstrahlung in benachbarte Kanäle ausfällt, um diese dann mittels FACS-Software zu kompensieren.

Tab. 2: Exzitations- und Emissionsmaxima der sechs benutzten Fluoreszenzfarbstoffe.
Farbstoffe mit einem ähnlichen Exzitationsmaximum werden vom selben Laser stimuliert.

	Fluoreszenz-Farbstoff	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
CD 20	BUV395	348 (ultravioletter Laser)	395
α-Syn	FITC	494 (blauer Laser)	520
CD 69	PE	496 (blauer Laser)	578
CD 43	APC	650 (roter Laser)	660
CD 27	PerCP-Cy TM 5.5	482 (blauer Laser)	695

IgG	PE-Cy TM 7	496 (blauer Laser)	785
-----	-----------------------	--------------------	-----

ü

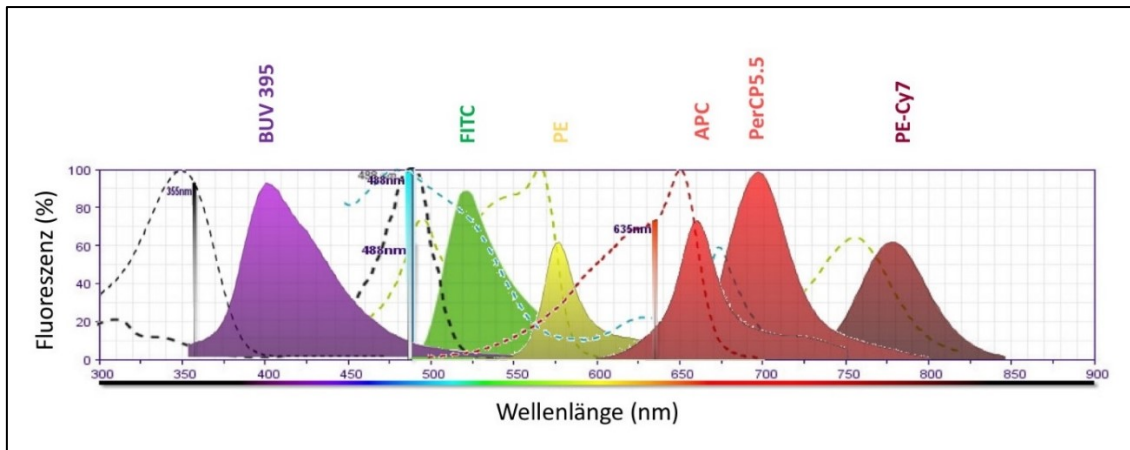


Abb. 4: Emissionsspektren der benutzten Farbstoffe.

Die B-Lymphozyten wurden mit sechs unterschiedlichen Fluorophoren gefärbt. Die Farbstoffe mussten so gewählt werden, dass die Emissionsspektren sich nicht überlappen. Minimale Überschneidungen können mithilfe der FACS-Software kompensiert werden. Auf der x-Achse wird die Wellenlänge in Nanometer (= nm) und auf der y-Achse die Emission in Prozent dargestellt. (Modifiziert nach (BD Bioscience))

2.2.6 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse und zum Zählen von Zellen in Suspensionen, die einen Laser mit großer Geschwindigkeit passieren. Umgangssprachlich wird für die Durchflusszytometrie auch der Begriff „FACS“ (= Englisch für: *Fluorescent Activated Cell Sorting*) verwendet, allerdings ist ein FACS-Gerät im Gegensatz zu einem Durchflusszytometer zusätzlich in der Lage, Zellen aufgrund ihrer Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften in verschiedene Populationen zu sortieren (für die Funktionsweise eines FACS-Gerätes s. Abb. 6). Um eine korrekte Analyse der Zellen gewährleisten zu können, müssen diese den Laser einzeln und nacheinander passieren. Die Vereinzelung der Zellen wird durch einen Prozess realisiert, der sich hydrodynamische Fokussierung nennt (s. Abb. 5) (Watson 1999).

Wenn eine Zelle den Messbereich des Laserstrahls passiert, dann wird das dabei entstehende Streulicht und/oder Fluoreszenz-Signal von Detektoren ausgewertet. Obligatorisch sind je ein Detektor für Vorwärtsstreulicht (= engl. *Forward Scatter* = FSC) und ein Detektor für Seitwärtsstreulicht (= engl. *Sideward Scatter* = SSC). Das Vorwärtsstreulicht ist dabei ein Maß für die Lichtbeugung entlang der Achse des einfallenden Lichtes, welche proportional zum Zellvolumen ist, während das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Lichtbrechung im rechten

Winkel zum einfallenden Licht ist und von der Granularität einer Zelle abhängt (Jaroszeski und Radcliff 1999).

Parallel zum Streulicht kann mit Hilfe von weiteren Detektoren die Fluoreszenzaktivität gemessen werden, was eine präzisere Charakterisierung der Zellen ermöglicht. Hierfür muss die verwendete Zellsuspension zuvor mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die gegen die gefragten Oberflächenstrukturen gerichtet sind, inkubiert werden. Es gibt eine Vielzahl an unterschiedlichen Fluorophoren, die alle ihre eigenen spezifischen Emissions- und Exzitationspektren besitzen (s. Kapitel 2.2.5). Wird ein Fluorophor durch einen monochromatischen Laser angeregt, der in sein Exzitationsspektrum fällt, so absorbiert er zunächst die Energie und gibt sie in Form von Photonen wieder ab. Die emittierten Photonen haben dabei eine größere Wellenlänge als der anregende Laser. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle (Jaroszeski und Radcliff 1999).

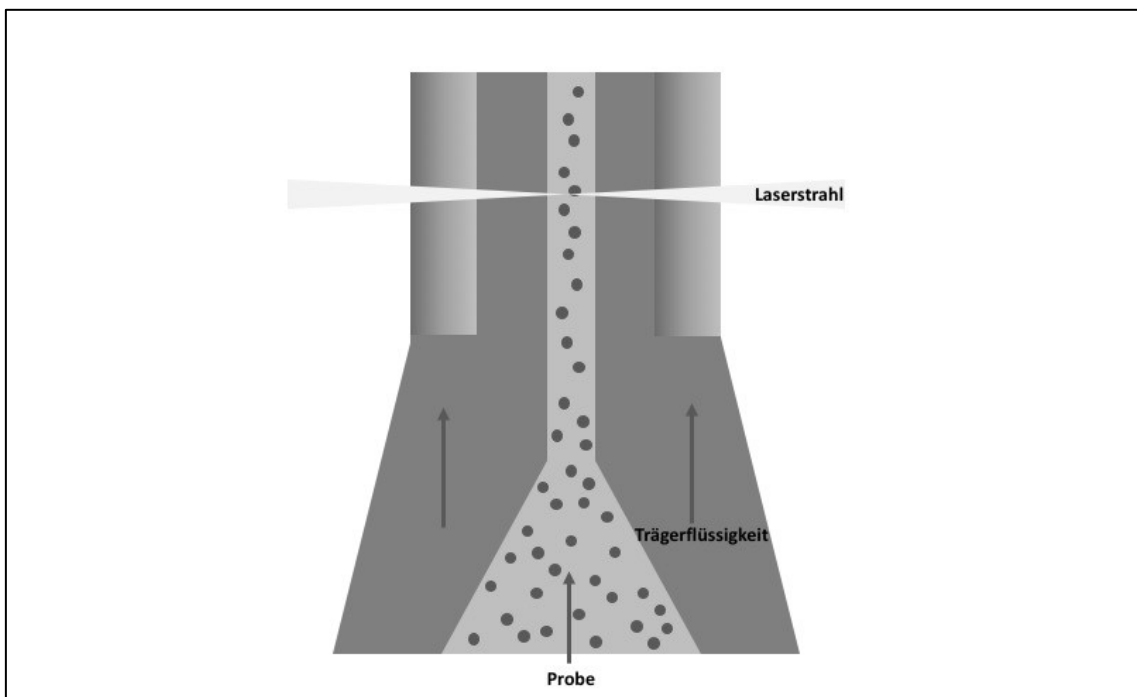


Abb. 5: Hydrodynamische Fokussierung, ein Prozess zur Zell-Vereinzelung.

Hierzu wird mit Hilfe einer Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung erzeugt. Durch die Querschnittsverringern im Strömungskopf werden sowohl der Hüll- als auch der Probenstrom beschleunigt, ohne dass die beiden sich dabei vermischen. Infolgedessen wird der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgende Zellen vergrößert, sodass jede Zelle einzeln durch den Messbereich des Laserstrahls geführt wird (Eigene Darstellung).

In dieser Studie wurden die aufgereinigten B-Lymphozyten zunächst mit dem LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) analysiert und eine Gating-Strategie (s. 3.1)

erarbeitet. Für die Einzelzell-Sortierung von nAbs- α -Syn produzierenden B1-Lymphozyten wurde im weiteren Verlauf der MoFlo Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, USA) (s. Abb. 6) verwendet.

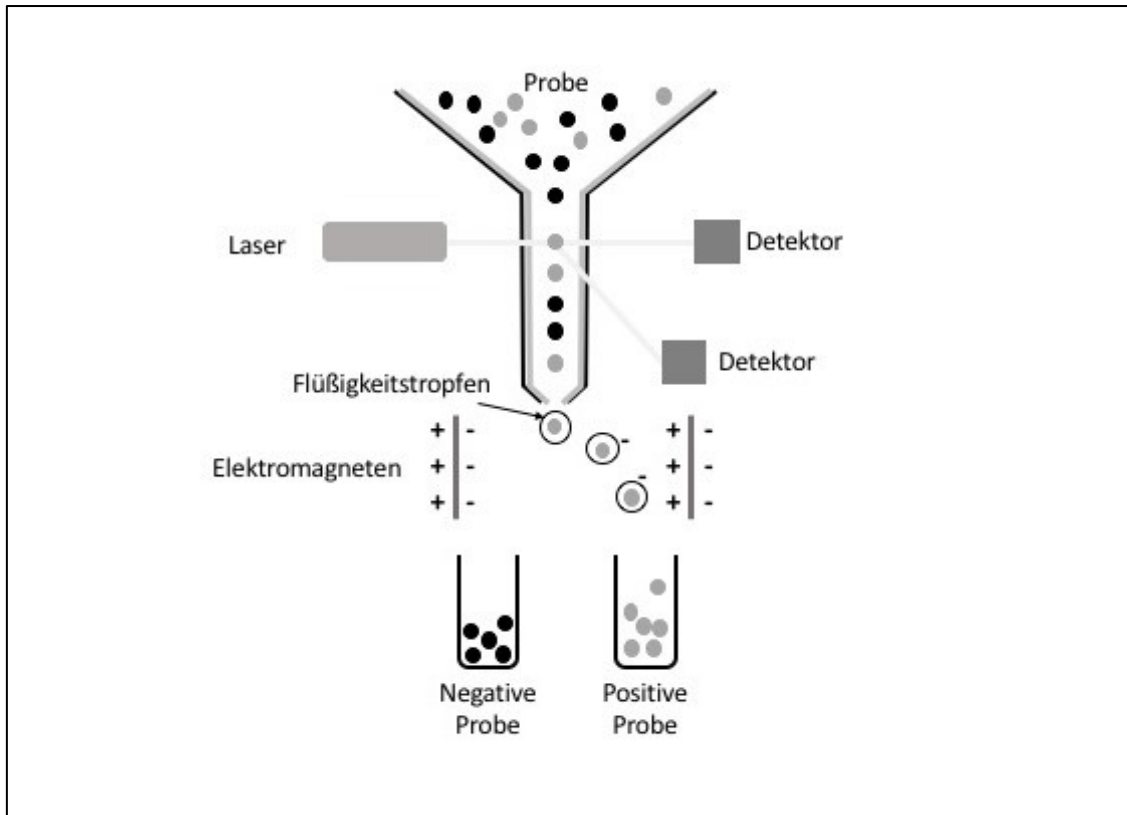


Abb. 6: Funktionsweise eines FACS-Gerätes

Bei einem FACS-Gerät ist den Detektoren ein Vibrator nach-geschaltet, der einen konstanten Strom von Tropfen erzeugt. In jedem Tropfen befindet sich dabei eine einzelne Zelle. Enthält ein Tropfen eine Zelle, die alle gesuchten Parameter erfüllt, so wird der Tropfen elektrisch aufgeladen und über ein Spannungsfeld in die gewünschte Richtung gelenkt (McKinnon 2018) (Eigene Abbildung).

2.2.7 Einzelzell-Sortierung

Die Sortierung erfolgte in einem sterilen Setting bei Raumtemperatur. Zellen, die alle Eigenschaften eines vitalen B1-Lymphozyten aufwiesen (CD20+, CD27+, CD43+, CD69- und IgG+) und außerdem α -Syn-reaktive B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche präsentierten, wurden vom MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, USA) detektiert und jeweils in eine Vertiefung einer transparenten, randlosen 96-well PCR Platte mit rundem Boden (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) separiert. Jede Vertiefung enthielt dabei 4 μ l "Sorting-Puffer" (0,5-Fach PBS mit 10 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, USA), 8 atomare Masseneinheiten (= engl. *unified atomic mass units* = U) RNAsin (Promega, Madison, USA) und 0,4 U 5'-3' Stop RNase Inhibitor (5 Prime GmbH, Hilden, Deutschland)). Nach dem Sortieren wurden die Platten sofort mit optisch klarer Klebefolie (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verschlossen, auf Trockeneis gegeben und dann bei -80°C gelagert.

2.2.8 Einzelzell RT-PCR und Immunglobulin-Gen Amplifikation

Um die Sequenz der Antigen-bindenden Domäne von nAbs- α -Syn zu bestimmen, muss zunächst die Boten-Ribonukleinsäure (= mRNA) aus den zuvor sortierten Einzelzellen isoliert werden. Danach kann die mRNA über die RT in cDNA umgewandelt und mittels PCR vervielfältigt werden. Hierfür wurde das Protokoll von Tiller et al. mit geringfügigen Anpassungen angewendet (Tiller et al. 2008).

Die RT jeder einzelnen Zelle wurde in einem Gesamtvolumen von 16 μ l in der 96-well PCR-Platte, in die ursprünglich sortiert wurde, durchgeführt. Der „RT-Mastermix“ setzte sich dabei folgendermaßen zusammen:

Tab. 3: Zusammensetzung des „RT-Mastermixes“.

In jede Vertiefung der PCR-Platte mit einer Zelle wurden 16 μ l des Mastermixes gegeben

	Nuklease-freies H ₂ O (Qiagen, Hilden, Deutschland)
1-fach	RT-Puffer (5-fach) (Invitrogen, Carlsbad, USA)
6U	5 Prime™ Stop RNase Inhibitor (Fisher Scientific, Waltham, USA)
1,0 μ l	0.1 M DTT (Invitrogen, Carlsbad, USA)
150 Nanogramm (= ng)	Random hexamer primer pd(N) ₆ , GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)
4U	RNasin (Promega, Madison, USA)
0,5 μ l	dNTPs je 25 mM (Thermo Scientific, Waltham, USA)
0,5% v/v	Igepal CA-630 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
50U	Superscript III Reverse Transkriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Die RT wurde im Thermocycler (MyCycler, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules USA) mit folgendem Protokoll (s. Tab. 4) durchgeführt. Zuvor wurde sie erneut mit optisch klarer Klebefolie (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verschlossen.

Tab. 4: RT-Protokoll

10 min	42°C	Zellaufschluss, Denaturierung
10 min	25°C	Primer-Anlagerung
60 min	50°C	Reverse Transkription
5 min	94°C	Inaktivierung der Superscript III Reversen Transkriptase
∞	-20°C	cDNA Lagerung

Da die gesuchten nAbs zur Klasse der IgG gehören, bestehen sie jeweils aus zwei schweren Ketten (= IgH) sowie aus zwei leichten Ketten, welche über Disulfidbrücken vernetzt sind. Es kommen dabei zwei unterschiedliche Typen von leichten Ketten vor: leichte Ketten des Immunglobulins vom Subtyp kappa (= Igκ) und leichte Ketten vom Subtyp lambda (= Igλ). Ein IgG-Molekül besteht dabei immer aus zwei leichten Ketten desselben Typs. Da im Voraus nicht ersichtlich ist, welcher Typ von einer betreffenden Zelle exprimiert wird, musste für jede Zelle die PCR mit den Primersets für beide Subtypen durchgeführt werden.

Die Gentranskripte für IgH-, Igκ- und Igλ-, sowie β-Aktin- (Positivkontrolle) wurden alle separat repliziert. Hierfür wurde das RT-Produkt in vier gleichgroße Anteile aufgetrennt. Alle PCRs wurden in PCR Röhrchen (Sapphire PCR 8-tube strips, 0,2 ml, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) in einem Gesamtvolumen von 40 µl pro Röhrchen durchgeführt (s. Tab. 5). Bei der sogenannten Negativkontrolle wurde außerdem statt der 3,5 µl cDNA Nuklease-freies H₂O verwendet.

Tab. 5: „PCR-Mastermixe“ für die primäre PCR von IgH, Igκ, Igλ und β-Aktin.

Hier gezeigt wird die Zusammensetzung für je eine Reaktion mit 3,5 µl cDNA in 36,5 µl.

	IgH	Igκ	Igλ	β-Aktin
Q-Solution (Qiagen, Hilden, Deutschland)	1-fach	1-fach	1-fach	1-fach
PCR-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland)	1-fach	1-fach	1-fach	1-fach
MgCl (Qiagen, Hilden, Deutschland)	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
dNTPs je 25 mM (Thermo Scientific, Waltham, USA)	300 µM	300 µM	300 µM	300 µM
Primer s. Tab. 6 (microSynth, Balgach, Schweiz)	200 nM Je Primer	200 nM Je Primer	200 nM Je Primer	400 nM
HotStar Taq DNA-Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland)	1,2 U	1,2 U	1,2 U	1,2 U
Nuklease-freies H ₂ O (Qiagen, Hilden, Deutschland)	auf 36,5 µl auffüllen	auf 36,5 µl auffüllen	auf 36,5 µl auffüllen	auf 36,5 µl auffüllen

Tab. 6: Primer-Zusammensetzung für die primäre PCR.

Die Zusammensetzung entspricht dem Protokoll von Tiller et al. (Tiller et al. 2008). Für jede der IgG-Ketten und β -Aktin wurden jeweils unterschiedliche Vorwärtsprimer und mindestens ein Rückwärtsprimer verwendet. Alle Primer wurden von microSynth (Balgach, Schweiz) bezogen.

	Vorwärtsprimer		Rückwärtsprimer	
IgH	5' L- VH1	ACAGGTGCCCACTCCCA GGTGAG	3' C γ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCT GG TC
	5' L- VH3	AAGGTGTCCAGTGTGAR GTGCAG	3' C μ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCT GG TC
	5' L- VH4/6	CCCAGATGGGTCCTGTC CCAGGTGCA G		
	5' L- VH5	CAAGGAGTCTGTTCCGA GGTGAG		
Igκ	5' LV κ 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAG CTGCTGG	3' C κ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGC TCA
	5' LV κ 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCT GGCTCCAG		
	5' LV κ 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGG ATCTCTG		
Igλ	5' L V λ 1	GGTCCTGGGCCAGTCT GTGCTG	3' C λ	CACCAGTGTGGCCTTGTTC TTG
	5' L V λ 2	GGTCCTGGGCCAGTCT GCCCTG		
	5' L V λ 3	GCTCTGTGACCTCCTATG AGCTG		
	5' L V λ 4/5	GGTCTCTCTCSCAGCYTG TGCTG		
	5' L V λ 6	GTTCTTGGGCAATTTTA TGCTG		
	5' L V λ 7	GGTCCAATTCYAGGCT GTGGTG		
β-Aktin	FP 3	CTCCTCCCTGGAGAAGA GCTAC	RP 3	TGAAGGTAGTTTCGTGGAT GC

Tab. 7: Protokolle für die primäre PCR der IgH und Igκ, sowie Igλ und β-Aktin.

Für IgH und Igκ wurde das gleiche Protokoll verwendet. Die Reaktionen wurden alle im PTC-200 thermal cycler (MJ Research Inc., Quebec, Kanada) durchgeführt.

IgH und Igκ			Igλ			β-Aktin			Schritt der PCR
Zeit	Temp.	Wiederholungen (= Wdh).	Zeit	Temp.	Wdh.	Zeit	Temp.	Wdh.	
15 min	95°C	1x	15 min	95°C	1x	15 min	95°C	1x	Aktivierung der Taq-Polymerase
30 Sekunden (= Sek.)	94°C	40x	30 Sek.	94°C	40x	60 Sek.	94°C	45x	Denaturierung
30 Sek.	58°C		30 Sek.	60°C		60 Sek.	58°C		Primer-Anlagerung (Hybridisierung)
55 Sek.	72°C		55 Sek.	72°C		12 Sek.	72°C		Polymerisierung durch die Taq-Polymerase
10 min	72°C	1x	10 min	72°C	1x	10 min	72°C	1x	
∞	4°C	1x	∞	4°C	1x	∞	4°C	1x	DNA Lagerung

Im Anschluss an die primäre PCR erfolgte eine sekundäre PCR jeweils für die der schweren, kappa- und lambda-Ketten mit einer reduzierten Zyklenzahl (s.

Tab. 9) und mit der jeweils gleichen Menge an „PCR-Mastermix“ (s. Tab. 5) jedoch mit einer veränderten Primer-Zusammensetzung (s. Tab. 8).

Tab. 8: Primer-Zusammensetzung für die sekundäre PCR.

Die Zusammensetzung entspricht dem Protokoll von Tiller et al. (Tiller et al. 2008). Alle Primer wurden von microSynth (Balgach, Schweiz) bezogen. Für β -Aktin wurde keine sekundäre PCR durchgeführt, da bereits nach der primären PCR eine zur Detektion ausreichende Amplifikation erzielt werden konnte.

	Vorwärtsprimer		Rückwärtsprimer	
IgH	5' Age VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATT- CCGAGGTGC AGCTGGTGACAG	3' Sal JH1/2	TGCGAAGTCGACGCCTGAGGAGA CGGTGACCAG
	5' Age VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTG AGGTGC AGCTGGTGGAG	3' Sal JH3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGAC GGTGACCATTG
	5' Age VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCC AGGTGC AGCTGCAGGAG	3' Sal JH4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGAC GTGACCAG
	5' Age VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTG AGGTGC AGCTGTTGGAG	3' Sal JH6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGAC GGTGACCGTG
	5' Age VH4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCC AGGTGC AGCTACAGCAGTG		
Igκ	5' Pan V κ	ATGACCCAGWCTCCABYCW CCTG	3' C κ 494	GTGCTGTCCTTGCTGTCCTGCT
Igλ	5' Age V λ 1	CTGCTACCGGTTCTGGGCC AGTCTG TGCTGACKCAG	3' XhoI C λ	CTCCTCACTCGAGGGYGGGAACA G AGTG
	5' Age V λ 2	CTGCTACCGGTTCTGGGCC AGTCTG CCCTGACTCAG		
	5' Age V λ 3	CTGCTACCGGTTCTGTGACCT CCTATG AGCTGACWCAG		
	5' Age V λ 4/5	CTGCTACCGGTTCTCTCSCA GCYTGT GCTGACTCA		
	5' Age V λ 6	CTGCTACCGGTTCTGGGCCA ATTTTAT GCTGACTCAG		
	5' Age V λ 7/8	CTGCTACCGGTTCCAATTCYCA GRCTGT GGTGACYCAG		

Tab. 9: Protokolle für die sekundäre PCR der schweren, kappa- und lambda-Ketten.

Die Reaktionen wurden alle im PTC-200 thermal cycler (MJ Research Inc., Quebec, Kanada) durchgeführt.

IgH und Igk			Igλ			Schritt der PCR
Zeit	Temp.	Wdh.	Zeit	Temp.	Wdh.	
15 min	95°C	1x	15 min	95°C	1x	Aktivierung der Taq-Polymerase
30 Sek.	94°C	30x	30 Sek.	94°C	30x	Denaturierung
30 Sek.	58°C		30 Sek.	60°C		Primer-Anlagerung (Hybridisierung)
45 Sek.	72°C		45 Sek.	72°C		Polymerisierung durch die Taq-Polymerase
10 min	72°C	1x	10 min	72°C	1x	
∞	4°C	1x	∞	4°C	1x	DNA-Lagerung

2.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Um den Erfolg der PCR zu evaluieren, wurden die jeweiligen Produkte mittels Gelelektrophorese untersucht. Hierzu wurden 1,5 Gramm (= g) Agarose LE (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit 100 ml TBE-Puffer (1-fach, Zusammensetzung s. 2.1.4) gemischt und für 2 min in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Anschließend wurden 2 µL SYBR®-Gold (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) zugesetzt, das Gel gegossen und anschließend ein Probenkamm eingesetzt. Nach 20 min war das Gel polymerisiert und konnte mit den Proben beladen werden. Dazu jeweils 7,5 µL PCR-Produkt mit je 3 µL blauem Ladepuffer (PqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenreferenz wurde zusätzlich eine DNA-Leiter mit einem Minimum von 100 Basenpaaren (Invitrogen, Carlsbad, USA) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 90 min bei 110 mV und Raumtemperatur in 1-fach TBE als Laufpuffer. Im Anschluss wurden die Gele unter ultraviolettem Licht beurteilt und dokumentiert. Konnte aus einer Zelle erfolgreich die DNA für die schwere und leichte Kette amplifiziert werden, so wurden die PCR-Produkte vor der Sequenzierung mit einem Aufreinigungs-Kit (Gene Matrix PCR Clean up, roboklon GmbH, Berlin, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers aufgereinigt.

2.2.10 Sequenzierung und Klonierung

Die Sequenzierungen wurden von einem industriellen Anbieter (Seqlab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die so erhaltenen Basen-Sequenzen wurden mittels der Sequenzanalyse auf www.vbase2.org in Aminosäuresequenzen umgewandelt, miteinander verglichen und auf Plausibilität überprüft. Des Weiteren erlaubt die Website eine Analyse sowie das Vergleichen der Komplementaritäts-bestimmenden Regionen (engl. *complementarity determining regions* = CDRs), sodass erste Aussagen über die Antigen-bindende Domäne der Antikörper getroffen werden konnten.

Im Anschluss an die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgten die Sequenzierungen durch einen industriellen Anbieter (Seqlab Sequence Laboratories GmbH, Göttingen, Deutschland). Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Basen-Sequenzen für die leichten und schweren Ketten der zusammen mit den zur Sequenzierung verwendeten Primern in das vbase2.org-Analyse-Werkzeug eingegeben. Es wurden dann die dazugehörigen Aminosäure-Sequenzen sowohl der CDR als auch der gesamten Antigen-bindenden Domäne angezeigt. Wann immer in der Aminosäuresequenz ein kleines „x“ auftauchte, wurde versucht, mit Hilfe einer Konsensus-Sequenz die an diese Stelle gehörende Aminosäure zu ermitteln. Hierfür wurde die Basenabfolge, die durch die Sequenzierung mit einem vorwärts-gerichteten Primer (forward Primer) bestimmt wurde, mit derjenigen Basenabfolge verglichen, die durch die Sequenzierung mit einem rückwärts-gerichteten Primer (revers Primer) identifiziert wurde. Durch diesen Abgleich wurde die wahrscheinlichste Aminosäure festgelegt.

Mit Hilfe der Sequenzanalyse von vbase2.org kann außerdem ein Abgleich der Sequenzen mit Keimbahn-Genen erfolgen. Für die schwere Kette sind zwölf verschiedene Familien für die variablen Bereiche der schweren Kette (= engl. *Immunoglobulin heavy chain variable region* =IGHV) bekannt (Pennell et al. 1989). Im Fall der leichten Kette muss zunächst zwischen den variablen Bereichen der Kappa Ketten (= engl. *Immunoglobulin light chain variable region* = IGKV), welche bislang sechs bekannten verschiedenen Keimbahn-Gen-Familien (Ling et al. 2018) angehören kann und den variablen Bereichen der Lambda Ketten (= engl. *Immunoglobulin lambda chain variable region* = IGLV), für die acht verschiedene IGLV-Familien bekannt sind (Winkler et al. 1992), unterschieden werden.

Eine weitere ausführlichere Analyse der Sequenzen erfolgte durch die Firma Yumab GmbH, einer universitären Ausgründung der Universität Braunschweig (Braunschweig, Deutschland), s. Tab. 10. Hierfür wurden die Sequenzen mit Hilfe von Sequenz-Datenbanken auf Gemeinsamkeiten

mit Keimbahngenen (bewertet durch den sogenannten *germinality index* = GI) und post-translationalen Modifikationen (= PTM) untersucht. Anhand eines internen Wertesystems wurden so unter anderem Punkte für die Reproduzierbarkeit und Stabilität der Sequenzen vergeben. Die Yumab GmbH ist außerdem Kooperationspartner für den nächsten geplanten Schritt der rekombinanten Antikörperherstellung über die Klonierung der Sequenzen in HEK293-Zellen.

2.2.11 Etablierung eines Protokolls zur Fibrillation von α -Syn

Für die Pathologie des IPS sind α -Syn-Aggregate von erheblicher Bedeutung. Zukünftig sollen die monoklonalen nAbs- α -Syn, welche mit Hilfe der Sequenzen aus dieser Arbeit gewonnen werden können, daraufhin getestet werden, ob sie die Entstehung von α -Syn-Fibrillen *in vitro* verhindern können. Dazu muss jedoch ein einheitliches, reproduzierbares Protokoll zur Herstellung von α -Syn-Fibrillen entwickelt werden. In diesem Fall wurde das Protokoll von Cohlberg et al. mit kleinen Änderungen etabliert (Cohlberg et al. 2002). Zur Überwachung und Quantifizierung der Fibrillation kann ein Thioflavin-T- (= ThT) Assay durchgeführt werden (LeVine 1999). ThT ist ein kationischer Benzothiazol-Farbstoff, der in wässriger Lösung nur eine sehr geringe Fluoreszenzaktivität aufweist. In Gegenwart von β -Faltblatt-reichen Strukturen wird die Fluoreszenzaktivität jedoch verstärkt, dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass ThT-Moleküle sich in die kleinen Kanäle zwischen den parallelen β -Faltblättern interkalieren, woraus eine starke Zunahme des Torsionswinkels zwischen dem Benzothiazol und dem Benzen des ThT-Moleküls resultiert (Biancalana und Koide 2010; Coelho-Cerqueira et al. 2014). Da es sich bei dieser Interaktion um eine sättigbare Wechselwirkung handelt, wird die Fibrillen-Bildung durch den proportionalen Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität und Fibrillen-Anzahl bzw. Länge quantifizierbar (Krebs et al. 2005).

Für die Messproben wurden je 0,25 mg/ml α -Syn (rPeptide, Bogart, USA), in Fibrillationspuffer mit 20 Mikromolar (= μ M) ThT (Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA) und 75 μ g/ml Heparin (Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, USA) in einer weißen 96er-well Platte (Nunc™ F96 MicroWell™, Polystyrolplatte, weiß, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) angesetzt und je einer weißen PTFE Kugel (McMaster-Carr, Los Angeles, USA) dazugegeben. Das Gesamtvolumen betrug dabei je 100 μ L/Well. Als Leerwert diente H₂O anstelle von α -Syn, bei ansonsten gleicher Zusammensetzung der 100 μ L. Die Fluoreszenz wurde im Tecan Infinite M200 (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm Anregung und 485 nm Emission alle 30 min gemessen. Zwischen den Messungen wurden die Proben im Dunkeln bei 37°C und 300 rpm geschüttelt. Um ein Austrocknen der Proben zu verhindern, wurden die Vertiefungen rund

um die Proben herum mit PBS (1-fach) befüllt und die Platte zusätzlich mit optisch klarer Klebefolie (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) verschlossen. Sowohl die Proben als auch die Leerwerte wurden bei allen Versuchen (bis auf die Messung n2 s. Abb. 12) als Triplikate gemessen.

2.2.12 Auswertung und Statistik des Fibrillations-Assays

Um eine ausreichende Reproduzierbarkeit des Fibrillations-Assays aufzuzeigen, wurde dieses Experiment drei Mal mit den gleichen Parametern durchgeführt. Zunächst wurde zu jedem Messzeitpunkt jeweils der arithmetische Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung der drei Messwerte, sowie der drei Leerwerte berechnet. Dann wurde der Mittelwert der Leerwerte ($= \bar{L}$) vom Mittelwert der Messwerte ($= \bar{P}$) abgezogen, um die Hintergrundfluoreszenz zu eliminieren und die reine Fluoreszenz durch die Fibrillation zu erhalten. Um den Verlauf der Fibrillation besser beurteilen zu können, wurde jeweils die Differenz aus den Mittelwerten der Proben und der Leerwerte nach einer Zeit ($= t$) von 0 min als Bezugswert ($= \bar{P}_0 - \bar{L}_0$) gesetzt. Durch diesen Bezugswert wurden jeweils die Differenzen aus den Mittelwerten der Proben und der Leerwerte zu allen Messzeitpunkten dividiert, diese auf der y-Achse aufgetragen:

$$y(t) = \frac{\bar{P}_t - \bar{L}_t}{\bar{P}_0 - \bar{L}_0}.$$

Dieser Wert kann anschließend graphisch auf der y-Achse aufgetragen werden (s. Abb. 12). Es handelt sich dann um eine Darstellung relativ zum jeweils ersten bereinigten Fluoreszenzwert.

3. Ergebnisse

3.1 Übertragung einer Gating-Strategie auf den MoFlo Astrios Cell Sorter

Die in dieser Arbeit verwendete Gating-Strategie sowie die Parameter der Färbung (s. Kapitel 2.2.5) wurden von Moritz Möller und der Doktorandin im Rahmen unserer Bachelorarbeiten am LSR II (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) erarbeitet. Die Ergebnisse dieser Arbeiten mussten auf den MoFlo Astrios Cell Sorter (Beckman Coulter, Brea, USA) übertragen und für dieses Gerät angepasst werden, sodass eine kurze Zusammenfassung der Erarbeitung einer Gating-Strategie auch in dieser Arbeit im Folgenden dargestellt wird. Die Auswertung der Messung sowie die Erstellung der zugehörigen Abbildungen erfolgte mit der Software Summit 4.3 (Beckman Coulter Inc., Orange County, USA).

Da es sich bei der Durchflusszytometrie um eine Relativmessung handelt, musste zunächst festgelegt werden, was als positives Signal gelten soll. Für eine selektive Analyse von definierten Zellpopulationen wurden außerdem so genannte „Gates“ (= definierte Regionen) festgelegt, welche beispielsweise den Ausschluss unerwünschter Ereignisse, wie tote Zellen, ermöglichen. Das Festlegen von Gates ist ein subjektiver Prozess, welcher jedoch die Messergebnisse in entscheidendem Maße beeinflusst. Daher sollte hierbei mit Bedacht vorgegangen werden. Wird ein Gate zu klein gewählt, so führt dies zu einem Verlust von Zellen in der gewünschten Population. Wählt man ein Gate wiederum zu groß, führt dies zu einer Verunreinigung der zu analysierenden Population mit unerwünschten Zellen.

Um die nAbs- α -Syn produzierenden B1-Lymphozyten von den anderen unterscheiden zu können, musste zunächst evaluiert werden, welche Signalstärke für das jeweilige Fluorophor ein positives Signal bedeutet. Dazu wurde zunächst eine ungefärbte Probe gemessen. Diese Messung wurde dann in einer „Punktdarstellung“, einem so genannten „Dot-Plot“, bei der jeder Punkt eine Zelle abbildet, mit dem FSC als Parameter der x-Achse und dem SSC als Parameter der y-Achse aufgetragen (s. Abb. 7a) und dann diejenige Population ausgewählt, die in ihrer Größe und Granularität der von vitalen B-Lymphozyten entsprachen. Eine klare Abgrenzung dieser Population war aufgrund der sich überlappenden Populationen diffizil. Für die anschließende Einzelzell-Sortierung ist eine möglichst hohe Reinheit der hier ausgewählten Population entscheidend. Aus diesem Grund wurde das Gate eher klein gewählt. In einem weiteren Dot-Plot wurden zwei verschiedene FSC gegeneinander aufgetragen (s. Abb. 7b) und so Zell-Dubletten ausgeschlossen. In jedem der drei folgenden Dot-Plots (s. Abb. 7c-e) wurden je zwei Fluoreszenzmarker gegeneinander aufgetragen. Die gemessene Fluoreszenzaktivität war

dabei aufgrund der Tatsache, dass die Zellen in dieser Probe ungefärbt waren, relativ niedrig und kann als unspezifische Auto-Floreszenz angesehen werden.

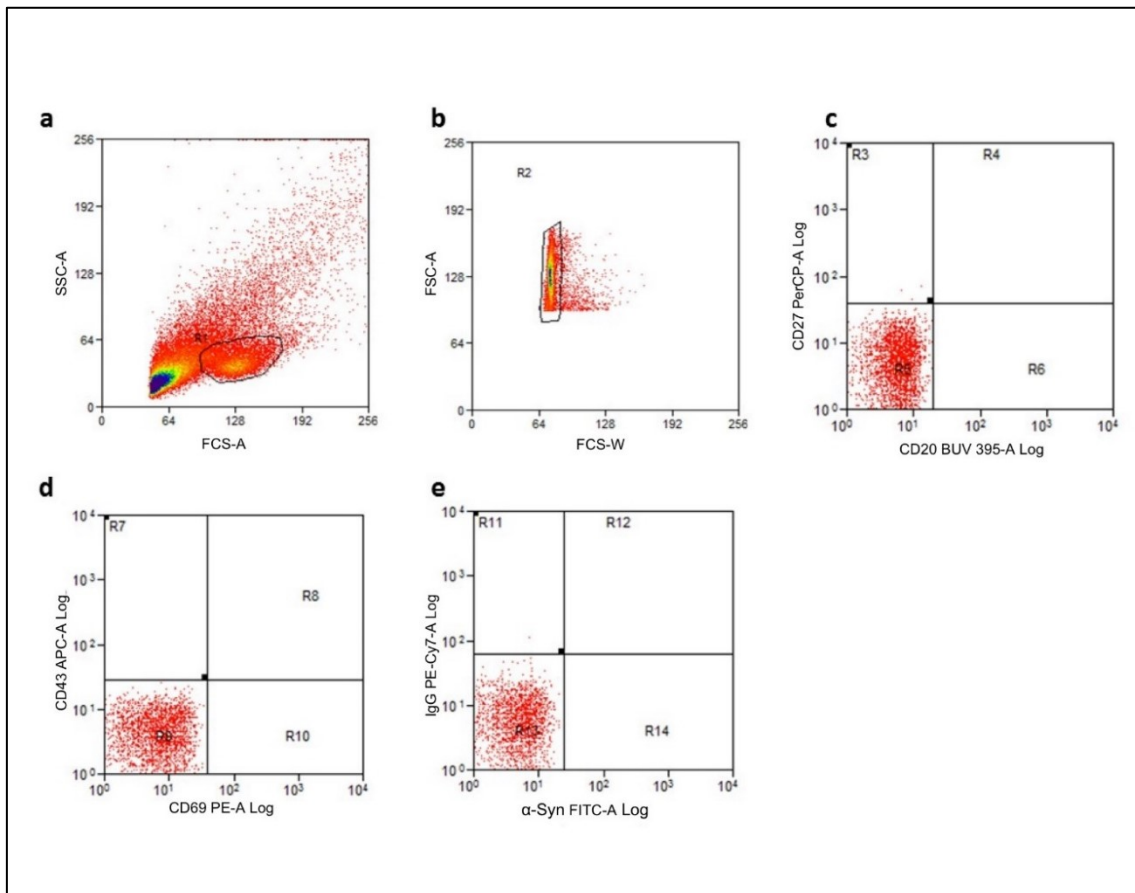


Abb. 7: Entwicklung einer Gating-Strategie an einer ungefärbten Probe.

(a) Dieses Gate grenzt lebende B-Lymphozyten ab von toten Zellen, Zellorganellen und anderen Zellen, die nicht während der „B-Zell-Aufreinigung“ entfernt wurden. (b) Mittels dieses Gates wurden Zell-Dubletten von der zu analysierenden Population ausgeschlossen. (c), (d) und (e) In jedem dieser Dot-plots wurden zwei verschiedene Fluoreszenzmarker logarithmisch gegeneinander aufgetragen. Da die Zellen in dieser Probe nicht gefärbt waren, handelt es sich bei der gemessenen Fluoreszenz um Auto-Fluoreszenz. Die Gates wurden um diese Negativpopulationen platziert und in nachfolgenden Messungen mit gefärbten Proben angewendet, um negative von positiven Populationen zu unterscheiden.

Die Gates, die auf diese Weise festgelegt wurden, können später auf gefärbten Proben angewendet werden, um die Trennlinie zwischen negativen und positiven Zellpopulationen zu ziehen (s. Abb. 8). Das Gate R1 zeigt vitale B-Lymphozyten (s. Abb. 7 a) und von diesen Zellen werden wiederum nur Einzelzellen in Gate R2 dargestellt (s. Abb. 7 b). In Abb. 7c werden diese Gates hintereinandergeschaltet angewendet, sodass in Gate R4 nur vitale, CD27+ und einzelne B-Lymphozyten wie Gedächtnis-B-Lymphozyten, aktivierte B-Lymphozyten und B1-Lymphozyten dargestellt werden. In Abb. 7d werden nur Zellen weiter analysiert, die in Gate R4 enthalten sind. Gate R7 beinhaltet B1-Lymphozyten und R12 zeigt letztendlich die gesuchten α -

Syn-bindenden, IgG+ B1-Lymphozyten. Eine einheitliche, konsequente Gating-Strategie ist ausschlaggebend, um vergleichbare Ergebnisse bei wiederholten Messungen zu gewährleisten.

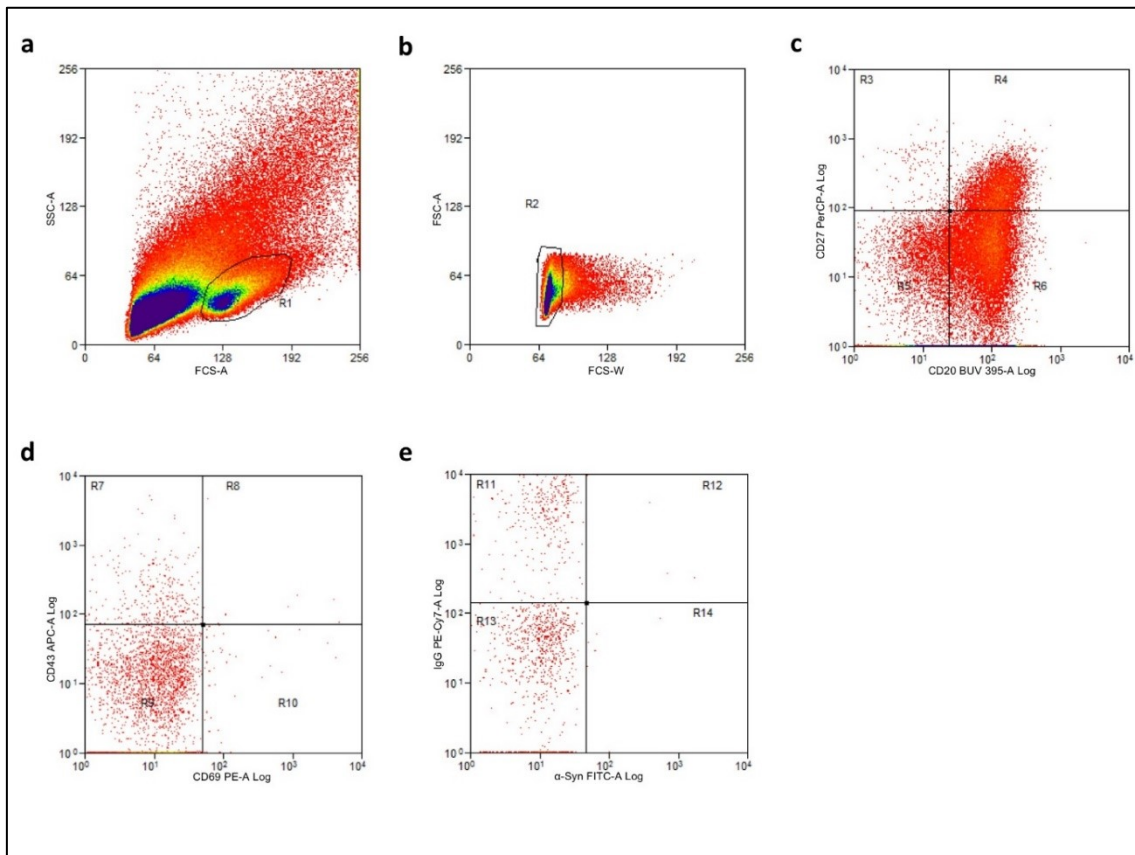


Abb. 8: Gating-Strategie an einer gefärbten Probe.

Diese Probe wurde mit $0,3 \mu\text{M}$ α -Syn-Fluorescein-Isothiocyanat (= FITC) und allen Antikörpern gegen CD-Oberflächenmarker gefärbt, die in Kapitel 2.2.5 angegeben sind. Die Negativpopulationen aus der ungefärbten Probe dienten als Anhaltspunkt für die Wahl der Gates. (a) Das Gate R1 grenzt lebende B-Lymphozyten ab von toten Zellen, Zellorganellen und anderen Zellen, die nicht während des „B-Zell-Aufreinigung“ entfernt wurden. (b) Mit Hilfe dieses Gates (R2) wurden Zell-Dubletten von der zu analysierenden Population ausgeschlossen. Die Zellen, die sich in R2 befinden, wurden weiter analysiert im Dot-Plot: (c) Zellen, die sowohl CD20 als auch CD27 auf ihrer Oberfläche exprimieren, sind sehr wahrscheinlich lebende B-Lymphozyten (R4). (d) In diesem Dot-Plot werden ausschließlich die Zellen aus R4 gezeigt. Mit Hilfe des Gates R7 wurden hieraus die B1-Lymphozyten ausgewählt und diese weiter im Dot-Plot analysiert: (e) In Gate R12 befinden sich die in diesem Experiment gesuchten Zellen, da sie alle Charakteristika von lebenden B1-Lymphozyten aufweisen und darüber hinaus gegen α -Syn gerichtete B-Zell-Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

3.2 Überprüfung der PCR-Amplifikate mittels Gelelektrophorese

Jeder nAb besteht, so wie jeder andere IgG-Antikörper auch, aus zwei schweren-Ketten (IgH), sowie zwei leichten Ketten desselben Subtyps (IgK oder Igλ). Um den Erfolg der Einzelzell-Sortierung und der anschließenden RT-PCR zu überprüfen, wurden Agarose-Gel-Elektrophoresen durchgeführt. Im Idealfall kann, wie in Abb. 9, für eine Zelle je eine klare Bande für die schwere Kette und für eine der beiden leichten Ketten detektiert werden.

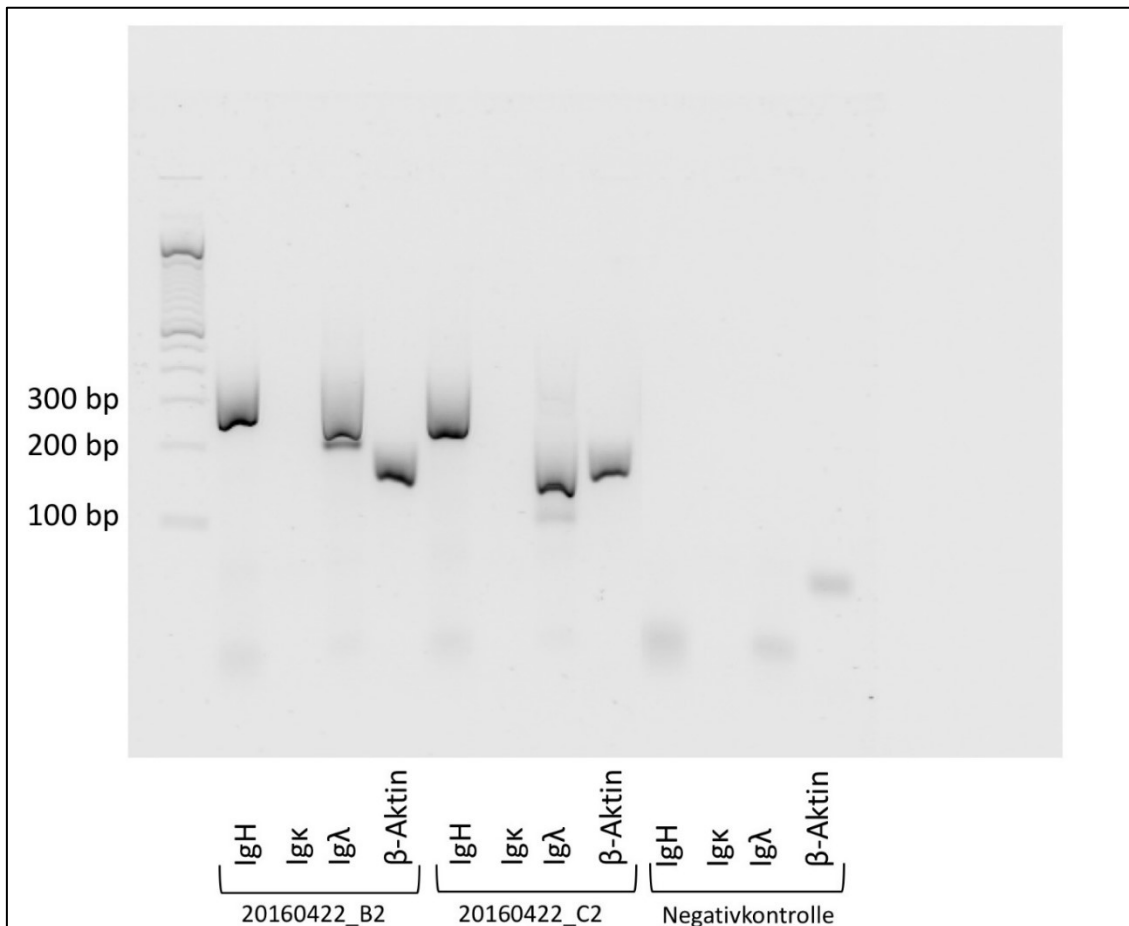


Abb. 9: Repräsentatives Beispiel für ein Gel-Bild.

Das Bild zeigt zwei repräsentative Zellen, aus denen jeweils die vollständige DNA für die nAbs- α -Syn (IgH und Igλ) extrahiert werden konnte, sowie eine Negativkontrolle (Nuklease-freies H₂O).

Die Hauptarbeit dieser Thesis bestand in der Etablierung einer Einzelzell-RT-PCR. Während dieses Prozesses, kam es zu unterschiedlichen Schwierigkeiten. Die Validierung der PCR-Ergebnisse erfolgte dabei, wie bereits oben erwähnt, über Gelelektrophoresen. Zuerst wurde ausschließlich eine primäre PCR zur Amplifikation der nAbs- α -Syn-DNA durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine primäre PCR allein nicht zu einer ausreichenden Sensitivität und Spezifität der Amplifikate führte, sodass häufig keine Banden im Gel detektiert werden konnten, die groß genug für eine Sequenz für eine Antikörper-Kette war (s. Abb. 10). Häufig konnten dann jedoch für alle Zellen und auch die Negativkontrolle Banden mit einer Größe kleiner als 100 Basenpaare

für IgH, Igκ und Igλ detektiert werden. Auch eine Sequenzierung der primären PCR-Produkte blieb oft erfolglos, weshalb im Verlauf auf ein Protokoll mit einer nachgeschalteten sekundären PCR umgestellt wurde.

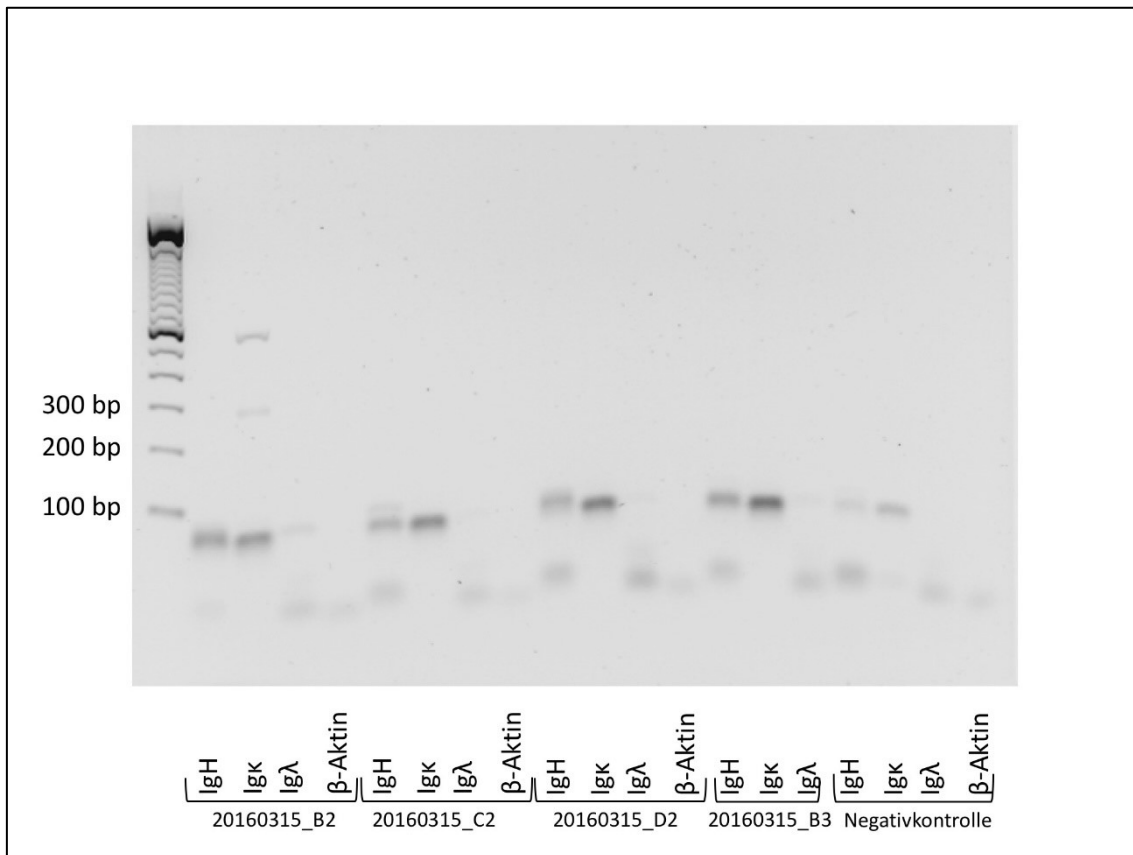


Abb. 10: Gel-Bild nach erfolgloser primärer PCR.

Das Bild zeigt die Elektrophorese der aufgereinigten primären PCR-Produkte aus 4 verschiedenen Zellen sowie der Negativkontrolle, während des Etablierungsprozesses der PCR. Zu diesem Zeitpunkt des Prozesses wurde noch keine nachgeschaltete sekundäre PCR durchgeführt. Bei allen Zellen und auch bei der Negativkontrolle sind Banden kleiner als 100 Basenpaare für IgH, Igκ und Igλ detektiert worden. Lediglich für die Zelle 20160315_B2 sind mehrere Banden für Igκ zu sehen.

Nach der Etablierung einer sekundären PCR konnten standardmäßig Ergebnisse wie in Abb. 9 erzielt werden. Etwaige Verunreinigungen konnten mit Hilfe der stets mitlaufenden Negativkontrolle schnell detektiert werden.

3.3 Sequenzen und phylogenetische Analyse

Nach der erfolgreichen Fehlerbehebung im Protokoll der RT-PCR konnten aus 11 Zellen die nAbs- α -Syn-DNA isoliert und die daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen ermittelt werden. Allerdings werden diese isolierten Aminosäuresequenzen der leichten und schweren Ketten aus den vereinzelt sortierten B1-Lymphozyten in dieser Arbeit aus Patentschutzgründen nicht dargestellt.

Um dennoch einen Einblick in den Erfolg der Einzelzell-RT-PCR zu ermöglichen, sind Auszüge aus den Ergebnissen der Analysen durch die Firma Yumab GmbH dargestellt (s. Tab. 10). Es zeigt sich bei vier der isolierten Sequenzen eine gute Punktzahl (s. Tab. 10 in grün hinterlegt) für den sogenannten „*developability score*“ (Englisch für: Punktzahl für Entwickelbarkeit = DS). Je höher die Punktzahl für den DS, desto wahrscheinlicher wird eine erfolgreiche Einbringung und Reproduktion der Sequenzen in HEK293-Zellen. Für den sogenannten „*probability index*“ (= PI) wurde für neun von elf Sequenzen eine gute Punktzahl ermittelt. Der PI gibt eine Wahrscheinlichkeit dafür an, dass es sich bei der Sequenz um die Sequenz eines humanen IgG handelt. Wie bereits in Kapitel 2.2.10 erwähnt, wurden jeweils die Sequenzen für die schweren (VH) und die leichten Ketten (VL) unter Zuhilfenahme von Sequenz-Datenbanken mit den Sequenzen von Keimbahngenen abgeglichen. Die prozentuale Übereinstimmung mit diesen Keimbahngenen wird durch den GI angegeben. Der GI wurde jeweils unabhängig voneinander für die VH-Sequenzen und die VL-Sequenzen bestimmt. Ab einer Übereinstimmung von 90 Prozent mit Keimbahngenen wurde der GI als positiv bewertet und in der Tab. 10 grün hinterlegt. Für die VH-Sequenzen wurde insgesamt vier Mal ein GI von über 90% bestimmt, für die VL-Sequenzen konnte der GI fünfmal als positiv bewertet werden. Bei drei Zellen (20160422_B3, 20160427_B3 und 20160427_C4) konnte ein positiver GI sowohl für die VH-Sequenz als auch für die VL-Sequenz ermittelt werden. Negativ bewertet wurde ein GI von weniger als 80% (in Tab. 10 rot hinterlegt). Zusätzlich wurde auch die Anzahl der PTM untersucht. Ab einer Anzahl von 9 wurde dieser Parameter als negativ bewertet (in Tab. 10 rot markiert), was bei den Sequenzen aus 4 Zellen der Fall war. Eine Analyse der Gesamtlänge der CDR ergab ebenfalls bei Sequenzen aus 4 der Zellen ein negatives Ergebnis mit einer Gesamtlänge von mehr als 68 Basenpaaren (in Tab. 10 rot markiert).

Tab. 10: Ergebnisse der Plausibilitätsprüfung und Analyse der Sequenzen durch die Yumab GmbH.

Für jede Zelle wurden jeweils die Sequenzen der schweren und der leichten Kette analysiert und dem verwendeten Gen zugeordnet. Ausschlaggebend für die Entscheidung, welche Sequenzen als Vorlage für monoklonale Antikörper dienen sollen, ist der sogenannte *developability score* (Englisch für: Punktzahl für Entwickelbarkeit = DS). Je höher die in dieser Kategorie vergebene Punktzahl, desto wahrscheinlicher wird eine erfolgreiche Einbringung und Reproduktion der Sequenzen in HEK293-Zellen. In der untenstehenden Tabelle sind Werte, die vielversprechend für die Entwicklung sind, grün hinterlegt. Rot hinterlegt sind hingegen Werte, die eher gegen eine gute Entwickelbarkeit der Sequenzen sprechen.

Zellbezeichnung	DS	VHV-Gen	VLV-Gen	PI humaner IgG	GI VH (%)	GI VL (%)	potenzielle PTM	Gesamtlänge der CDR
20160428_D5	5	Human IGHV3-72*01	Human IGKV1-9*01	8,06	91,9	92,9	6	64
20160422_B2	1	Human IGHV1-8*01	Human IGLV1-44*01	8,12	89	86,9	13	69
20160422_B3	8	Human IGHV3-9*01	Human IGLV1-55*02	8,06	95,4	97	10	72
20160426_B7	3	Human IGHV1-46*01	Human IGKV1-33*01	8,39	78	85,7	0	64
20160426_B2	7	Human IGHV3-7*02	Human IGKV3-20*01	7,58	89	99	7	59
20160426_E2	6	Human IGHV3-15*02	Human IGKV1-39*01	7,74	82	89,8	6	64
20160427_B3	5	Human IGHV3-7*02	Human IGKV1-5*03	7,46	93,6	95,9	9	71
20160427_C3	13	Human IGHV3-23*01	Human IGKV3-11*01	8,22	85,3	98	9	62
20160427_D3	6	Human IGHV3-53*01	Human IGKV1-33*01	7,77	87	52,5	4	59
20160427_C4	7	Human IGHV5-51*01	Human IGLV1-47*01	7,88	91,7	98	6	72
20160427_E4	5	Human IGHV3-72*01	Human IGKV1-13*01	7,75	87,4	87,8	3	62

Durch die detaillierte Analyse der variablen Regionen der jeweiligen Antikörper-Sequenzen war außerdem eine Zuordnung zu Keimbahn-Gen-Familien (s. Abb. 11) und damit des phylogenetischen Ursprungs der zugrundeliegenden nAbs- α -Syn möglich. Die Sequenzen der schweren Ketten konnten achtmal der IGHV3-Familie, zweimal der IGHV1-Familie und einmal der IGHV5-Familie zugeordnet werden. Damit konnte eine vorrangige Zugehörigkeit von 73% zur IGHV3-Familie beobachtet werden (s. Abb. 11 (a)). Die leichten Ketten ließen sich mit 55% am häufigsten der IGKV1-Familie zuordnen (s. Abb. 11 (b)). Dabei gehörten sechs der elf Sequenzen für die leichte Kette der IGKV1-Familie, zwei Sequenzen der IGKV3-Familie und drei Sequenzen der IGLV1-Familie an.

In Zusammenschau der Analyse-Ergebnisse wurden die Sequenzen aus den Zellen 20160422_B3, 20160426_B2 und 20160427_C3 ausgesucht, um in HEK293-Zellen eingebracht zu werden und so einen rekombinanten Antikörper zu generieren. Bei den ausgewählten Sequenzen scheint die Aussicht auf eine erfolgreiche Reproduktion am höchsten.

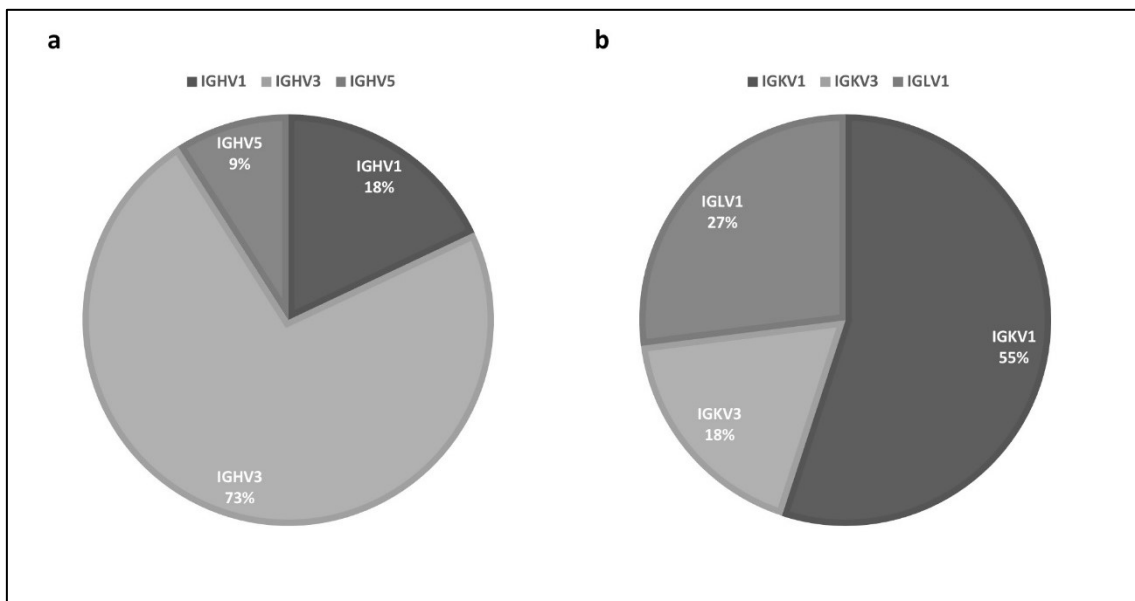


Abb. 11: Prozentuale Häufigkeit der verschiedenen Keimbahn-Gen-Familien (a) der schweren Ketten und (b) der leichten Ketten.

3.4 Fibrillationskinetik

Nach dreimaliger Durchführung des Fibrillations-Assays konnte nach Auswertung der Rohdaten (s. Kapitel 2.2.12) jeweils ein sigmoidaler Kurvenverlauf mit einem Sättigungseffekt der Fluoreszenzentwicklung nach ungefähr 24 Stunden beobachtet werden (s. Abb. 12). Es zeigten sich insbesondere für die Messungen n1 (Abb. 12, graue Quadrate) und n3 (Abb. 12, schwarze Dreiecke) ein sehr gleichförmiger Verlauf der Kinetik. Für die Messung n2 (Abb. 12, graue Kreise) zeigte sich eine insgesamt flachere Kurvenentwicklung mit einem zeitlich ähnlichen Verlauf zu n1 und n3.

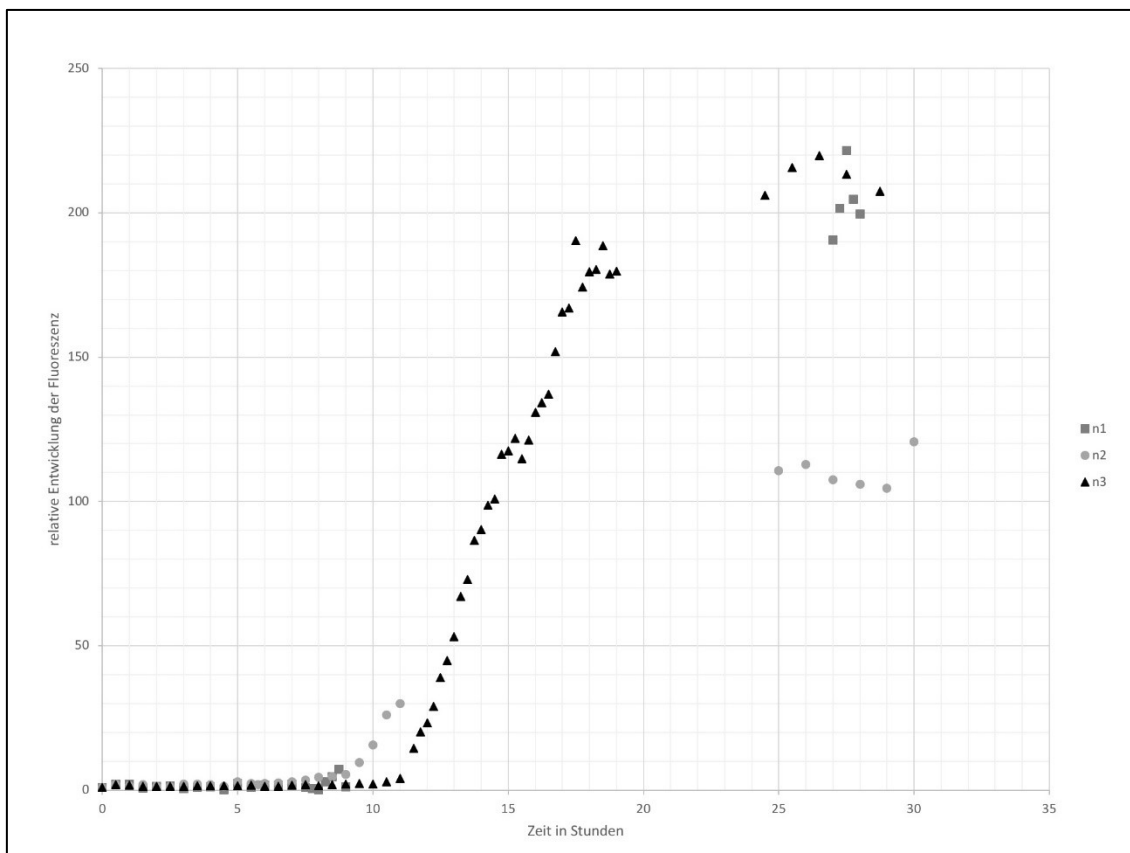


Abb. 12: Fibrillationskinetik des ThT-Fibrillations-Assays mit α -Syn (n=3).

Sowohl die Proben als auch die Leerwerte wurden bei allen drei Messreihen (bis auf die Messung n2, dargestellt als grauer Punkt) als Triplikate gemessen. Zur besseren Veranschaulichung wurden dann zu jedem Messzeitpunkt sowohl aus den Leerwerten als auch aus den Probenwerten jeweils die arithmetischen Mittel berechnet und der Mittelwert der Leerwerte vom Mittelwert der Probenwerte subtrahiert. Des Weiteren wurde zu jedem Messzeitpunkt der Quotient aus dieser Mittelwert-Differenz und der Mittelwert-Differenz zum Messzeitpunkt von 0 min gebildet. Dieser Wert wurde dann auf der y-Achse gegen die Zeit in Stunden auf der x-Achse aufgetragen. Demzufolge ist für jede Messreihe die zeitliche Entwicklung der Fluoreszenz in Bezug auf die Differenz des Probenmittelwertes und des Leerwertmittelwertes zum Zeitpunkt $t = 0$ Stunden dargestellt.

4. Diskussion

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die eine IVIG-unabhängige Gewinnung von nAbs- α -Syn ermöglicht und so die Herstellung eines rekombinanten Antikörpers, basierend auf der kodierenden Sequenz der Antigen-bindenden Region von nAbs- α -Syn, erlaubt. Ein solcher Antikörper könnte zur passiven Immunisierung beim IPS eingesetzt werden. Auch wenn bislang noch kein eindeutiger Zusammenhang zwischen erniedrigten nAbs- α -Syn Titern und der vermehrten Ablagerung von fehlgefaltetem α -Syn hergestellt werden konnte, stellen nAbs- α -Syn dennoch eine mögliche therapeutische Option dar, denn wie in Kapitel 1.3.2 erläutert, konnte im Mausmodell durch die Gabe von nAbs- α -Syn eine Verringerung der α -Syn-Oligomer-Konzentration und der intrazellulären α -Syn-Ablagerungen erzielt werden (Huang et al. 2019). Eine weitere interessante Beobachtung ist, wie bereits in Kapitel 1.4 erwähnt, dass B1-Lymphozyten in ihrer de-novo -Generation auf die fetale und neonatale Periode begrenzt sind und danach auf selbst-Erneuerung angewiesen sind (Hardy und Hayakawa 1994), wodurch sich mutmaßlich sowohl die mit dem Alter abnehmende Zahl an B1-Lymphozyten als auch die im Alter erniedrigten nAbs-Titer erklären lassen (Griffin und Rothstein 2012). Neurodegenerative Erkrankungen wie das IPS oder die Alzheimer Erkrankung treten bekanntlich vor allem in höherem Alter auf. Bei an Alzheimer Erkrankten konnte bereits festgestellt werden, dass sie im Vergleich zu neurologisch Gesunden erniedrigte nAbs-A β Spiegel aufweisen (Du et al. 2001; Weksler et al. 2002). Es könnte demnach ein Zusammenhang zwischen der sinkenden Konzentration von B1-Lymphozyten und der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen bestehen (Rothstein et al. 2013).

Möglicherweise kann durch die passive Immunisierung mit einem auf nAbs- α -Syn basierendem, rekombinanten Antikörper fehlgefaltetes α -Syn gebunden werden und so eine Oligomerisierung und die Bildung von Lewy-Körpern verhindert werden, sodass die Krankheitsprogression aufgehalten werden kann. Vorstellbar wäre außerdem die Anwendung bei Personen mit enger genetischer Verwandtschaft zu bereits an IPS Erkrankten, um wie mit einer Impfung die Wahrscheinlichkeit für eine Erkrankung noch vor ihrem Ausbruch zu reduzieren.

Die Entwicklung eines solchen rekombinanten Antikörpers bedarf vieler hintereinandergeschalteter Schritte, die jeweils eine Vielzahl möglicher Fehlerquellen beinhalten. Nach diversen Anpassungen des Versuchsablaufes, konnte jedoch ein reproduzierbares Protokoll zur Isolation nAbs- α -Syn-produzierenden B1-Lymphozyten und der Gewinnung der nAbs- α -Syn-kodierenden DNA entwickelt werden.

4.1 Kontroverse um humane nAbs-produzierende Zellen

Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, wird in dieser Arbeit angenommen, dass es sich bei den B1-Lymphozyten um die nAbs-produzierenden Zellen handelt. Während die Eigenschaften von nAbs-produzierenden Lymphozyten in Mäusen bereits genauer charakterisiert werden konnten, ist über diese Zellen im menschlichen Körper noch viel weniger bekannt (Holodick et al. 2017). Vor allem die B1-Lymphozyten-definierenden, humanen CD-Oberflächen-Marker sind noch immer strittig (Griffin et al. 2011; Descatoire et al. 2011; Perez-Andres et al. 2011). Denn während CD5 bei Mäusen bestimmend für die Zugehörigkeit zu den B1-Lymphozyten ist (Hardy 2006), wird humanes CD5 von unreifen B-Lymphozyten im Knochenmark und der Milz exprimiert und ist somit kein charakteristischer humaner Marker für B1-Lymphozyten (Sims et al. 2005; Cuss et al. 2006).

In dieser Arbeit fanden $CD20^+$, $CD27^+$, $CD43^+$, $CD69^-$ und IgG^+ als B1-Lymphozyten-definierende CD-Oberflächen-Marker Anwendung und es wurde ein bereits etabliertes Gating-Schema adaptiert (Griffin und Rothstein 2012). Perez-Andres et al. gehen davon aus, dass es sich bei einem Großteil der so charakterisierten Zellen nicht um B1-Lymphozyten handelt, sondern um Doubletten aus B- und T-Lymphozyten, da T-Lymphozyten weitaus häufiger im peripheren Blut vorkommen als B-Lymphozyten und außerdem auch die CD-Oberflächenantigene CD27 und CD43 exprimieren (Perez-Andres et al. 2011). T-Lymphozyten exprimieren jedoch zusätzlich CD3 auf ihrer Zelloberfläche, sodass das Auftreten von Doubletten aus B- und T-Lymphozyten in dieser Arbeit durch die Anwendung des B-Zell-Enrichment-Kits (EasySep™, STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Kanada) minimiert wurde, da hierdurch ein Großteil der $CD3^+$ T-Lymphozyten schon vor der Zellsortierung entfernt wurden (s. Kapitel 2.2.4). Auch Inui et al. gehen nicht davon aus, dass es sich bei den $CD20^+$ $CD27^+$ $CD43^+$ Zellen um das humane Äquivalent zu den murinen B1-Lymphozyten handelt, sondern definieren diese Zellen eher als $CD43^+$ B-Lymphozyten mit phänotypischen Markern ähnlich zu Gedächtnis-B-Lymphozyten (Inui et al. 2015). Des Weiteren, kann auch eine Zugehörigkeit der durch die oben genannten CD-Oberflächen-Marker definierten Zellen zu den Plasmablasten nicht vollständig ausgeschlossen werden (Descatoire et al. 2011). Covens et al. gehen davon aus, dass es sich bei den $CD20^+$ $CD27^+$ $CD43^+$ Zellen um eine Vorstufe in der Entwicklung von Plasmablasten handelt (Covens et al. 2013). Um die genaue Abgrenzung der humanen B1-Lymphozyten von anderen B-Lymphozyten-Subtypen zu ermöglichen, sollten daher zukünftig noch weitere Charakteristika ergänzend zu den CD-Oberflächen-Markern untersucht werden. Hierfür geeignet erscheinen u.a. die Oberflächenproteine Lektine, welche zur Superfamilie der Immunglobuline gehören und

Sialinsäure binden, die so genannten Siglecs (Crocker et al. 1998), da gezeigt werden konnte, dass CD43⁺-Zellen sich über die Präsentation von Siglec-10 und -2 auf ihrer Oberfläche von Plasmaplasten abgrenzen lassen (Inui et al. 2015). Eine weitere Möglichkeit zur eindeutigeren Charakterisierung von B1-Lymphozyten stellt die Untersuchung der unterschiedlichen Verteilung von Toll-like Rezeptoren auf der Zelloberfläche dar (Meyer-Bahlburg und Rawlings 2012). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei der eindeutigen Charakterisierung der nAbs-produzierenden Lymphozyten und damit des humanen Äquivalents zu den weitaus besser erforschten murinen B1-Lymphozyten noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

Nichtsdestotrotz wurden in dieser Arbeit diejenigen B-Lymphozyten als nAbs-produzierende Zellen und als B1-Lymphozyten bezeichnet, welche die Oberflächen-Marker CD20⁺, CD27⁺, CD43⁺, CD69⁻ und IgG⁺ exprimieren, da der genaue Ursprung der hier generierten Antikörper-Sequenzen in Bezug auf ihre therapeutische Anwendung zunächst nebensächlich erscheint. Von zentraler Bedeutung für eine therapeutische Anwendung ist vielmehr, dass ein Antikörper, der mit Hilfe des hier entwickelten Protokolls hergestellt wird, in der Lage ist an α -Syn zu binden und gegebenenfalls die Bildung von α -Syn-Oligomeren bzw. -Fibrillen zu verhindern. Ein Nachweis dieser Bindungseigenschaften soll zukünftig noch erbracht werden.

4.2. Fehlersuche und -behebung während der Etablierung des RT-PCR-Protokolls

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, kann die erfolgreiche Amplifikation der nAbs- α -Syn DNA mittels Gelelektrophorese validiert werden. Finden sich Banden für Ig κ und Ig λ , kann dies ein Hinweis auf Fehler während des experimentellen Verlaufes sein. Wurde beispielsweise vom MoFlo irrtümlicherweise mehr als eine Zelle in ein Well sortiert, so müssen diese Zellen nicht zwingend die gleiche leichte Kette exprimieren, was zu Signalen für beide leichten Ketten führen würde. Auch eine Kontamination der Mastermixe oder Proben während des PCR-Ablaufes wäre eine denkbare Fehlerquelle für ein solches Gel-Bild. Um derartige Verunreinigungen zu identifizieren, wurde in jedem PCR-Durchlauf eine Negativ-Kontrolle mit Nuklease-freiem H₂O mit ausgeführt. Darüber hinaus wurde β -Aktin als Positivkontrolle für jede Zelle eingesetzt. Können Signale für β -Aktin im Gel detektiert werden, jedoch keine Signale für schwere Ketten und leichte Ketten, so deutet dies darauf hin, dass es sich bei der sortierten Zelle nicht um eine nAbs-produzierende Zelle handelt. Wurden jedoch weder für β -Aktin noch für die Antikörper-Ketten im Gel Banden sichtbar, so könnte dies auf einen Fehler während der RT und /oder der PCR hinweisen.

Während des Etablierungsprozesses wurde das PCR-Protokoll mehrmals verändert, um bestmögliche Ergebnisse zu erzielen. So wurde zu Beginn des Prozesses zunächst ausschließlich eine primäre PCR durchgeführt, dabei zeigten sich jedoch in der anschließenden Gelelektrophorese häufig entweder gar keine Banden oder mehrere, unterschiedlich große Banden für eine Kette (s. Abb. 10). Wenn sich für eine Antikörper-Kette (IgH, Igκ oder Igλ) mehrere Banden unterschiedlicher Größe nachweisen lassen (s. Abb. 10, Zelle 20160315_B2 Igκ), kann dies daran liegen, dass das Primer-Set nicht nur an die Zielsequenz, sondern auch noch an andere Sequenzbereiche der durch die RT gewonnenen Gesamt-DNA der Zelle binden (Arnemann 2019). Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde daher im Verlauf des Prozesses im Sinne einer so genannten „*nested*“ (Englisch für: geschachtelt) PCR nach der primären PCR eine sekundäre PCR mit den PCR-Produkten aus der primären PCR und anderen Primer-Sets durchgeführt (Green und Sambrook 2019). Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ihre Bindungsstellen innerhalb der Bindungsstellen des ersten Primer-Sets lagen, sodass das entstehende DNA-Fragment etwas kürzer als das DNA-Fragment nach der primären PCR ist. Des Weiteren bietet eine *nested* PCR den Vorteil, dass durch das Nachschalten der sekundären PCR eine insgesamt höhere Zyklenzahl erreicht werden kann, was zusätzlich die Sensitivität der PCR steigert.

Nach erfolgreicher Etablierung der sekundären PCR traten zudem kaum noch Primer-Dimere auf (s. Abb. 9). Zu Primer-Dimeren kommt es, wenn sich die Primer bevorzugt an sich selber oder andere Primer aus dem Primer-Set anlagern, was vor allem der Fall ist, wenn die Primerkonzentration die Konzentration der Ziel-DNA weit übersteigt (Lorenz 2012). Bei den in Kapitel 3.2 beschriebenen Banden, die alle kleiner als 100 Basenpaare sind und die für jede Zelle und die Negativkontrolle jeweils für IgH, Igκ und Igλ nach der alleinigen primären PCR auftraten (s. Abb. 10), handelt es sich höchstwahrscheinlich um ebensolche Primer-Dimere.

4.3 Einordnung der Ergebnisse der phylogenetischen Analyse

Durch die detaillierte Analyse der variablen Regionen der jeweiligen Antikörper-Sequenzen war eine Zuordnung zu Keimbahn-Gen-Familien (s. Abb. 11) und damit des phylogenetischen Ursprungs der zugrundeliegenden nAbs- α -Syn möglich.

Es zeigte sich, wie schon in Kapitel 3.3 beschrieben, dass sich die schweren Ketten mit 73% am häufigsten der IGVH3-Familie zuordnen lassen und die leichten Ketten mit dem größten Anteil

von 55% der IGKV1-Familie angehören. Diese Beobachtung deckt sich mit den Resultaten von Pascual et al., bei deren Tau-reaktiven nAbs sich ebenfalls eine Verteilung zugunsten der IGHV3- und der IGKV1-Familie zeigte (Pascual et al. 2017) und unterstützt außerdem die Hypothese, dass spezifische nAbs von Keimbahn-Genen kodiert werden und einen gemeinsamen Ursprung haben. Allerdings ist die IGVH3-Familie auch bei ruhenden B-Lymphozyten im peripheren Blut und in der Milz die am häufigsten verwendete Keimbahn-Gen-Familie (Davidkova et al. 1997), sodass es sich bei der beobachteten Präferenz auch um einen statistischen Effekt handeln könnte. Wie schon in Kapitel 4.1 erläutert, ist auch diese Einordnung der Ergebnisse aus der phylogenetischen Analyse für den angestrebten therapeutischen Einsatz zweitrangig.

4.4 Herausforderungen bei der Etablierung eines Protokolls zur Fibrillation von α -Syn

Bei der Etablierung eines Protokolls für die Fibrillation α -Syn konnte jeweils eine ähnliche Kinetik für die verschiedenen Messreihen dargestellt werden, allerdings konnten außerdem einige Limitationen der Methodik nachgewiesen werden. Beispielsweise wurde nicht bei allen drei Messreihen zum gleichen Zeitpunkt gemessen, da die Messung nicht automatisiert stattfand. Des Weiteren wurde nicht jedes Mal über den gesamten Messzeitraum alle 30 min gemessen. Dennoch zeigt sich in jeder der Versuchsreihen ein sigmoidaler Verlauf mit einer Sättigung nach ungefähr 24 Stunden Reaktionszeit. Auch der Kurvenverlauf ist bei den drei Messreihen ähnlich. Der Sättigungseffekt lässt sich dadurch erklären, dass nach einer bestimmten Reaktionszeit (nach ca. 20 h) kein monomer vorliegendes Protein mehr vorhanden und daher keine weitere Fibrillenbildung mehr möglich ist. Eine automatisierte Messung über den gesamten Messzeitraum könnte eine präzisere Abbildung der Fibrillationskinetik wie bei Cohlberg et al. liefern (Cohlberg et al. 2002). Die Etablierung eines Fibrillationsprotokolls diene hier ausschließlich dem Zweck, zukünftig das Potential von nAbs- α -Syn bezüglich der Hemmung einer α -Syn-Fibrillenbildung zu evaluieren. Unter diesem Gesichtspunkt sind eine automatisierte Messung und eine präzise Darstellung der Kinetik nicht notwendig. Es genügt, dass es sich bei dem Protokoll um eine reproduzierbare Methodik handelt, bei der die Fibrillenbildung mit und ohne Zusatz von z.B. nAbs- α -Syn oder IVIg miteinander verglichen werden kann.

Bei der Messreihe n2 konnten zudem die Proben und die Leerwerte nur als Duplikate gemessen werden, da das vorhandene Protein nicht für eine Triplikat-Messung ausreichte. Da aber jeweils die arithmetischen Mittelwerte zu jedem Messzeitpunkt gebildet wurden, sollte dies einen vernachlässigbaren Einfluss auf das Ergebnis haben. Dennoch zeigt sich bei genau dieser

Messreihe ein flacherer Kurvenverlauf und demnach eine weniger starke relative Entwicklung der Fluoreszenz. Da der zeitliche Verlauf der Kurve jedoch nahezu simultan mit den anderen beiden Kurven verläuft, ist davon auszugehen, dass sich in den Proben weniger zu fibrillierendes Material bzw. weniger α -Syn befand.

Alles in allem konnte ein reproduzierbares Protokoll zur Fibrillation von α -Syn etabliert werden. Ob es sich bei den fluoreszenzeinlagernden Strukturen um Fibrillen handelt, kann zum Beispiel mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen verifiziert werden.

4.5 Ausblick

Der in dieser Arbeit entwickelte und dargelegte Arbeitsablauf zur Bestimmung der kodierenden Sequenz der nAbs- α -Syn stellt ein Beispiel der Nutzung dieser Vorgehensweise dar und ist übertragbar auf die Ermittlung der kodierenden Sequenz von jeglichen im Blut zirkulierenden natürlich vorkommenden Antikörpern. So könnten zukünftig auch weitere Autoimmunerkrankungen behandelt werden, bei deren Therapie man momentan noch auf IVIG-Präparate angewiesen ist (Gelfand 2012; Beauté et al. 2010). Bei den letztendlich gewonnenen Antikörpern handelt es sich um monoklonale Antikörper, basierend auf natürlich zirkulierenden Antikörpern, die möglicherweise zur passiven Immunisierung beim IPS eingesetzt werden können. Zukünftig sollen für weitere Untersuchungen drei der ermittelten Sequenzen in Kooperation der Yumab GmbH in humane IgG₁-Konstrukte kloniert und in HEK-Zellen exprimiert werden. Für die Klonierung in die HEK-Zellen wurden die Sequenzen der folgenden Zellen ausgewählt: 20160422_B3, 20160426_B2 und 20160427_C3, da sie laut der Analyse durch die Yumab GmbH (s.Tab. 10), die besten Übereinstimmungen mit Keimbahn-Sequenzen aufwiesen. Anschließend sollen Tests der so entstandenen Antikörper, analog zu den Tests der auf die gleiche Weise entwickelten rekombinanten Amyloid-beta- (= A β) Antikörper, durchgeführt werden. Diesbezüglich wurde von Albus et al. ein Paper veröffentlicht, in dem unter anderem das Bindungsverhalten der Antikörper in einem antikörperbasierten Nachweisverfahren, dem sogenannten „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“ (= ELISA), mit IVIG und daraus aufgereinigten nAbs-A β und die Funktionalität im ThT-Fibrillations-Assay verglichen wurden (Albus et al. 2021). Des Weiteren ermöglichte die Oberflächen-Plasmonen-Resonanzspektroskopie die Bestimmung der Bindungsstärke sowie eine zeitaufgelöste Messung der Bindungskinetik. Diese Experimente sollen in Zukunft auch für die rekombinanten α -Syn-Antikörper durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit das α -Syn-Fibrillations-Assay etabliert (s. Kapitel 2.2.11).

Bei signifikanter Bindung und effektiver Verhinderung der Bildung von α -Syn-Oligomeren und α -Syn-Fibrillen in diesen Experimenten könnten die Antikörper dann auf ihre therapeutische Wirksamkeit sowie mögliche Nebenwirkungen in geeigneten Zellkulturen, Schnittkulturen, Mausexperimenten und schließlich in klinischen Studien untersucht werden. Als Modellzellen für das IPS könnten beispielsweise LUHMES-Zellen, bei denen es sich um fetale neuronale Zellen handelt (Zhang et al. 2014; Lotharius et al. 2002), und humane Neuroblastomzellen, welche zu dopaminergen Neuronen differenziert werden können, die so genannten SH-SY5Y-Zellen verwendet werden (Xie et al. 2010). Beide Zelllinien sind gut kultivierbar und stellen auch im Hinblick auf Untersuchungen zur Neuroprotektion ein geeignetes Modell dar (Xie et al. 2010; Zhang et al. 2014). Auch muss bei Antikörpern, die zur Therapie bei neurodegenerativen Erkrankungen gedacht sind, immer untersucht werden, ob die BHS von ihnen überwunden werden kann.

5. Zusammenfassung

Bei dem idiopathischen Parkinson-Syndrom handelt es sich nach der Alzheimer-Erkrankung um die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung, deren Prävalenz aufgrund der immer älter werdenden Bevölkerung noch weiter zunehmen wird. Rigor, Tremor und Bradykinese sind die Hauptsymptome dieser Erkrankung, welche 1817 erstmals von James Parkinson beschrieben wurde. Die motorischen Symptome lassen sich auf den Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra, eine den Basalganglien zugeordnete Region des Mittelhirns, zurückführen. Der Substantia nigra wird unter anderem eine Beteiligung an motorischen Funktionen, Lernprozessen, Koordination und der Kognition zugeschrieben. Das histopathologische Charakteristikum des idiopathischen Parkinson-Syndroms sind intraneurale Proteineinschlüsse, die sogenannten Lewy-Körperchen. Diese Einschlüsse bestehen zum Großteil aus aggregiertem, fehlgefaltetem alpha-Synuklein. Über welche Mechanismen diese Lewy-Körperchen dopaminerge Neuronen schädigen, ist nicht abschließend geklärt.

Die bisherige Therapie des idiopathischen Parkinson-Syndroms mit Levodopa zielt darauf ab, das dopaminerge Defizit auszugleichen und somit vor allem die motorischen Symptome weitestgehend zu kontrollieren. Eine krankheitsmodifizierende oder gar kurative Therapie steht aktuell nicht zur Verfügung. Erfolgversprechende Therapieansätze bestehen in der passiven Immunisierung mit gegen alpha-Synuklein gerichteten Antikörpern. In diesem Zusammenhang konnten natürlich vorkommende Autoantikörper identifiziert werden, welche pathologisch aggregierte Proteine erkennen, deren mikrogliale Aufnahme fördern und somit deren Ablagerung verhindern können. Spezifische alpha-Synuklein-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper können mittels Affinitätschromatographie aus kommerziell erwerblichen intravenösen Immunglobulinen der Klasse IgG isoliert werden. Da es sich bei intravenösen Immunglobulinen der Klasse IgG jedoch um eine begrenzte und teure Ressource handelt, wäre eine Methode zur Herstellung von alpha-Synuklein-reaktiven natürlich vorkommenden Autoantikörpern, unabhängig von intravenösen Immunglobulinen der Klasse IgG, von Vorteil.

Natürlich vorkommende Autoantikörper sind Bestandteil des humanen Antikörperpools und werden von B1-Lymphozyten gebildet. Diese B1-Lymphozyten können durch für sie charakteristische Oberflächenantigene von anderen B-Lymphozyten unterschieden werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zu entwickeln, die eine Isolation derjenigen B1-Lymphozyten erlaubt, welche alpha-Synuklein-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper produzieren und aus deren Antigen-bindende Domäne zu sequenzieren. Die Grundlage hierfür war

Spenderblut neurologisch gesunder Spenderinnen und Spender. Nach der Aufreinigung des Blutes mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden B-Lymphozyten mit Hilfe einer Magnet-Aufreinigung von den anderen Zellen getrennt. Fluoreszenz-Aktivierte-Zellsortierung erlaubte es, die Population der B1-Lymphozyten, welche alpha-Synuklein-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper produzieren, weiter zu charakterisieren. Anschließend erfolgte eine Einzelzell-Sortierung der gewünschten B1-Lymphozyten. Die Antikörper-kodierenden Basensequenzen aus den einzelnen Zellen wurden durch eine Einzelzell-Reverse-Transkription-Polymerasekettenreaktion erhalten und mit Hilfe von Gen-Datenbanken in Aminosäuresequenzen umgeschrieben.

Außerdem erfolgte eine phylogenetische Analyse der variablen Regionen von leichten und schweren Ketten der Antikörper-Sequenzen, welche insofern ein plausibles Ergebnis ergab, als dass sie sich mit den Erkenntnissen vorheriger Studien in Bezug auf die verwendeten Keimbahnen-Familien von Tau-reaktiven natürlich vorkommenden Autoantikörpern deckt. Eine genaue Aufklärung der Herkunft der sequenzierten alpha-Synuklein-reaktiven natürlich vorkommenden Autoantikörper ist allerdings für die eventuelle therapeutische Anwendung weniger von Bedeutung.

Es war möglich aus dem Blut von neurologisch Gesunden alpha-Synuklein-reaktive natürlich vorkommende Autoantikörper produzierende B1-Lymphozyten zu isolieren und aus diesen spezifischen B1-Lymphozyten die Antigen-bindende Region zu gewinnen und zu sequenzieren. Um nun einen monoklonalen Antikörper basierend auf der genetischen Information dieser natürlich zirkulierenden Antikörper zu erhalten, sollen in Zukunft die drei in den Analysen als am aussichtsreichsten identifizierten Sequenzen aus den Zellen 20160422_B3, 20160426_B2 und 20160427_C3 in einen geeigneten Expressionsvektor eingebracht werden. Mit diesem Konstrukt sollen humane embryonale Nierenzellen der Zelllinie 293 transfiziert werden. Die so erhaltenen monoklonalen Antikörper müssen anschließend auf ihre Bindungseigenschaften zu alpha-Synuklein, ihre therapeutische Wirksamkeit und mögliche Nebenwirkungen untersucht werden.

Es besteht die Möglichkeit, dass zukünftig ein durch dieses Protokoll entwickelter, monoklonaler Antikörper, der auf einem alpha-Synuklein-reaktiven natürlich vorkommendem Autoantikörper basiert, zur passiven Immunisierung eingesetzt werden kann, indem er fehlgefaltetes α -Syn bindet und so eine Oligomerisierung und die Bildung von Lewy-Körpern verhindert, sodass die Krankheitsprogression aufgehalten werden kann.

6. Summary

The idiopathic Parkinson's syndrome is the second most common neurodegenerative disease after Alzheimer's disease and its prevalence is predicted to increase even further due to demographic changes. The main clinical symptoms of the idiopathic Parkinson's syndrome, which was first described in 1817 by James Parkinson, are rigor, resting tremor and bradykinesia. These motor symptoms can be linked to a progressing decline of the dopaminergic neurons within the substantia nigra, which belongs to the basal ganglia in the midbrain and inter alia participates in motoric functions, learning processes, coordination and cognition. Pathologically, intraneural deposits of proteins, commonly known as Lewy-bodies, are characteristic of idiopathic Parkinson's syndrome. These inclusions mainly consist of aggregated and misfolded α -Syn. Lewy-bodies damage dopaminergic neurons in the substantia nigra through a yet unknown mechanism.

The current therapy of the idiopathic Parkinson's syndrome mainly aims at compensating the dopaminergic deficit and thereby controlling the motoric symptoms. At present there is no disease modifying or even curative therapy available. Nevertheless, passive immunization with alpha-synuclein-reactive antibodies are promising therapeutic approaches. In this context alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies were identified, which are able to recognize pathologically aggregated proteins and inhibit their accumulation by promoting the microglial uptake. Specific alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies can be isolated from commercially acquired intravenous immunoglobulins of the subtype IgG by affinity chromatography. However, IVIG is a limited and expensive resource, as its preparation is dependent on blood donations. Therefore, the establishment of an intravenous immunoglobulins of the subtype IgG-independent method of producing alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies would be beneficial.

Naturally occurring autoantibodies are a component of the human antibody pool and they are secreted by B1-lymphocytes. These B1-cells can be distinguished from other B-lymphocytes by characteristic clusters of differentiation on their cell surface. As the aim of this thesis was to establish a protocol that allows the isolation of alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibody-producing B1-lymphocytes and grants the sequencing of their antigen-binding domain. The basis of this approach were blood samples from clinically healthy donors. After the purification from the blood by means of density gradient centrifugation, a B-cell enrichment was performed.

Fluorescent-activated cell sorting allowed the characterization of the B1-lymphocyte population which secretes alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies. Subsequently, a single cell sorting of the desired B1-lymphocytes was executed. Antibody-coding base sequences of the individual cells were obtained by single-cell-reverse-transcription-polymerase-chain-reaction and with the help of a genetic database transcribed into amino acid sequences.

Apart from that, a phylogenetic analysis of the variable regions of the antibodies' light and heavy chain sequences was performed, which results were consistent with previous studies regarding the germinal gen usage of tau-reactive naturally occurring autoantibodies. However, a detailed investigation of the alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibodies' origin is less important for their potential therapeutic use.

In conclusion, we were able to isolate the alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibody-producing B1-lymphocytes from the blood of healthy donors. It was also possible to gain the antigen-binding regions from the specific B1-lymphocytes. For the generation of a monoclonal antibody based on the genetic information of these naturally circulating antibodies, the sequences, which were identified as the most promising in the analysis, from the cells 20160422_B3, 20160426_B2 und 20160427_C3, shall be cloned in a suitable expression vector. Prospectively human embryonal kidney cells can be transfected with this construct. After that the monoclonal antibodies which were obtained in this way, must be reviewed concerning their binding characteristics towards alpha-synuclein, their therapeutic efficiency and probable side effects.

Hopefully, it will be possible prospectively to use a monoclonal antibody based on the genetic information of an alpha-synuclein-reactive naturally occurring autoantibody as a passive immunization approach, whilst binding misfolded alpha-synuclein and thereby inhibiting oligomerization and the formation of Lewy-bodies, which would enable the constraint of the disease progression.

7. Referenzen

Abeliovich A, Schmitz Y, Fariñas I, Choi-Lundberg D, Ho W-H, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000). Mice Lacking α -Synuclein Display Functional Deficits in the Nigrostriatal Dopamine System. *Neuron* 25 (1), 239–252.

Albin RL, Young AB, Penney JB (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12 (10), 366–375.

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* 463, 355–369.

Alexander G, DeLong MR, Strick PL (1986). Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu Rev Neurosci* 9, 357–381.

Allman D und Pillai S (2008). Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 20 (2), 149–157.

Alves G, Forsaa EB, Pedersen KF, Dreetz Gjerstad M, Larsen JP (2008). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol* 255 Suppl 5, 18–32.

Arnemann J (2019). Nested-PCR. In: Axel M. Gressner und Torsten Arndt (Hg.): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer (Springer Reference Medizin), 1736.

Avrameas S und Ternynck T (1993). The natural autoantibodies system: Between hypotheses and facts. *Molecular Immunology* 30 (12), 1133–1142.

BD Bioscience (Hg.) BD Bioscience: Spectrumguidepage. online verfügbar unter: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>, zuletzt geprüft am: 15.10.2021.

Beauchamp LC, Finkelstein DI, Bush AI, Evans AH, Barnham KJ (2020). Parkinsonism as a Third Wave of the COVID-19 Pandemic? *J Parkinsons Dis* 10 (4), 1343–1353.

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* 160 (2), 240–245.

Becker G, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K (1995). Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 45 (1), 182–184.

- Bendtzen K, Svenson M, Jønsson V, Hippe E (1990). Autoantibodies to cytokines - friends or foes? *Immunology Today* 11, 167–169.
- Berg D, Becker G, Zeiler B, Tucha O, Hofmann E, Preier M, Benz P, Jost W, Reiners K, Lange KW (1999). Vulnerability of the nigrostriatal system as detected by transcranial ultrasound. *Neurology* 53 (5), 1026–1031.
- Berg D, Merz B, Reiners K, Naumann M, Becker G (2005). Five-year follow-up study of hyperechogenicity of the substantia nigra in Parkinson's disease. *Mov Disord* 20 (3), 383–385.
- Berrington JE, Barge D, Fenton AC, Cant AJ, Spickett GP (2005). Lymphocyte subsets in term and significantly preterm UK infants in the first year of life analysed by single platform flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 140 (2), 289–292.
- Besong-Agbo D, Wolf E, Jessen F, Oechsner M, Hametner E, Poewe W, Reindl M, Oertel WH, Noelker C, Bacher M, Dodel R (2013). Naturally occurring α -synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology* 80 (2), 169–175.
- Biancalana M und Koide S (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim Biophys Acta* 1804 (7), 1405–1412.
- Birkmayer W und Hornykiewicz O (1961). The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr* 73, 787–788.
- Boyden SV (1966). Natural Antibodies and the Immune Response 5, 1–28.
- Brightman MW und Reese TS (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 40 (3), 648–677.
- Brudek T, Winge K, Folke J, Christensen S, Fog K, Pakkenberg B, Pedersen LØ (2017). Autoimmune antibody decline in Parkinson's disease and Multiple System Atrophy; a step towards immunotherapeutic strategies. *Mol Neurodegener* 12 (1), 44.
- Brundin P, Ma J, Kordower JH (2016). How strong is the evidence that Parkinson's disease is a prion disorder? *Curr Opin Neurol* 29 (4), 459–466.
- Caballol N, Martí MJ, Tolosa E (2007). Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease. *Mov Disord* 22 Suppl 17, S358-66.
- Calne DB, Teychenne PF, Leigh PN, Bamji AN, Greenacre JK (1974). Treatment of parkinsonism with bromocriptine. *Lancet* 2 (7893), 1355–1356.
- Carlsson A (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev* 11 (2, Part 2), 490–493.

- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T (1957). 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180 (4596), 1200.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127 (3296), 471.
- Caruso A, Bonfanti C, Colombrita D, Francesco M de, Rango C de, Foresti I, Gargiulo F, Gonzales R, Gribaudo G, Landolfo S (1990). Natural antibodies to IFN-gamma in man and their increase during viral infection. *J Immunol* 144 (2), 685–690.
- Castonguay A-M, Gravel C, Lévesque M (2021). Treating Parkinson's Disease with Antibodies: Previous Studies and Future Directions. *J Parkinsons Dis* 11 (1), 71–92.
- Chakravarthy VS, Joseph D, Bapi RS (2010). What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biol Cybern* 103 (3), 237–253.
- Chatterjee D und Kordower JH (2019). Immunotherapy in Parkinson's disease: Current status and future directions. *Neurobiol Dis* 132, 104587.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease. Diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5 (3), 235–245.
- Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P (2005). The non-motor symptom complex of Parkinson's disease. A comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5 (4), 275–283.
- Chen L, Xie Z, Turkson S, Zhuang X (2015). A53T human α -synuclein overexpression in transgenic mice induces pervasive mitochondria macroautophagy defects preceding dopamine neuron degeneration. *J. Neurosci.* 35 (3), 890–905.
- Chu Y und Kordower JH (2015). The prion hypothesis of Parkinson's disease. *Curr Neurol Neurosci Rep* 15 (5), 28.
- Coelho-Cerqueira E, Pinheiro AS, Follmer C (2014). Pitfalls associated with the use of Thioflavin-T to monitor anti-fibrillogenic activity. *Bioorg Med Chem Lett* 24 (14), 3194–3198.
- Cohlberg JA, Li J, Uversky VN, Fink AL (2002). Heparin and other glycosaminoglycans stimulate the formation of amyloid fibrils from alpha-synuclein in vitro. *Biochemistry* 41 (5), 1502–1511.
- Corrodi H, Fuxe K, Hökfelt T, Lidbrink P, Ungerstedt U (1973). Effect of ergot drugs on central catecholamine neurons: evidence for a stimulation of central dopamine neurons. *J Pharm Pharmacol* 25 (5), 409–412.

- Cotzias GC, Papavasiliou PS, Gellene R (1969). Modification of Parkinsonism--chronic treatment with L-dopa. *N Engl J Med* 280 (7), 337–345.
- Coutinho A, Kazatchkine MD, Avrameas S (1995). Natural autoantibodies. *Curr Opin Immunol* 7 (6), 812–818.
- Covens K, Verbinnen B, Geukens N, Meyts I, Schuit F, van Lommel L, Jacquemin M, Bossuyt X (2013). Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood* 121 (26), 5176–5183.
- Crocker PR, Clark EA, Filbin M, Gordon S, Jones Y, Kehrl JH, Kelm S, Le Douarin N, Powell L, Roder J, Schnaar RL, Sgroi DC, Stamenkovic K, Schauer R, Schachner M, van den Berg TK, van der Merwe PA, Watt SM, Varki A (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8 (2), v.
- Crossman AR (1989). Neural mechanisms in disorders of movement. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 93 (1), 141–149.
- Cuss AK, Avery DT, Cannons JL, Yu LJ, Nichols KE, Shaw PJ, Tangye SG (2006). Expansion of functionally immature transitional B cells is associated with human-immunodeficient states characterized by impaired humoral immunity. *J Immunol* 176 (3), 1506–1516.
- Davidkova G, Pettersson S, Holmberg D, Lundkvist I (1997). Selective usage of VH genes in adult human B lymphocyte repertoires. *Scand J Immunol* 45 (1), 62–73.
- Delenclos M, Jones DR, McLean PJ, Uitti RJ (2016). Biomarkers in Parkinson's disease: Advances and strategies. *Parkinsonism & Related Disorders* 22 Suppl 1, S106-10.
- DeLong MR und Wichmann T (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64 (1), 20–24.
- Descatoire M, Weill J-C, Reynaud C-A, Weller S (2011). A human equivalent of mouse B-1 cells? *J Exp Med* 208 (13), 2563–2564.
- Deuschl G, Oertel W, Poewe W, Oertel WH (Hg.) (2020). Parkinson-Syndrom und andere Bewegungsstörungen. 2. überarbeitete Auflage. Stuttgart: Thieme. online verfügbar unter: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:24-epflicht-1932044>.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hg.) (2016). S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinsonsyndrom. Langversion. online verfügbar unter: https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030010_LL_langfassung_ips_2016.pdf, zuletzt geprüft am: 08.08.2021.

- Devine M, Gwinn K, Singleton A, Hardy J (2011). Parkinson's disease and α -synuclein expression. *Mov Disord* 26 (12), 2160–2168.
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A, Tanner CM (2007). Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68 (5), 384–386.
- Dorsey ER, Sherer T, Okun MS, Bloem BR (2018). The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. *J Parkinsons Dis* 8 (s1), S3-S8.
- Doty RL, Deems DA, Stellar S (1988). Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38 (8), 1237–1244.
- 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* 57 (5), 801–805.
- Eggert K, Schrader C, Hahn M, Stamelou M, Rüssmann A, Dengler R, Oertel W, Odin P (2008). Continuous jejunal levodopa infusion in patients with advanced parkinson disease: practical aspects and outcome of motor and non-motor complications. *Clin Neuropharmacol* 31 (3), 151–166.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DM, Ikeda S, Cookson MR, Hardy J, Allsop D (2003). Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17 (13), 1945–1947.
- Elbaz A, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog J, Schaid DJ, Rocca WA (2002). Risk tables for parkinsonism and Parkinson's disease. *J Clin Epidemiol* 55 (1), 25–31.
- Elkon K und Casali P (2008). Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4 (9), 491–498.
- Fazio P, Svenningsson P, Forsberg A, Jönsson EG, Amini N, Nakao R, Nag S, Halldin C, Farde L, Varrone A (2015). Quantitative Analysis of ^{18}F -(E)-N-(3-Iodoprop-2-Enyl)-2 β -Carbofluoroethoxy-3 β -(4'-Methyl-Phenyl) Nortropane Binding to the Dopamine Transporter in Parkinson Disease. *J Nucl Med* 56 (5), 714–720.
- Fearnley JM und Lees AJ (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283–2301.

- Felice FG de, Tovar-Moll F, Moll J, Munoz D, Ferreira ST (2020). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the Central Nervous System. *Trends Neurosci* 43 (6), 355–357.
- Follett KA, Weaver FM, Stern M, Hur K, Harris CL, Luo P, Marks WJ, Rothlind J, Sagher O, Moy C, Pahwa R, Burchiel K, Hogarth P, Lai EC, Duda JE, Holloway K, Samii A, Horn S, Bronstein JM, Stoner G, Starr PA, Simpson R, Baltuch G, Salles A de, Huang GD, Reda DJ (2010). Pallidal versus subthalamic deep-brain stimulation for Parkinson's disease. *New England Journal of Medicine* 362 (22), 2077–2091.
- Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999). Diagnostic Criteria for Parkinson Disease. *Arch Neurol* 56 (1), 33.
- Gelfand EW (2012). Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. *N Engl J Med* 367 (21), 2015–2025.
- Goedert M (2001). Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2 (7), 492–501.
- Green MR und Sambrook J (2019). Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc* 2019 (2).
- Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL (2011). Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+ CD27+ CD43+ CD70-. *J Exp Med* 208 (1), 67–80.
- Griffin DO und Rothstein TL (2012). Human b1 cell frequency: isolation and analysis of human b1 cells. *Front Immunol* 3, 122.
- Grosset, DG; Fernandez, HH; Okun, MS; Grosset, KA (2009). Parkinson's disease. London: Manson (Clinician's desk reference).
- Gruden MA, Sewell RD, Yanamandra K, Davidova TV, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Bocharova OA, Bocharova OR, Polyschuk VV, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA (2011). Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J Neuroimmunol* 233 (1-2), 221–227.
- Gruden MA, Yanamandra K, Kucheryanu VG, Bocharova OR, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA, Sewell RD (2012). Correlation between protective immunity to α -synuclein aggregates, oxidative stress and inflammation. *Neuroimmunomodulation* 19 (6), 334–342.

- Gu H, Förster I, Rajewsky K (1990). Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J* 9 (7), 2133–2140.
- Haehner A, Boesveldt S, Berendse HW, Mackay-Sim A, Fleischmann J, Silburn PA, Johnston AN, Mellick GD, Herting B, Reichmann H, Hummel T (2009). Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. *Parkinsonism & Related Disorders* 15 (7), 490–494.
- Hansen MB, Svenson M, Abell K, Yasukawa K, Diamant M, Bendtzen K (1995). Influence of interleukin-6 (IL-6) autoantibodies on IL-6 binding to cellular receptors. *Eur J Immunol* 25 (2), 348–354.
- Hardy R (2006). B-1 B cell development. *The Journal of immunology* 177 (5), 2749–2754.
- Hardy RR und Hayakawa K (1994). CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55, 297–339.
- Harindranath N, Ikematsu H, Notkins AL, Casali P (1993). Structure of the VH and VL segments of polyreactive and monoreactive human natural antibodies to HIV-1 and Escherichia coli beta-galactosidase. *Int Immunol* 5 (12), 1523–1533.
- Hayakawa K, Carmack CE, Hyman R, Hardy RR (1990). Natural autoantibodies to thymocytes: origin, VH genes, fine specificities, and the role of Thy-1 glycoprotein. *J Exp Med* 172 (3), 869–878.
- Hayakawa K, Hardy R, Parks, La Herzenberg (1983). The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *J Exp Med* 157 (1), 202–218.
- Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg L, Steinberg AD (1984). Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81 (8), 2494–2498.
- Hayakawa K, Hardy RR, La Herzenberg (1985). Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells. *J Exp Med* 161 (6), 1554–1568.
- Heim B, Krismer F, Marzi R de, Seppi K (2017). Magnetic resonance imaging for the diagnosis of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)* 124 (8), 915–964.
- Heinzel S, Gold M, Deuschle C, Bernhard F, Maetzler W, Berg D, Dodel R (2014). Naturally occurring alpha-synuclein autoantibodies in Parkinson's disease: sources of (error) variance in biomarker assays. *PLoS One* 9 (12), e114566.
- Hirsch EC (2009). Iron transport in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders* 15, S209-S211.

- Holodick NE, Rodríguez-Zhurbenko N, Hernández AM (2017). Defining Natural Antibodies. *Front Immunol* 8, 872.
- Huang Y-R, Xie X-X, Ji M, Yu X-L, Zhu J, Zhang L-X, Liu X-G, Wei C, Li G, Liu R-T (2019). Naturally occurring autoantibodies against α -synuclein rescues memory and motor deficits and attenuates α -synuclein pathology in mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 124, 202–217.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992). Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55 (3), 181–184.
- Inui M, Hirota S, Hirano K, Fujii H, Sugahara-Tobinai A, Ishii T, Harigae H, Takai T (2015). Human CD43+ B cells are closely related not only to memory B cells phenotypically but also to plasma-blasts developmentally in healthy individuals. *Int Immunol* 27 (7), 345–355.
- Jankovic J (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79 (4), 368–376.
- Jankovic J, Goodman I, Safirstein B, Marmon TK, Schenk DB, Koller M, Zago W, Ness DK, Griffith SG, Grundman M, Soto J, Ostrowitzki S, Boess FG, Martin-Facklam M, Quinn JF, Isaacson SH, Omidvar O, Ellenbogen A, Kinney GG (2018). Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- α -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 75 (10), 1206–1214.
- Jankovic J, McDermott M, Carter J, Gauthier S, Goetz C, Golbe L, Huber S, Koller W, Olanow C, Shoulson I (1990). Variable expression of Parkinson's disease: a base-line analysis of the DATATOP cohort. The Parkinson Study Group. *Neurology* 40 (10), 1529–1534.
- Jarozeski MJ und Radcliff G (1999). Fundamentals of flow cytometry. *Mol Biotechnol* 11 (1), 37–53.
- Kantor AB, Merrill CE, Herzenberg LA, Hillson JL (1997). An unbiased analysis of V(H)-D-J(H) sequences from B-1a, B-1b, and conventional B cells. *The Journal of immunology* 158 (3), 1175–1186.
- Kasaian MT, Ikematsu H, Casali P (1992). Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies. *J Immunol* 148 (9), 2690–2702.
- Kato T (2007). Evaluation of dopaminergic presynaptic function by F-18 DOPA PET. *Rinsho Shinkeigaku* 47 (11), 829–831.

- Knapp MJ und Colburn PA (1990). Clinical uses of intravenous immune globulin. *Clin Pharm* 9 (7), 509–529.
- Krebs M, Bromley EH, am Donald (2005). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* 149 (1), 30–37.
- Krestova M, Hromadkova L, Rigny J (2017). Purification of Natural Antibodies Against Tau Protein by Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol* 1643, 33–44.
- Lang AE und Lozano AM (1998). Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339 (15), 1044–1053.
- Lee J-S und Lee S-J (2016). Mechanism of Anti- α -Synuclein Immunotherapy. *J Mov Disord* 9 (1), 14–19.
- LeVine H (1999). Quantification of beta-sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Meth Enzymol* 309, 274–284.
- Lewy FH (1914). Zur pathologischen Anatomie der Paralysis agitans. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde*, 50–55.
- Ling W-L, Lua W-H, Poh J-J, Yeo JY, Lane DP, Gan SK-E (2018). Effect of VH-VL Families in Pertuzumab and Trastuzumab Recombinant Production, Her2 and Fc γ IIA Binding. *Front Immunol* 9, 469.
- Lorenz TC (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* (63), e3998.
- Lotharius J, Barg S, Wiekop P, Lundberg C, Raymon HK, Brundin P (2002). Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line. *J Biol Chem* 277 (41), 38884–38894.
- Louis ED, La Klatka, Liu Y, Fahn S (1997). Comparison of extrapyramidal features in 31 pathologically confirmed cases of diffuse Lewy body disease and 34 pathologically confirmed cases of Parkinson's disease. *Neurology* 48 (2), 376–380.
- Lünemann JD, Quast I, Dalakas MC (2016). Efficacy of Intravenous Immunoglobulin in Neurological Diseases. *Neurotherapeutics* 13 (1), 34–46.
- Maetzler W, Apel A, Langkamp M, Deuschle C, Dilger SS, Stirnkorb JG, Schulte C, Schleicher E, Gasser T, Berg D (2014). Comparable autoantibody serum levels against amyloid- and inflammation-associated proteins in Parkinson's disease patients and controls. *PLoS One* 9 (2), e88604.

- Mandler M, Valera E, Rockenstein E, Weninger H, Patrick C, Adame A, Santic R, Meindl S, Vigl B, Smrzka O, Schneeberger A, Mattner F, Masliah E (2014). Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathol* 127 (6), 861–879.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988). Synuclein. A neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8 (8), 2804–2815.
- Marras C und Lang A (2013). Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 84 (4), 409–415.
- Mars H (1973). Modification of levodopa effect by systemic decarboxylase inhibition. *Arch Neurol* 28 (2), 91–95.
- Martin WE, Loewenson RB, Resch JA, Baker, AB (1973). Parkinson's disease. Clinical analysis of 100 patients. *Neurology* 23 (8), 783–790.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D (2005). Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron* 46 (6), 857–868.
- Masliah E, Rockenstein E, Mante M, Crews L, Spencer B, Adame A, Patrick C, Trejo M, Ubhi K, Rohn TT, Mueller-Steiner 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* 6 (4), e19338.
- McKinnon KM (2018). Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120, 5.1.1-5.1.11.
- Mehnert S, Reuter I, Schepp K, Maaser P, Stolz E, Kaps M (2010). Transcranial sonography for diagnosis of Parkinson's disease. *BMC Neurol* 10, 9.
- Melamed E, Hefti F, Wurtman RJ (1980). Nonaminergic striatal neurons convert exogenous L-dopa to dopamine in parkinsonism. *Ann Neurol* 8 (6), 558–563.
- Meyer-Bahlburg A und Rawlings DJ (2012). Differential impact of Toll-like receptor signaling on distinct B cell subpopulations. *Front Biosci (Landmark Ed)* 17 (4), 1499–1516.
- Mhyre TR, Boyd JT, Hamill RW, Maguire-Zeiss KA (2012). Parkinson's disease. *Subcell Biochem* 65, 389–455.
- Milanov (2000). Clinical and electromyographic examinations of Parkinsonian tremor. *Parkinsonism & Related Disorders* 6 (4), 229–235.

- Mortada I, Farah R, Nabha S, Ojcius DM, Fares Y, Almawi WY, Sadier NS (2021). Immunotherapies for Neurodegenerative Diseases. *Front Neurol* 12, 654739.
- Nielsen CH und Bendtzen K (2012). Immunoregulation by naturally occurring and disease-associated autoantibodies: binding to cytokines and their role in regulation of T-cell responses. *Adv Exp Med Biol* 750, 116–132.
- Nyholm D, Askmark H, Gomes-Trolin C, Knutson T, Lennernäs H, Nyström C, Aquilonius S-M (2003). Optimizing levodopa pharmacokinetics: intestinal infusion versus oral sustained-release tablets. *Clin Neuropharmacol* 26 (3), 156–163.
- Nyholm D, Lennernäs H, Gomes-Trolin C, Aquilonius S-M (2002). Levodopa pharmacokinetics and motor performance during activities of daily living in patients with Parkinson's disease on individual drug combinations. *Clin Neuropharmacol* 25 (2), 89–96.
- Obeso JA, Rodriguez-Oroz MC, Goetz CG, Marin C, Kordower JH, Rodriguez M, Hirsch EC, Farrer M, Schapira A, Halliday G (2010). Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nat Med* 16 (6), 653–661.
- Obeso JA, Stamelou M, Goetz CG, Poewe W, Lang AE, Weintraub D, Burn D, Halliday GM, Bezard E, Przedborski S, Lehericy S, Brooks DJ, Rothwell JC, Hallett M, DeLong MR, Marras C, Tanner CM, Ross GW, Langston JW, Klein C, Bonifati V, Jankovic J, Lozano AM, Deuschl G, Bergman H, Tolosa E, Rodriguez-Violante M, Fahn S, Postuma RB, Berg D, Marek K, Standaert DG, Surmeier DJ, Olanow CW, Kordower JH, Calabresi P, Schapira AH, Stoessl AJ (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord* 32 (9), 1264–1310.
- Ochsenbein AF, Fehr T, Lutz C, Suter M, Brombacher F, Hengartner H, Zinkernagel RM (1999). Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies. *Science* 286 (5447), 2156–2159.
- Oertel W und Schulz JB (2016). Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem* 139 Suppl 1, 325–337.
- Oertel WH, Wolters E, Sampaio C, Gimenez-Roldan S, Bergamasco B, Dujardin M, Grosset DG, Arnold G, Leenders KL, Hundemer H-P, Lledó A, Wood A, Frewer P, Schwarz J (2006). Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Mov Disord* 21 (3), 343–353.

- Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL (2007). Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem* 101 (3), 749–756.
- Parkinson J (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14 (2), 223-36; discussion 222.
- Pascual G, Wadia JS, Zhu X, Keogh E, Kükreer B, van Ameijde J, Inganäs H, Siregar B, Perdok G, Diefenbach O, Nahar T, Sprengers I, Koldijk MH, Brinkman-van der Linden EC, La Peferoen, Zhang H, Yu W, Li X, Wagner M, Moreno V, Kim J, Costa M, West K, Fulton Z, Chammass L, Luckashenak 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* 133 (5), 767–783.
- Patrias LM, Klaver AC, Coffey MP, Loeffler DA (2010). Specific antibodies to soluble alpha-synuclein conformations in intravenous immunoglobulin preparations. *Clin Exp Immunol* 161 (3), 527–535.
- Peng Y, Martin DA, Kenkel J, Zhang K, Ogden CA, Elkon KB (2007). Innate and adaptive immune response to apoptotic cells. *J Autoimmun* 29 (4), 303–309.
- Pennell CA, Sheehan KM, Brodeur PH, Clarke SH (1989). Organization and expression of VH gene families preferentially expressed by Ly-1+ (CD5) B cells. *Eur J Immunol* 19 (11), 2115–2121.
- Perez-Andres M, Grosserichter-Wagener C, Teodosio C, van Dongen JJ, Orfao A, van Zelm MC (2011). The nature of circulating CD27+CD43+ B cells. *J Exp Med* 208 (13), 2565–2566.
- Poewe W, Volc D, Seppi K, Medori R, Lühns P, Kutzelnigg A, Djamshidian A, Thun-Hohenstein C, Meissner WG, Rascol O, Schneeberger A, Staffler G, deMarzi R, Heim B, Mangesius S, Stolz R, Wachowicz K, Riha C, Bürger V, Galabova G (2021). Safety and Tolerability of Active Immunotherapy Targeting α -Synuclein with PD03A in Patients with Early Parkinson's Disease: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 1 Study. *J Parkinsons Dis* 11 (3), 1079–1089.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276 (5321), 2045–2047.
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G (2015). MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30 (12), 1591–1601.

- Prasad EM und Hung S-Y (2021). Current Therapies in Clinical Trials of Parkinson's Disease: A 2021 Update. *Pharmaceuticals (Basel)* 14 (8).
- Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD, Deyn PP de, Clarke CE, Lang AE (2000). A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. *N Engl J Med* 342 (20), 1484–1491.
- Rees RN, Acharya AP, Schrag A, Noyce AJ (2018). An early diagnosis is not the same as a timely diagnosis of Parkinson's disease. *F1000Res* 7.
- Relkin N (2014). Clinical trials of intravenous immunoglobulin for Alzheimer's disease. *J Clin Immunol* 34 Suppl 1, S74-9.
- Rijk MC de, Launer LJ, Berger K, Breteler MM, Dartigues JF, Baldereschi M, Fratiglioni L, Lobo A, Martinez-Lage J, Trenkwalder C, Hofman A (2000). Prevalence of Parkinson's disease in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54 (11 Suppl 5), 21-3.
- Rinne UK, Bracco F, Chouza C, Dupont E, Gershanik O, Marti Masso JF, Montastruc JL, Marsden CD (1998). Early treatment of Parkinson's disease with cabergoline delays the onset of motor complications. Results of a double-blind levodopa controlled trial. The PKDS009 Study Group. *Drugs* 55 Suppl 1, 23–30.
- Rodriguez-Oroz MC, Obeso JA, Lang AE, Houeto J-L, Pollak P, Rehncrona S, Kulisevsky J, Albanese A, Volkmann J, Hariz MI, Quinn NP, Speelman JD, Guridi J, Zamarbide I, Gironell A, Molet J, Pascual-Sedano B, Pidoux B, Bonnet AM, Agid Y, Xie J, Benabid A-L, Lozano AM, Saint-Cyr J, Romito L, Contarino MF, Scerrati M, Fraix V, van Blercom N (2005). Bilateral deep brain stimulation in Parkinson's disease: a multicentre study with 4 years follow-up. *Brain* 128 (Pt 10), 2240–2249.
- Ross GW, Petrovitch H, Abbott RD, Tanner CM, Popper J, Masaki K, Launer L, White LR (2008). Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol* 63 (2), 167–173.
- Rothstein TL, Griffin DO, Holodick NE, Quach TD, Kaku H (2013). Human B-1 cells take the stage. *Ann N Y Acad Sci* 1285, 97–114.
- Saeed U, Lang AE, Masellis M (2020). Neuroimaging Advances in Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonian Syndromes. *Front Neurol* 11, 572976.

- Sanz I, Casali P, Thomas JW, Notkins AL, Capra JD (1989). Nucleotide sequences of eight human natural autoantibody VH regions reveals apparent restricted use of VH families. *J Immunol* 142 (11), 4054–4061.
- Schneeberger A, Mandler M, Mattner F, Schmidt W (2010). AFFITOME® technology in neurodegenerative diseases: the doubling advantage. *Hum Vaccin* 6 (11), 948–952.
- Selkoe DJ (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews* 81 (2), 741–766.
- Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA (2000). Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (9), 4897–4902.
- Shulman LM, Taback RL, Bean J, Weiner WJ (2001). Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. *Mov Disord* 16 (3), 507–510.
- Silverman GJ, Grönwall C, Vas J, Chen Y (2009). Natural autoantibodies to apoptotic cell membranes regulate fundamental innate immune functions and suppress inflammation. *Discov Med* 8 (42), 151–156.
- Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarboro CH, Illei GG, Lipsky PE (2005). Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood* 105 (11), 4390–4398.
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D, Adler C, Cookson MR, Muenter M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003). alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302 (5646), 841.
- Smith LM, Schiess MC, Coffey MP, Klaver AC, Loeffler DA (2012). α -Synuclein and anti- α -synuclein antibodies in Parkinson's disease, atypical Parkinson syndromes, REM sleep behavior disorder, and healthy controls. *PLoS One* 7 (12), e52285.
- Stein MR, Nelson RP, Church JA, Wasserman RL, Borte M, Vermeylen C, Bichler J (2009). Safety and efficacy of Privigen, a novel 10% liquid immunoglobulin preparation for intravenous use, in patients with primary immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 29 (1), 137–144.
- Sung VW und Nicholas AP (2013). Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: expanding the view of Parkinson's disease beyond a pure motor, pure dopaminergic problem. *Neurol Clin* 31 (3 Suppl), S1-16.

- Svenson M, Hansen MB, Kayser L, Rasmussen AK, Reimert CM, Bendtzen K (1992). Effects of human anti-IL-1 alpha autoantibodies on receptor binding and biological activities of IL-1. *Cytokine* 4 (2), 125–133.
- Svenson M, Poulsen LK, Fomsgaard A, Bendtzen K (1989). IgG autoantibodies against interleukin 1 alpha in sera of normal individuals. *Scand J Immunol* 29 (4), 489–492.
- Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H (2008). Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 329 (1-2), 112–124.
- Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM (2010). Detection of elevated levels of α -synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology* 75 (20), 1766–1772.
- Ugalde CL, Finkelstein DI, Lawson VA, Hill AF (2016). Pathogenic mechanisms of prion protein, amyloid- β and α -synuclein misfolding: the prion concept and neurotoxicity of protein oligomers. *J Neurochem* 139 (2), 162–180.
- Valera E und Masliah E (2013). Immunotherapy for neurodegenerative diseases: focus on α -synucleinopathies. *Pharmacol Ther* 138 (3), 311–322.
- van de Loo S, Walter U, Behnke S, Hagenah J, Lorenz M, Sitzer M, Hilker R, Berg D (2010). Reproducibility and diagnostic accuracy of substantia nigra sonography for the diagnosis of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 81 (10), 1087–1092.
- van den Eeden SK, Tanner CM, Bernstein AL, Fross RD, Leimpeter A, Da Bloch, Nelson LM (2003). Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. *Am J Epidemiol* 157 (11), 1015–1022.
- Vargas JY, Grudina C, Zurzolo C (2019). The prion-like spreading of α -synuclein: From in vitro to in vivo models of Parkinson's disease. *Ageing Res Rev* 50, 89–101.
- Volc D, Poewe W, Kutzelnigg A, Lühns P, Thun-Hohenstein C, Schneeberger A, Galabova G, Majbour N, Vaikath N, El-Agnaf O, Winter D, Mihailovska E, Mairhofer A, Schwenke C, Staffler G, Medori R (2020). Safety and immunogenicity of the α -synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a randomised, single-blinded, phase 1 trial. *The Lancet Neurology* 19 (7), 591–600.
- Watson JV (1999). The early fluidic and optical physics of cytometry. *Cytometry* 38 (1), 2-14; discussion 1.

- Weihofen A, Liu Y, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA, Baeriswyl J-L, Cavegn N, Senn L, Su L, Marsh G, Auluck PK, Montrasio F, Nitsch RM, Hirst WD, Cedarbaum JM, Pepinsky RB, Grimm J, Weinreb PH (2019). Development of an aggregate-selective, human-derived α -synuclein antibody B1B054 that ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiol Dis* 124, 276–288.
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway K, Lansbury PT (1996). NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35 (43), 13709–13715.
- 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* 37 (7), 943–948.
- Winkler TH, Fehr H, Kalden JR (1992). Analysis of immunoglobulin variable region genes from human IgG anti-DNA hybridomas. *Eur J Immunol* 22 (7), 1719–1728.
- Wise SP, Murray E, Gerfen CR (1996). The frontal cortex-basal ganglia system in primates. *Crit Rev Neurobiol* 10 (3-4), 317–356.
- Withers GS, George JM, Banker GA, Clayton DF (1997). Delayed localization of synelfin (synuclein, NACP) to presynaptic terminals in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 99 (1), 87–94.
- Witjas T, Kaphan E, Azulay JP, Blin O, Ceccaldi M, Pouget J, Poncet M, Cherif AA (2002). Nonmotor fluctuations in Parkinson's disease. Frequent and disabling. *Neurology* 59 (3), 408–413.
- Woulfe JM, Duke R, Middeldorp JM, Stevens S, Vervoort M, Hashimoto M, Masliah E, Chan P, Di Monte DA, Langston JW, Petzinger G, Hoogendoorn H, Munoz DG (2002). Absence of elevated anti-alpha-synuclein and anti-EBV latent membrane protein antibodies in PD. *Neurology* 58 (9), 1435–1436.
- Xie H, Hu L, Li G (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl)* 123 (8), 1086–1092.
- Yahr MD (Hg.) (1973). Treatment of Parkinsonism - the role of dopa decarboxylase inhibitors. The role of dopa decarboxylase inhibitors. New York: Raven Press (Advances in neurology, v. 2).
- Yanamandra K, Gruden MA, Casate V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA (2011). α -synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One* 6 (4), e18513.

Yu YJ und Watts RJ (2013). Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics* 10 (3), 459–472.

Zach H, Walter U, Liepelt-Scarfone I, Maetzler W (2017). Diagnostik des klinischen und prodromalen idiopathischen Parkinson-Syndroms : Neue Kriterien. *Nervenarzt* 88 (4), 356–364.

Zesiewicz TA, Sullivan KL, Arnulf I, Chaudhuri KR, Morgan JC, Gronseth GS, Miyasaki J, Iverson DJ, Weiner WJ (2010). Practice Parameter: treatment of nonmotor symptoms of Parkinson disease: report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 74 (11), 924–931.

Zhang X-M, Yin M, Zhang M-H (2014). Cell-based assays for Parkinson's disease using differentiated human LUHMES cells. *Acta Pharmacol Sin* 35 (7), 945–956.

8. Anhang

8.1 Danksagung

An dieser Stelle danke ich allen Personen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle möchte ich Herrn **Prof. Dr. med. Richard Dodel** für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas danken. Sie hatten stets Verständnis für Verzögerungen infolge meiner familiären und gesundheitlichen Situation und zeigten sich immer geduldig. Danke, dass Sie mich auch noch Jahre nach Beginn meiner Promotion unterstützt und an die Fertigstellung meiner Arbeit geglaubt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau **Dr. rer. nat. Alexandra Albus**, die mit mir gemeinsam in ihre Promotion startete und die durch ihre längere Laborerfahrung und aufgrund der Tatsache, dass unsere Projekte sich ähnelten, immer meine erste Ansprechpartnerin bei Problemen und Fragen war. Danke für deine Hilfsbereitschaft und dein offenes Ohr. Es hat mir Spaß gemacht, mit dir gemeinsam Lösungen für auftretende Probleme bei den zu finden und schlussendlich die ersten Ergebnisse unserer Projekte in einem gemeinsamen Paper zu veröffentlichen. Auch nach dem Umzug der Arbeitsgruppe von Marburg nach Essen, hast du immer versucht, mich auf dem neusten Stand zu halten. Danke, dass du dich auch Jahre später dazu bereit erklärt hast, meine Arbeit vor der Abgabe zu lesen und mit deiner konstruktiven Kritik zu verbessern. Danke auch an **Gavin** und **Susanne** bei der Unterstützung und Hilfe an technischen Geräten und für mich neuen Labormethoden.

Auch wenn die Laborversuche, auf der diese Dissertation basiert, schon abgeschlossen waren, als ich Mutter meiner ersten Tochter wurde, braucht das Schreiben dennoch viel Zeit, von der man als Studentin mit Kind ohnehin schon wenig hat. Deshalb möchte ich an dieser Stelle auch meiner gesamten Familie und allen Personen danken, die mich bei der Kinderbetreuung unterstützt haben, wann immer ich Hilfe brauchte. Allen voran meinen Eltern, aber auch meinen Schwiegereltern und insbesondere meiner Oma Bärbel, die mir in der Endphase der Fertigstellung dieser Arbeit den Rücken freigehalten hat. Ohne euch hätte ich weder mein Studium noch meine Promotion abgeschlossen! Ich danke außerdem allen, die diese Arbeit korrigiert und mit hilfreichen Anmerkungen verbessert haben.

Zuletzt gilt mein Dank meinem Mann. Danke, dass du nun schon seit über 13 Jahren an meiner Seite bist. Ich bin dankbar, dass du mich immer wieder motiviert hast, diese Arbeit auch wirklich zu beenden und mir zu jeder Zeit mit Rat, Tat und klugen Nachfragen bei der Fertigstellung zur Seite standest.

8.2 Verzeichnis der Akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg

Ahrens, Holger	Dr.
Albers, Max	Dr.
Bartsch, Detlef	Prof. Dr.
Bauer, Christian	PD Dr.
Becker, Anette	Prof. Dr.
Bender, Armin	Dr.
Bertoune, Mirjam	Dr.
Best, Christoph	PD Dr.
Bien, Siegfried	Prof. Dr.
Brehm, Alexander	Prof. Dr.
Daut, Jürgen	Prof. Dr.
Decher, Niels	Prof. Dr.
Depboylu, Candan	Prof. Dr.
Dodel, Richard	Prof. Dr.
Donner-Banzhof, Norbert	Prof. Dr.
Elsässer, Hans-Peter	Prof. Dr.
Feuser, Beate	Dr.
Frink, Michael	Prof. Dr.
Fritz, Barbara	PD Dr.
Geks, Josef	Dr.
Grgic, Ivica	Prof. Dr.
Günther, Frank	Prof. Dr.
Haas, Christian	PD Dr.
Halaszovich, Christian	Dr.
Hoffmann, Jörg	Dr.
Holzer, Katharina	Prof. Dr.
Homm, Ulrike	Dr.
Hoyer, Joachim	Prof. Dr.
Jansen, Malin	Dr.
Jerrentrup, Andreas	PD Dr.
Kalder, Matthias	Prof. Dr.
Kann, Peter Herbert	Prof. Dr. Dr.
Kinscherf, Ralf	Prof. Dr.
Kircher, Tilo	Prof. Dr.
Kirschbaum, Andreas	Prof. Dr.
Knake, Susanne	Prof. Dr.
Köhler, Siegmund	Dr.
Kömhoff, Martin	Prof. Dr.
König, Arne	Prof. Dr.
Kühnert, Maritta	Prof. Dr.
Lill, Roland	Prof. Dr.
Lohoff, Michael	Prof. Dr.
Lüsebrink, Ulrich	Dr.
Luster, Markus	Prof. Dr.
Maier, Rolf Felix	Prof. Dr.
Maisner, Andrea	Prof. Dr.

Milani, Wiebke	Dr.
Moll, Roland	Prof. Dr.
Mueller, Ulrich	Prof. Dr. Dr.
Mühlenhoff, Ulrich	Prof. Dr.
Nenadic, Igor	Prof. Dr.
Neubauer, Andreas	Prof. Dr.
Neumüller, Bernhard	Prof. Dr.
Nimsky, Christopher	Prof. Dr.
Oberkircher, Ludwig	PD Dr.
Oberwinkler, Johannes	Prof. Dr.
Oliver, Dominik	Prof. Dr.
Pagenstecher, Axel	Prof. Dr.
Pavlovic, Melina	Dr.
Peterlein, Christian-Dominik	PD Dr.
Plant, Timothy David	Prof. Dr.
Preisig-Müller, Regina	PD Dr.
Printz, Hartmut	PD Dr.
Renz, Harald	Prof. Dr.
Rinné, Susanne	PD Dr.
Rost, Birgit	Dr.
Ruchholtz, Steffen	Univ.-Prof. Dr.
Schäfer, Jürgen	Prof. Dr.
Schäfer, Martin	Dr.
Schieffer, Bernhard	Prof. Dr.
Schu, Ulrich	Dr.
Schütz, Harald	Prof. Dr.
Seitz, Guido	Prof. Dr.
Sekundo, Walter	Prof. Dr.
Sevinc, Selim	Dr.
Sommer, Frank	PD Dr.
Steinhoff, Ulrich	Prof. Dr.
Thieme, Kati	Prof. Dr.
Timmermann, Lars	Prof. Dr.
Vogelmeier, Claus Franz	Prof. Dr.
Vogt, Sebastian	Prof. Dr.
Wagner, Uwe	Prof. Dr.
Weber, Stefanie	Prof. Dr.
Weihe, Eberhard	Prof. Dr.
Werner, Jochen A.	Prof. Dr.
Westermann, Reiner	PD Dr.
Wrocklage, Christian	Dr.
Wulf, Hinnerk	Prof. Dr.