

Aus der Klinik für Neurologie  
Direktor Univ.-Prof. Dr. med. L. Timmermann

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

in Zusammenarbeit mit dem  
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

**Biochemische Bestimmung und Charakterisierung  
des Bindungsverhaltens eines physiologisch vorkommenden  
Autoantikörpers gegen humanes  $\alpha$ -Synuclein**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der gesamten Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

**Florian Seitz  
aus Nördlingen**

Marburg 2023

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Univ.-Prof. Dr. rer.nat. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Richard Dodel

1. Korreferent: Prof. Dr. Stefan Bauer

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
10. März 2023

**INHALTSVERZEICHNIS**

	<i>Seite</i>
Inhaltsverzeichnis .....	III
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Das Parkinson Syndrom .....	1
1.2 Die Pathophysiologie der Lewy-Körperchen und die Stadieneinteilung nach Braak .....	4
1.3 Das humane Protein alpha-Synuclein ( $\alpha$ S) .....	8
1.4 Das Vorkommen natürlicher Autoantikörper (nAbs) beim Menschen .....	10
1.5 Ein Überblick über immunologisch basierte Therapieansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen .....	12
1.6 Die Ziele dieser Arbeit .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Verwendete Geräte und Anlagen .....	16
2.2 Verwendete Chemikalien und Materialien .....	17
2.3 Verwendete gebrauchsfertige Reaktionslösungen (Kits) .....	19
2.4 Verwendete Antikörper und Proteine .....	19
2.5 Übersicht über häufig verwendete Puffer .....	20
2.6 Zellkultur .....	21
2.6.1 Zellkulturmedien und Zelllinien .....	21
2.6.2 Materialien für die Zellkultur .....	21
2.6.3 Kultivierung von Zellen .....	22
2.6.3.1 Handhabung der Zellen .....	22
2.6.3.2 Passagieren von Zellen .....	22
2.6.3.3 Einfrieren von Zellen .....	22
2.6.3.4 Auftauen von Zellen .....	22
2.6.3.5 Aufbringen der Zellen auf Deckgläser .....	23
2.7 Antikörperisolation mittels Affinitätschromatographie .....	23
2.8 Proteinanalyse .....	24
2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	24
2.8.1.1 Spektrophotometer Nanodrop .....	24
2.8.1.2 Die BCA-Methode .....	24
2.8.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ....	25
2.8.3 Proteindetektion im Gel durch Silberfärbung .....	26

2.8.4 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen – Immundetektion immobilisierter Proteine – Immunoblot .....	27
2.8.4.1 Memcode .....	27
2.8.4.2 Immundetektion durch Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern .....	28
2.8.5 Oligomerpräparation und -analyse .....	29
2.8.5.1 Präparation von $\alpha$ S-Oligomeren/ $\alpha$ S-Fibrillen .....	29
2.8.5.2 Präparation von A $\beta$ -Oligomeren und die Darstellung im Immunoblot .....	30
2.9 Mikroskopie .....	30
2.9.1 Verwendete Gewebeprobe(n) .....	30
2.9.1.1 Histologische Gefrierschnitte und Färbung .....	31
2.9.1.2 Probenvorbereitung .....	31
2.9.2 Immunhistochemie (IHC) .....	31
2.9.3 Immunfluoreszenz (IF) .....	34
2.9.4 Kernfärbung nach Hoechst .....	34
2.9.5 Thioflavinfärbung .....	34
<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>36</b>
3.1 Mikroskopische Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz .....	38
3.1.1 Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S an der SH-SY5Y-Zelllinie .....	38
3.1.2 Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S am transgenen $\alpha$ S Tiermodell (Thy1)-h[A30P] .....	40
3.1.3 Histologische Untersuchungen mittels Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S an humanen Hirngewebe(n) .....	42
3.2 Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot .....	46
3.2.1 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S gegen humanes $\alpha$ S, $\beta$ S und $\gamma$ S .....	46
3.2.2 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mit Varianten von $\alpha$ S .....	48
3.2.3 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S gegen $\alpha$ S und die verkürzten Peptidabschnitte des $\alpha$ S .....	50

3.3 Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot gegenüber $\alpha$ S-Oligomeren und $\alpha$ S-Fibrillen .....	53
3.3.1 Der Nachweis der höheren $\alpha$ S-Aggregationsformen in der Silber-Gel-Färbung .....	53
3.3.2 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S gegen die $\alpha$ S-Oligomerformen und $\alpha$ S-Fibrillen .....	53
3.3.3 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot zur Differenzierung der nAbs- $\alpha$ S und der nAbs-A $\beta$ .....	56
<b>4. Diskussion</b> .....	60
4.1 Die histopathologischen Untersuchungen .....	60
4.2 Die Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion der nAbs im Immunoblot .....	66
4.3 Die Untersuchungen aggregierter $\alpha$ S-Spezies im Immunoblot .....	71
4.4 Die Oligomerisierungshypothese des $\alpha$ S .....	72
4.5 Immuntherapeutische Ansätze bei Synucleinopathien .....	76
<b>5. Zusammenfassung</b> .....	82
<b>6. Abstract</b> .....	84
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	86
<b>8. Anhang</b>	
8.1 Tabellenverzeichnis .....	108
8.2 Abbildungsverzeichnis .....	109
8.3 Abkürzungsverzeichnis .....	110
8.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer .....	114
8.5 Danksagung .....	115



## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Das Parkinson Syndrom

Mit höherem Lebensalter nimmt die Inzidenz neurodegenerativer Krankheiten zu. Zahlen aus den vergangenen Jahren zeigen, dass das Parkinson Syndrom (PS) unter den neurodegenerativen Erkrankungen in seiner Häufigkeit nur durch die Demenz vom Alzheimer Typ (AD) übertroffen wird. Die Prävalenz des idiopathischen Parkinsonsyndroms (IPS) reicht von 0,3% in der Allgemeinbevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika bis zu einem Anteil > 5% bei Personen über dem 80. Lebensjahr. Im Zuge des demographischen Wandels stellen diese häufiger werdenden Krankheiten eine große gesellschaftliche Herausforderung dar [von Campenhausen et al. 2005; Weintraub et al. 2008].

Das PS ist mit einer Prävalenz von 100–250/100.000 Personen und einer jährlichen Inzidenz von 10–20/100.000 Personen/Jahr die am häufigsten vorkommende Bewegungsstörung. Im Lebensalter von > 60 Jahren sind 1–2% der europäischen Allgemeinbevölkerung vom PS betroffen. Neben dem IPS finden sich in 5% aller Fälle familiäre Häufungen [von Campenhausen et al. 2005].

Die klinische Diagnose eines PS verlangt zwingend das Vorliegen des Hauptsymptoms Akinese plus mindestens eines weiteren Symptoms aus Ruhetremor (4–6 Hz), Rigor oder posturaler Instabilität (Haltungsinstabilität) [DGN Leitlinien online 2016].

Die Klassifikation der unterschiedlichen PS kann neben selteneren familiären Varianten, vor allem in das idiopathische PS, in atypische PS (u.a. progressive supranukleäre Blickparese [PSP] sowie Multisystematrophie [MSA]) und sekundäre PS vorgenommen werden. Dem klinischen Erscheinungsbild entsprechend kann beim IPS nach dem führenden klinischen Symptom eine Einteilung in einen hypokinetisch-rigiden Typ (Akinese >> Tremor), einen Äquivalenztyp (Akinese = Tremor) oder einen Tremordominanztyp (Tremor >> Akinese) erfolgen. Zur Schweregradeinteilung haben sich die Klassifikationen nach Hoehn und Yahr [Hoehn et al. 1967] (berücksichtigt nur die motorische Funktion) sowie nach der United Parkinson's Diseases Rating Scale (UPDRS) [Fahn et al. 1987] mit seinen 4 Dimensionen etabliert [Ramaker et al. 2002]. Die zuletzt genannte Skala wurde in den vergangenen Jahren unter Förderung der Movement Disorder Society (MDS) revidiert und stellt die neueste Version mit der Bezeichnung MDS-UPDRS dar [Goetz et al. 2008]. Letztendlich zeigt sich bei allen Typen ein progredienter Verlauf mit einer mittleren Erkrankungsdauer

von 13–20 Jahren, wobei dem Tremordominanztyp eine bessere Prognose zugesprochen wird.

Wegweisende Forschungsarbeiten des vergangenen Jahrhunderts ermöglichen zunehmend ein besseres pathophysiologisches Verständnis der neurodegenerativen Erkrankungen. Wie andere neurodegenerative Erkrankungen ist das IPS durch einen zunehmenden Nervenzelluntergang gekennzeichnet. Pathophysiologisch findet sich hier ein Rückgang vor allem dopaminergischer Nervenzellen in der Substantia nigra (SN) pars compacta [Pakkenberg et al. 1991]. Klinisch werden die Symptome der Bewegungsstörung bei einem Verlust dopaminergischer Neurone der SN von mehr als 50% und konsekutivem Dopaminmangel im Striatum > 70–80% manifest [Marsden 1990].

Eine weitere Erkenntnis der intensiven Grundlagenforschung ist die zentrale Beteiligung bestimmter Proteine bei neurologischen Erkrankungen. Auf das IPS bezogen, hat das Protein alpha-Synuclein ( $\alpha$ S) in diesem Zusammenhang eine spezielle Rolle. Dies basiert auf folgenden Fakten:

1. Das familiäre Auftreten des PS ist mit genetischen Variationen im  $\alpha$ S-Gen assoziiert.
2.  $\alpha$ S ist der Hauptbestandteil der für das PS charakteristischen Lewy-Körperchen (LB) bzw. Lewy-Neuriten (LN).
3. Der Untergang charakteristischer Nervenzellen geht mit der LB-Formation einher.

Der Grundstein für das Wissen über die neurodegenerativen Erkrankungen wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelegt. Im Jahre 1907 bezeichnete der Psychiater *Alois Alzheimer* erstmals die histologisch auffälligen Hirnläsionen bei der später nach ihm benannten Demenz vom Alzheimerstyp als Neuroplaques und Neurofibrillen [Alzheimer 1907]. In der gleichen Epoche beschrieb sein Mitarbeiter *Friederich Heinrich Lewy* 1912 die für das IPS charakteristischen Lewy-Körperchen (LB = engl. *lewy bodies*) und Lewy-Neuriten [Lewy 1912]. Die Verbindung zwischen den neuropathologisch ermittelten charakteristischen Ablagerungen und dem zugrunde liegenden Prozess der Neurodegeneration rückte in den vergangenen Jahrzehnten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Einerseits ergaben biochemische Analysen der Läsionen Einblicke in die Zusammensetzung der intra- und extrazellulären Proteinablagerungen, andererseits konnten genetische Veränderungen bei familiär gehäuft auftretenden neurodegenerativen Erkrankungen aufgedeckt werden [Skovronsky et al. 2006].

Bereits 1817 skizzierte *James Parkinson* mit seiner Arbeit „*An essay on the shaking palsy*“ über seine Beobachtungen an sechs Patienten das



klinische Syndrom [Parkinson 1817] und wurde auf Vorschlag von *Jean Martin Charcot* zum Namensgeber der Erkrankung [Kempster et al. 2007]. Nach *Lewy's* Vorarbeiten beschrieben *Constantin Tretiakoff* [Tretiakoff 1919] und *Rolf Hassler* [Hassler 1938] das Auftreten zahlreicher LB in der SN beim IPS und postulierten einen Zusammenhang zwischen Nervenzelluntergang und den motorischen Störungen. Darauf aufbauend konnte Mitte des 20. Jahrhunderts der Dopaminnachweis im Gehirn von Säugetieren [Carlsson et al. 1958] insbesondere im Bereich des Striatums erbracht werden [Bertler et al. 1959]. *Carlsson* zeigte, dass L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) die Blut-Hirn-Schranke überwinden und als Vorläufer von Dopamin seine Wirkung auf die motorische Funktion entfalten kann [Carlsson et al. 1957]. Er postulierte, dass erniedrigte Dopaminspiegel im extrapyramidalen System für die Symptomatik beim PS verantwortlich sind [Carlsson 1959]. Die Arbeit von *Ehringer* und *Hornykiewicz* belegte das Auftreten erniedrigter Dopaminlevel im Striatum beim PS [Ehringer et al. 1960]. Der Beginn der symptomatischen Therapie beim PS mit L-DOPA folgte [Birkmayer et al. 1961]. Bis heute stellt der Ausgleich des Defizits im nigrostriatalen Dopaminstoffwechsel den Hauptpfeiler der symptomatischen Therapie beim PS dar. Mittels Elektronenmikroskopie zeigten *Duffy* und Kollegen die filamentöse Struktur der LB [Duffy et al. 1965], ehe 1990 eine familiäre Verlaufsform des PS entdeckt wurde. In der *Contursi* Familie italienischen Ursprungs konnte ein PS mit autosomal-dominantem Erbgang und einer frühen Krankheitsmanifestation (mittleres Erkrankungsalter 45,6 Jahre) beschrieben werden. In Autopsien wurde das Vorliegen der LB-Pathologie bestätigt [Golbe et al. 1990]. Genetische Analysen von *Polymeropoulos* und Kollegen identifizierten einen Abschnitt auf Chromosom 4 für das PS in der Familie *Contursi* [Polymeropoulos et al. 1996] – der erste Nachweis einer genetischen Ursache für das Auftreten des PS. 1997 war es der gleichen Arbeitsgruppe gelungen, eine Punktmutation an Position 209 im  $\alpha$ S-Gen (SNCA) hierfür zu bestimmen [Polymeropoulos et al. 1997]. Weitere Nachweise für diese Alanin-53-Threonin-Punktmutation (A53T) des Proteins  $\alpha$ S in anderen Familien folgten [Athanasiadou et al. 1999]. *Spillantini* und Kollegen zeigten die Verknüpfung zwischen genetischer Veränderung im  $\alpha$ S-Gen und der LB-Pathologie. Es konnte dargestellt werden, dass das Protein  $\alpha$ S den filamentösen Hauptbestandteil der proteinreichen LB darstellt. LB und LN sind demnach direkt mit  $\alpha$ S assoziiert [Spillantini et al. 1997; Spillantini et al. 1998].

Das Protein  $\alpha$ S ist ein aus 140 Aminosäuren (AS) bestehendes Peptid, das somit besondere Relevanz für das Verständnis des PS und verwandter Krankheitsbilder besitzt [Tofaris et al. 2007].

$\alpha$ S-Ablagerungen treten neben dem IPS bei zahlreichen anderen neurodegenerativen Krankheitsbildern auf. Dazu zählen die Demenz mit Lewy-Körpern (DLK) [Spillantini et al. 1998] sowie die Multisystematrophie (MSA), wobei die zellulären Proteinablagerungen hier die gliale Zellreihe betreffen [Tu et al. 1998]. Aufgrund dieser charakteristischen Einschlusskörperchen aus  $\alpha$ S werden IPS, DLK und MSA zusammen als Synucleinopathien bezeichnet [Goedert et al. 1998].  $\alpha$ S positive Ablagerungen finden sich darüber hinaus u.a. bei der Hallervorden-Spatz-Krankheit [Arawaka et al. 1998], in einzelnen Fällen der AD [Lippa et al. 1998] sowie des Parkinson-Demenzkomplexes von Guam [Yamazaki et al. 2000].

### **1.2 Die Pathophysiologie der Lewy-Körperchen und die Stadieneinteilung nach Braak**

Den neurodegenerativen Erkrankungen ist pathophysiologisch auf zellulärer Ebene die Proteinaggregation und die Bildung von Proteinablagerungen gemeinsam. Während Amyloid-beta ( $A\beta$ ) den Hauptbestandteil der senilen Plaques bei AD darstellt und u.a. bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) [Neumann et al. 2006] sowie bei der Chorea Huntington (HD) [Ross et al. 2011] der Nachweis intrazellulärer Ablagerungen erbracht werden konnte, ist  $\alpha$ S die Hauptkomponente der LB und LN beim IPS sowie DLK. LB und LN stellen das histologische Korrelat des IPS dar und sind für die pathologisch-anatomische Diagnose erforderlich [Hughes et al. 1992]. Die Bildung dieser intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen wird als Marker für den Nervenzelluntergang betrachtet, da die LB an den Prädilektionsstellen der beschriebenen Erkrankungen zu finden sind. Bis heute sind neben dem gemeinsamen Hauptbestandteil der LB-Fibrillen  $\alpha$ S mehr als 70 weitere Moleküle identifiziert worden. Diese intrazellulären Ablagerungen aus unterschiedlichsten Proteinen und Lipiden können traditionell mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dargestellt werden [Gai et al. 2000]. Heute ist die Anfärbung mit Antikörpern gegen spezifische Markerproteine etabliert; dabei haben gegen  $\alpha$ S gerichtete Antikörper [Spillantini et al. 1997] die anti-Ubiquitin-Antikörper [Lennox et al. 1989] als Marker abgelöst.

Zur näheren Klassifikation der LB werden über die Bausteine der Einschlusskörperchen hinaus nach Morphologie und Verteilung der klassische Hirnstamm-LB-Typ (Vorkommen in den Hirnstammkernen und im Diencephalon) sowie der kortikale Typ (Vorkommen im limbischen Kortex und der Amygdala) unterschieden [Kosaka 1978; Gibb et al. 1991]. Die 5–25 $\mu$ m im

Durchmesser großen LB stellen das charakteristische neuropathologische Korrelat des PS dar, wobei diese auch bei klinisch asymptomatischen Verstorbenen in circa 12% einer Autopsieserie zu finden waren [Forno et al. 1969; Saito et al. 2004]. Klassische LB sind lichtmikroskopisch in der HE-Färbung als intrazytoplasmatische, rundliche Ablagerungen mit dichtem, eosinophilem Kern und Randsaum beurteilbar. Bei näherer Betrachtung zeigen sich 7–20 nm große, radiär angeordnete Filamente mit einer positiven Immunhistochemie für  $\alpha$ S [Campbell et al. 2001]. Kortikale LB sind hingegen unregelmäßiger geformt und meist ohne deutlichen Kern oder Randsaum [Gomez-Tortosa et al. 2000]. Bei annähernd allen Patienten mit PS sind kortikale LB in spärlicher Zahl vorhanden und liegen in den pyramidalen Zellschichten des Temporal-, Frontal-, Parietalkortex sowie in der Inselregion, im entorhinalen Kortex und im Cingulum [Halliday et al. 2008]. Diese kortikale Verteilung der LB lässt sich auch bei IPS-Patienten ohne dementielles Syndrom nachweisen und geht somit nicht notwendigerweise mit dem Auftreten eines Demenz-Syndroms einher [Parkkinen et al. 2005].

Der Prozess der LB-Bildung erfolgt nach Wakabayashi und Kollegen in Stufen. Die Formation der beschriebenen klassischen LB lässt sich durch Anfärbung des  $\alpha$ S in mehrere Stadien unterteilen. Während das Zytoplasma normaler Nervenzellen in der  $\alpha$ S-Immunhistochemie nicht anfärbbar ist, wird folgende Entwicklung mit zunehmender Intensität der  $\alpha$ S-Anfärbung und damit Dichte von  $\alpha$ S bei der Bildung der LB beobachtet [Wakabayashi et al. 1998; Takahashi et al. 2001]:

1. Morphologisch normale Neurone mit schwacher, diffuser Anfärbung des Zytoplasmas gehen in
2. irregulär geformte, schwach pigmentierte Neurone mit zunehmender  $\alpha$ S-Intensität über.
3. Sog. *pale bodies* (engl. = *blasse Körperchen*) mit klarer Abgrenzung und schwach eosinophilem, glassigem Bereich ohne Randsaum (in der HE-Färbung), die in der Immunhistochemie schwach positiv für Ubiquitin, stark positiv für  $\alpha$ S sind, folgen.
4. Mit zunehmender Kompaktheit der  $\alpha$ S-Filamente resultiert der Vorgang in der Formation der LB, die für Ubiquitin und  $\alpha$ S stark positiv sind.

Bestätigung erfuhr dies durch elektronenmikroskopische Untersuchungen der  $\alpha$ S-Filamente in LB und LN [Arima et al. 1998].

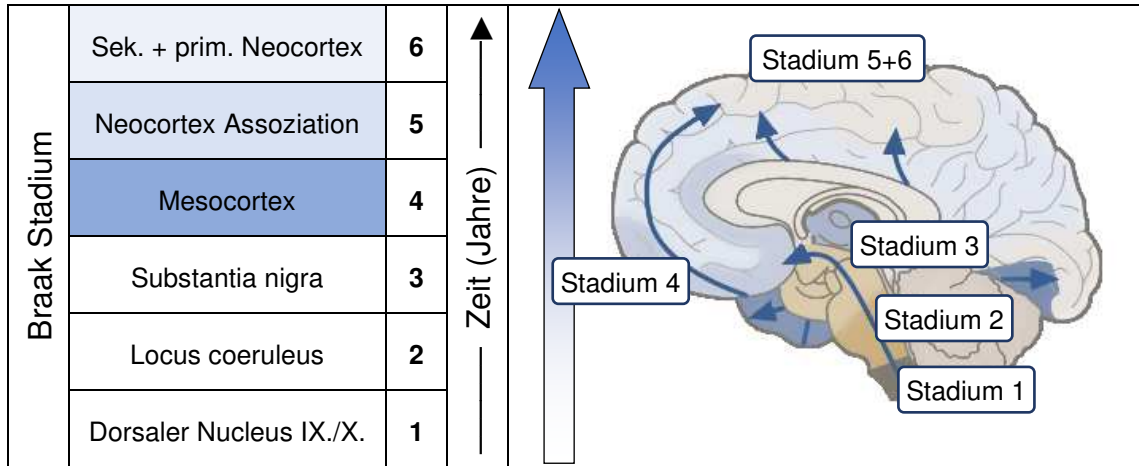
Das Verteilungsmuster der  $\alpha$ S-Pathologie in Form dieser LB wird mit dem klinischen Erscheinungsbild assoziiert.  $\alpha$ S-Läsionen im Hirnstamm werden für die extrapyramidal-motorischen Symptome, die Ablagerungen im Neokortex und

im limbischen System für die kognitiven Veränderungen verantwortlich gemacht. Verteilungsmuster und Läsionslast stellen demnach einen Erklärungsansatz für die unterschiedliche Symptomatik der LB-Erkrankungen dar, wobei auch bei klinisch asymptomatischen Personen in der Autopsie eine LB-Pathologie nachweisbar ist. Daher wird auch eine *inzidentelle LB-Erkrankung* postuliert, die möglicherweise das Vorstadium eines PS darstellt [Dickson et al. 2008; DelleDonne et al. 2008].

Von diesen Überlegungen berichteten bereits 2003 Braak und Kollegen, die in der Entwicklung der LB-Pathologie und der klinischen Ausprägung bei PS ein nachvollziehbares Muster belegen konnten. Die  $\alpha$ S-Formation beginnt demnach in bestimmten Regionen und folgt einer zeitlichen Abfolge mit zunehmender Schwere der Veränderungen, die sich klinisch im frühen Stadium durch eine Riechstörung, im Spätstadium in schweren kognitiven Störungen äußern. Dabei verglichen sie innerhalb einer Kohorte Autopsiedaten von PS-Patienten mit alters- und geschlechtsadaptierten Kontrollen ohne bekannte neurologische Erkrankung. Unterschiedliche Hirnregionen neben der SN wurden dabei hinsichtlich der Verteilung von  $\alpha$ S-Einschlusskörperchen untersucht. Die Schädigung besonders anfälliger dopaminergere Kerngebiete in der SN pars compacta mit nachfolgendem Funktionsverlust der neuromelaninhaltigen Projektionsneurone werden immer von einer ausgeprägten extranigralen Pathologie begleitet. Demnach sind bestimmte Nervenzellpopulationen besonders für den Zelluntergang empfänglich, ohne dass dies auf bestimmte Neurotransmittergruppen oder eine anatomische Region zu beschränken ist. Man findet auf der einen Seite das dopaminerge Defizit, das für die Erklärung der motorischen Symptome herangezogen wird, auf der anderen Seite eine Multi-System-Erkrankung des Gehirns, die unterschiedliche Transmittersysteme beeinträchtigt und das Gesamtbild des fortgeschrittenen PS widerspiegelt. Auf dem Verbreitungsmuster der  $\alpha$ S-Pathologie basiert die Einteilung der PS nach *Heiko Braak* in sechs kaudo-rostral aufsteigende, aufeinander folgende Stadien mit unterschiedlichem klinischem Korrelat.

Der Prozess der  $\alpha$ S-Einschlusskörperchen beginnt demnach in den olfaktorischen Nervenendigungen bzw. im autonomen Meissner-Plexus des gastrointestinalen Trakts, ehe eine Ausbreitung auf spezifische Regionen der Medulla oblongata und des anterioren olfaktorischen Kerngebiets folgt (Stadien 1 und 2). Vom unteren Hirnstamm schreitet der Krankheitsprozess fort und affektiert weiter rostral gelegene Strukturen wie die SN und andere Kerngebiete in Mittel- und Frontalhirn (Stadien 3 und 4). Mit Ausbreitung der LB-Pathologie auf diese Strukturen wird die asymptomatische Schwelle überschritten und die

Betroffenen zeigen motorische Symptome. In den Stadien 5 und 6 erreicht der neurodegenerative Prozess den Neokortex [Del Tredici et al. 2002; Braak et al. 2003; Del Tredici et al. 2016].



**Abb. 1:** Die Braak-Stadien beim IPS

Abbildung 1 zeigt die beim IPS in den Braak-Stadien klassifizierte kaudo-rostral aufsteigende Pathologie innerhalb des ZNS. Demnach breiten sich die neuropathologischen Veränderungen über die Jahre in 6 Stadien mit entsprechendem klinischem Korrelat aus. Mit Erreichen der Substantia nigra (Stadium 3) wird die symptomatische Phase mit motorischen Auffälligkeiten erreicht. Der blaue Pfeil in der Mitte der Abbildung stellt die Zunahme der klinischen Beschwerden über den Verlauf der Jahre – entsprechend der aufsteigenden Pathologie mit Erreichen neuer Stadien – dar.

Adaptiert nach: [Braak et al. 2003]

Diese zentralen Arbeiten von Braak führten zu weiteren Grundlagenarbeiten, die den Magen-Darm-Trakt als möglichen Ausgangspunkt des IPS betrachten. Da sich bei IPS-Patienten bereits Jahre vor den typischen motorischen Symptomen gastrointestinale Funktionsstörungen u.a. mit Obstipationsneigung belegen lassen, wurde postuliert, dass eine Ausbreitung der im Darm nachweisbaren Synucleinpathologie über den Nervus vagus ins Gehirn erfolgt [Braak et al. 2003]. Arbeiten von Kim und Kollegen zeigten 2019 im Tiermodell wie diese Ausbreitung ablaufen könnte. So konnte die Injektion von toxischem  $\alpha$ S in Dünndarm und Magenausgang von Mäusen im Verlauf eine  $\alpha$ S Pathologie im Hirnstamm verursachen [Kim et al. 2019]. Unterstützung findet diese Ausbreitungshypothese Darm – Nervus Vagus – Hirnstamm u.a. auch aus einer schwedischen Kohortenstudie, die den Zusammenhang von durchgeführter Vagotomie und Entwicklung eines IPS untersuchte. Die vollständige Vagotomie reduziert demnach das Risiko ein IPS zu entwickeln deutlich [Liu et al. 2017]. Dementsprechend fokussiert sich die Forschung nun auch

zunehmend auf die Rolle des Darmes in der Entstehung des IPS. Dabei werden neben Zusammenhängen zu entzündlichen Darmerkrankungen insbesondere die Darmflora mit ihren immunologischen Prozessen und deren Auswirkung auf das  $\alpha$ S untersucht [Campos-Acuña et al. 2019; Sampson et al. 2016].

### 1.3 Das humane Protein alpha-Synuclein ( $\alpha$ S)

Das 140 Aminosäuren umfassende, ca. 14 kDa große Protein alpha-Synuclein spielt in der Pathogenese des PS eine Schlüsselrolle, wie dies neuropathologische und genetische Studien der vergangenen Jahre gezeigt haben. Maroteaux und Kollegen war es vorbehalten, das Protein beim kalifornischen Zitterrochen *Torpedo californica* zu beschreiben und aufgrund seiner Lokalisation in prä-**Syn**aptischer Nervenendigung und Kernhülle des Neurons (lat. **nucleus** = Kern) als *Synuclein* zu bezeichnen [Maroteaux et al. 1988]. Der Brückenschlag zu den neurodegenerativen Erkrankungen gelang durch die Entdeckung eines aus 35 AS bestehenden Peptids in den Alzheimer Plaques, des sogenannten NAC-Peptides (engl. = **non-amyloid  $\beta$  component of Alzheimer diseases amyloid**), dessen Vorläuferprotein (NACP) in seiner DNA-Sequenz dem  $\alpha$ S entsprach und folglich so bezeichnet wurde [Ueda et al. 1993; Iwai et al. 1995]. Die ermittelte Proteinsequenz des  $\alpha$ S kann demnach in drei unterschiedliche funktionelle Regionen unterschieden werden: Die bekannten  $\alpha$ S Punktmutationen konnten im N-terminalen Bereich eingeordnet werden (AS 1–60) [Dehay et al. 2015]. Dem folgt der oben bereits beschriebene zentrale Teil mit der hydrophoben NAC-Domäne (AS 61–95). In diesem Abschnitt wurde ein 11 AS langes Segment (AS 68–78) als fibrillenbildende Kernstruktur identifiziert, die mit anderen Strukturen außerhalb der NAC-Domäne zur Synucleinaggregation führt [Rodriguez et al. 2015]. So wird die NAC-Formation für die  $\alpha$ S-Aggregation sowie die Ausbildung der  $\beta$ -Faltblattstruktur angesehen [Giasson et al. 2001]. Der dritte Bereich ist die C-terminale Region, die hauptsächlich aus den AS Prolin, Aspartat und Glutamat besteht. Dieser Abschnitt zeichnet sich durch seine Kalizumbindungs-fähigkeit sowie diverse Phosphorylierungsstellen aus [George 2002; Iwai et al. 1995].

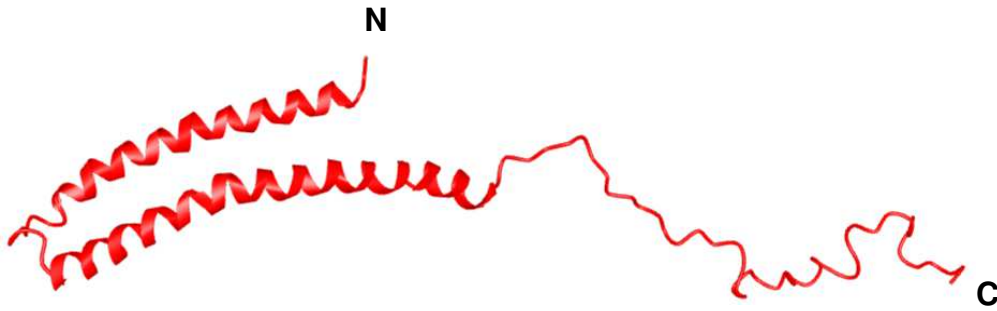


Abb. 2: *Humanes alpha-Synuclein*

Abbildung 2 zeigt die beispielhafte Darstellung der Struktur eines mizellengebunden, humanen  $\alpha$ S-Monomers mit seinen 140 AS. Der N-Terminus des  $\alpha$ S stellt über seinen amphiphatischen  $\alpha$ -helikalen Teil die Membranbindung her. Die zentrale NAC-Domäne geht in den flexiblen, ungeordneten C-Terminus über. Die Proteindarstellung erfolgte über das Werkzeug iCn3D (web-based 3D structure viewer) der Molecular Modeling Database (MMDB) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit Betrachtung von *1XQ8 Human micelle-bound alpha-synuclein*.

Adaptiert nach: [Ulmer et al. 2005; Madej et al. 2014]

Da im Verlauf nachgewiesen werden konnte, dass  $\alpha$ S den Hauptbestandteil der LB bzw. LN darstellt [Spillantini et al. 1997; Saito et al. 2003], konnte der genetische Hintergrund bei familiären PS mit Veränderungen der Synuclein-ausprägung einen weiteren Beitrag für die direkte Rolle des Proteins zeigen. Neben der Entdeckung der ersten drei Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen bei familiären PS mit autosomal-dominanter Ausprägung [(A53T) Polymeropoulos et al. 1997; (A30P) Krüger et al. 1998; (E46K) Zarranz et al. 2004] wurden Vervielfältigungen des  $\alpha$ S-Gens bei PS gefunden [Gen-Duplikation: Chartier-Harlin et al. 2004; Gen-Triplikation: Singleton et al. 2003]. Die neuropathologische Aufarbeitung und die Entwicklung transgener Tiermodelle erbrachten zudem Belege für die Rolle des  $\alpha$ S in der Pathologie der PS. In den folgenden Jahren konnten drei weitere Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen (H50Q, G51D, A53E) bei familiären PS belegt werden, so dass gegenwärtig sechs krankheitsrelevante Punktmutationen bekannt sind [Rutherford et al. 2014; Lesage et al. 2013; Pasanen et al. 2014; Dehay et al. 2015].

Das  $\alpha$ S kann als Monomer im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden [Fauvet et al. 2012], zeigt jedoch eine Tendenz zur Bildung von Oligomeren und höheren Formen bis hin zu Fibrillen [Conway et al. 1998]. Die  $\alpha$ S Oligomerisierung und die Oligomermorphologie ähneln in ihrem zeitlichen Verlauf der in vitro beobachteten Oligomerisierung von A $\beta$ , so dass Parallelen diesbezüglich bestehen [Harper et al. 1997]. Neueste Erkenntnisse fokussieren sich auf die besondere Rolle der Oligomere in Bezug auf die Pathologie des PS [Winner et al. 2001]. Diese Beobachtung ist mit der AD vergleichbar, wobei die

Oligomere des A $\beta$  als die toxischen Formen angesehen werden [Townsend et al. 2006].

Die weitere genaue Funktion des  $\alpha$ S ist weitestgehend unbekannt.  $\alpha$ S ist mitunter für die Vesikelfreisetzung an der Synapse und deren Funktionsfähigkeit verantwortlich [Bendor et al. 2013]. Dass dieser Einfluss auf die Neurotransmitterregulation besteht, zeigen Daten, die die Regulationseigenschaften des  $\alpha$ S bei der Wiederaufnahme von Dopamin ins Striatum transgener Mäuse untersuchen, zeigten [Chadchankar et al. 2011]. Eine Assoziation des  $\alpha$ S mit dem *SNARE*-Komplex bei der Vesikelfreisetzung ist zudem belegt [Burré et al. 2010; Nemani et al. 2010; Bartels et al. 2011]. So binden die oben benannten  $\alpha$ S-Oligomere an die Lipidmembranen und führen zu einer Veränderung der Membranpermeabilität der Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien und Lysosomen. Diese Beeinflussung mündet im erhöhten Kalziumeinstrom mit zunehmender Zytotoxizität durch Kalzium induzierte Caspase 3 Aktivierung und Apoptose [Danzer et al. 2007; Gold et al. 2015]. Zudem kann sich  $\alpha$ S mit seinen toxischen Formen im ZNS von Neuron zu Neuron ausbreiten [Dehay et al. 2015]. Weiter wird eine schützende Funktion von Unterformen des  $\alpha$ S für die Zelle diskutiert [Chandra et al. 2005].

### **1.4 Das Vorkommen natürlicher Autoantikörper (nAbs) beim Menschen**

Das Immunsystem ist unter physiologischen Bedingungen in der Lage eine Vielzahl von Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene zu generieren, die eine besondere regulatorische Funktion besitzen. So sind bis zu zwei Drittel des gesamten menschlichen Antikörperpools als physiologisch vorkommend anzusehen [Shoenfeld et al. 2006]. Die natürlichen Autoantikörper (nAbs = engl. *naturally occurring autoantibodies*) im Speziellen sind als eine Untergruppe von Antikörpern zu verstehen, die im Gegensatz zu den durch klassische Immunisierung nach Präsentation eines exogenen Antigens gebildete hochspezifische Antikörper, bereits in der Frühphase des menschlichen Organismus existent sind [Burnet 1976; Shoenfeld et al. 2006]. Bereits beim Neugeborenen finden sich nAbs, die sich aus den Immunglobulin-Subklassen IgG, IgM und IgA zusammensetzen [Merbl et al. 2007; Lacroix-Desmazes et al. 1998]. Vor allem phylogenetisch hoch konservierte intra- und extrazelluläre Antigene, wie beispielsweise Aktin, Albumin und Keratin werden durch die nAbs detektiert [Avrameas 1991]. Diese zeichnen sich durch besondere Polyreaktivität aus [Lacroix-Desmazes et al. 1998]. Diese Polyreaktivität liegt am ehesten in der Flexibilität der Antigenbindungsdomäne begründet,



ohne eine Einschränkung des spezifischen Erkennens bei meist geringerer Affinität im Vergleich zu monoreaktiven Antikörpern zu zeigen [Notkins 2004].

Gegenwärtig bleibt die physiologische Bedeutung der nAbs unklar. In seiner extremsten Form ist in der Evolution die Gattung der Haie bezüglich der Entstehung der nAbs anzuführen. Diese besitzen kein klassisches Immunsystem mit adaptiver Anpassung, können jedoch auf ein breites Spektrum an polyreaktiven Antikörpern zurückgreifen, die ein einfaches, aber hoch effektives System zur Aufrechterhaltung der primären Abwehr darstellen [Marchalonis et al. 2006].

Überträgt man den gegenwärtigen Wissensstand über die nAbs, so scheinen diese vielfältig zum immunologischen Gleichgewicht beizutragen. Nach Lutz wird durch selbige mittels Opsonierung, Komplementaktivierung und Proteolyse am Abbau und Abraum alternder Zellen, veränderter Zell- und Plasmakomponenten beigetragen. So ist über Bindung oxidativer Spezies und Neutralisierung proinflammatorischer Zytokine eine anti-onkogene, immunmodulatorische bzw. anti-inflammatorische Einflussnahme vorstellbar [Lutz et al. 2009].

Der Nachweis der nAbs ist jedoch nicht unmittelbar mit einer Autoimmunerkrankung gleichzusetzen. Eine strikte Unterscheidung nach pathogen, natürlich und nichtpathogen hat zu erfolgen [George et al. 1996]. In der Mehrzahl besitzen nAbs eine Polyklonalität zur Detektion diverser unterschiedlicher Antigene [Elkon et al. 2008] und werden vom normalen Immunsystem durch eine Subpopulation von CD5<sup>+</sup> B-Zellen generiert. Dem aktuellen Kenntnisstand entsprechend entspringen die nAbs einer bestimmten B-Zell-Population. Der Ursprung dieser und eine genaue Charakterisierung deren Funktion ist derzeit nicht abschließend geklärt [Kasaian et al. 1993].

Generell gilt für den Bereich des Nervensystems, dass die Zahl anti-neuronaler Antikörper gegen Zielstrukturen des peripheren Nervensystems (PNS) die Zahl der gegen Epitope des zentralen Nervensystems (ZNS) übersteigt. Das Vorkommen von physiologischen und pathologischen Autoantikörpern, insbesondere gegen Antigene des ZNS, ist gesondert zu betrachten, da sowohl Lymphozyten als auch Antikörper aufgrund der Blut-Hirn-Schranke nur einen beschränkten Zugang zum ZNS besitzen [Gold et al. 2012].

Bisher war die Detektion von nAbs im ZNS in Zusammenhang mit neurologischen Krankheitsbildern üblicherweise mit Autoimmunerkrankungen assoziiert. Es ergeben sich mit der zunehmenden Anzahl der detektierten nAbs Hinweise auf einen möglichen Einfluss der Antikörper auf die Homöostase des Gehirns, insbesondere in Zusammenhang mit dem Abraum von Proteinablagerungen, wie dies beispielsweise bei der AD gezeigt werden konnte. Hierdurch wurden

neue Hypothesen zur Krankheitsentstehung und zur Entwicklung möglicher Therapieoptionen generiert.

Stellvertretend für nAbs bei neurodegenerativen Erkrankungen wurden zu Beginn der 2000er Jahre nAbs gegen das Peptid A $\beta$  (nAbs-A $\beta$ ) beim Menschen untersucht und zahlreiche Arbeiten versuchten diese nAbs-A $\beta$  weiter zu charakterisieren [Du et al. 2001; Weksler et al. 2002]. Bereits 1993 wurden Antikörper gegen A $\beta$  bei Alzheimerpatienten beschrieben, deren Rolle in der Pathophysiologie der AD nicht vollständig geklärt ist [Gaskin et al. 1993]. Istrin und Kollegen konnten jedoch aufzeigen, dass präformierte Fibrillen des A $\beta$  durch nAbs-A $\beta$  aufgelöst und intravenöse Immunglobuline (IVIG), die diese nAbs enthalten, zur Verbesserung der Zelltoleranz gegen A $\beta$  führten, so dass ein möglicher therapeutischer Ansatz postuliert wurde [Istrin et al. 2006]. Phase II Studien untersuchten diese Hypothese mit IVIG bei Patienten mit AD. 2 kleine Fallserien (5–8 Patienten, 6–15 Monate Beobachtungszeitraum) erbrachten unter Therapie mit IVIG bei AD eine Verbesserung der Kognition bei den behandelten Personen, so dass eine Phase III Studie folgte [Dodel et al. 2004; Relkin et al. 2009]. Hier zeigte sich unter einer Behandlung mit IVIG gegen Placebo bei AD Patienten (mildes bis moderates klinisches Bild) kein signifikanter kognitiver Unterschied im zeitlichen Verlauf [Loeffler 2013]. Eine zu niedrige Konzentration der beschriebenen nAbs-A $\beta$  in IVIG wurde diskutiert, so dass im Weiteren zum Erreichen ausreichender Wirkstärken monoklonale Antikörper in den Fokus einer gezielten Intervention gelangten [Dodel et al. 2004; Bach et al. 2017].

### **1.5 Ein Überblick über immunologisch basierte Therapieansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen**

Der Nachweis von Antikörpern gegen unterschiedliche neurale Proteine hält in den Neurowissenschaften in den vergangenen Jahren zunehmend Einzug und eröffnet neue therapeutische Möglichkeiten. In diesem Zusammenhang konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch Immuntherapie in der Zellkultur bzw. im Tiermodell eine Reduktion der membranassoziierten und intrazellulär lokalisierten Proteine *Prion-Protein (PrP)* [Pankiewicz et al. 2006], *Huntingtin* [Wolfgang et al. 2005] sowie *Tau* [Sigurdsson 2008] erreicht werden konnte.

Bei der Chorea Huntington (HD) konnte nach Isolation sogenannter *Intrabodies* (spezifische single chain Fv Antikörper [scFv]), die Bildung eines Proteins mit abnormer Polyglutaminaneinanderreihung verhindert und ein

funktioneller Schutz gegen die HD spezifische Toxizität erreicht werden. In vitro Untersuchungen in COS-7 Zellen (Fibroblasten-Zelllinie) konnten belegen, dass die Aggregation der verlängerten Polyglutaminsequenzen in der untersuchten Zelllinie durch die Koexpression mit *scFv-Antikörpern* gegen das Protein Huntingtin deutlich reduziert werden konnte [Lecerf et al. 2001].

Bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS), bei der die Superoxid-Dismutase-1 (SOD1) im Mittelpunkt der Proteinaggregation und Neurotoxizität steht, konnten im Tiermodell mit transgenen SOD1-Mäusen mittels aktiven und passiven Immunisierungsansätzen gegen SOD1 positive Ergebnisse erzielt und die Toxizität der mutanten SOD1 reduziert werden [Gros-Louis et al. 2010].

Bei den spongiformen Enzephalopathien, die als Prionenerkrankungen bekannt sind, ist beim Menschen die Creutzfeld-Jacob Erkrankung (CJD) mit Akkumulation fehlgefalteter Prionproteine von Bedeutung. Im Tiermodell konnten White und Kollegen zeigen, dass eine intraperitoneale Applikation von monoklonalen *anti-PrP-Antikörpern* eine erfolgreiche präventive Strategie bei den Prionenerkrankungen darstellen könnte [White et al. 2003]. Einen aktuellen, zusammenfassenden Überblick hierzu geben Roettger und Kollegen [Roettger et al. 2013].

Im Bereich der auf extrazellulären Ablagerungen des A $\beta$  beruhenden neurodegenerativen Erkrankungen sind unterschiedliche Immunisierungsansätze entwickelt worden. Als Vorreiter gelten Schenk und Kollegen mit ihren Arbeiten zur Immunisierung gegen A $\beta$  [Schenk et al. 1999]. Basierend auf diesen Untersuchungen mit dem Nachweis, dass eine Immunisierung gegen A $\beta$  im Tiermodell einen Schutz und ein Zurückdrängen der AD-Pathologie ermöglicht, wurden Ansätze mit direkter Immunisierung mit synthetischen A $\beta$ -Fragmenten bzw. durch passive Immunisierung über monoklonale Antikörper (MAK) gegen A $\beta$  entwickelt [Delrieu et al. 2012]. Nach diversen Rückschlägen mit teilweise schweren Nebenwirkungen, u.a. dem Auftreten von Meningoenzephalitiden [Orgogozo et al. 2003] und der Diskrepanz zwischen der Fähigkeit die Amyloid-Plaques abzuräumen und der weiteren klinischen Progression der kognitiven Defizite [Holmes et al. 2008] kamen auch Fragen nach einer sicheren und effektiven Immuntherapie auf.

In Anlehnung an diese Arbeiten entstand u.a. in unserem Labor die Isolation natürlich vorkommender Autoantikörper gegen A $\beta$  (nAbs-A $\beta$ ) aus humanen Blutproben bzw. kommerziell erhältlichen Immunglobulinen (IVIG = intravenöse Immunglobuline). Bei Patienten mit AD waren diese reduziert nachweisbar [Du et al. 2001; Weksler et al. 2002; Britschgi et al. 2009].

Diese bei extrazellulären Proteinablagerungen in vitro und in vivo etablierten immuntherapeutischen Regime werden neuerdings auch bei intrazellulären

Proteinaggregationen (wie beispielsweise  $\alpha$ S, Tau, PrP und Huntingtin [s. S. 10]) diskutiert, da Aggregate in den Plasmamembranen der Zellen vermehrt nachgewiesen werden können und eine Sekretion selbiger in den Extrazellulärraum ermöglichen. Dort könnte folglich eine immunvermittelte Detektion z.B. mit den von uns untersuchten nAbs- $\alpha$ S nach dem Konzept bei der AD erfolgen.

In Anlehnung an Dodel und Kollegen mit der Isolation natürlich vorkommender Autoantikörper gegen humanes A $\beta$  bei der AD entstanden auf dem Gebiet der Synucleinopathien neue Ansätze [Dodel et al. 2002]. Du und Kollegen konnten bei A $\beta$  zeigen, dass die gefundenen Antikörper in der Lage sind, die Toxizität und die Neigung zur Oligomerisierung des A $\beta$  zu blockieren [Du et al. 2003]. Dies scheint aus unserer Sicht auch bei  $\alpha$ S und den gefundenen nAbs- $\alpha$ S möglich.

### 1.6 Die Ziele dieser Arbeit

Natürlich vorkommende Autoantikörper (nAbs) stehen im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen gegenwärtig im Fokus der Wissenschaft. Insbesondere bei der AD (nAbs-A $\beta$ ) scheinen die Erkenntnisse in Zusammenhang mit nAbs der vergangenen Jahre von besonderem Interesse für Diagnostik und Therapie zu sein. Aufbauend auf den Ergebnissen von Du und Kollegen aus dem Jahr 2001 mit dem Nachweis verminderter nAbs-A $\beta$ -Konzentrationen bei Patienten mit AD folgte u.a. eine Pilotstudie von Dodel und Kollegen über den therapeutischen Einsatz von nAbs-A $\beta$  als Teil von IVIG bei AD [Du et al. 2001; Dodel et al. 2004]. Diesen Vorarbeiten schloss sich 2013 eine multizentrische klinische Studie über den Einsatz von IVIG bei AD an [Dodel et al. 2013].

Demgegenüber konnten im Jahr 2007 Autoantikörper gegen  $\alpha$ S beim Menschen nachgewiesen werden [Papachroni et al. 2007]. Im weiteren Verlauf war es gelungen, sowohl nAbs gegen A $\beta$  als auch  $\alpha$ S in kommerziell erhältlichen IVIG nachzuweisen [Dodel et al. 2002; Patrias et al. 2010].

Wir stellen die Hypothese auf, dass solche nAbs gegen humanes alpha-Synuclein ( $\alpha$ S) in Zusammenschau der bisherigen wissenschaftlichen Daten eine wichtige Rolle im Metabolismus von  $\alpha$ S spielen und damit auch Relevanz für die angesprochenen Krankheitsbilder haben können. Die biochemische Bestimmung und Charakterisierung des physiologisch vorkommenden anti-alpha-Synuclein-Autoantikörpers (nAbs- $\alpha$ S) ist Zielsetzung dieses Projektes.

Zu Beginn des Projekts steht die Frage, wie sich der physiologisch vorkommende Autoantikörper gegen humanes  $\alpha$ S, der aus humanen IVIG bzw. Einzelspenderseren isoliert wird, gegenüber unterschiedlichen Synucleinablagerungen in unterschiedlichen Geweben bzw. neuronalen Zellformen verhält und somit diagnostische Bedeutung erlangen kann. Eine Analyse der Antigen-Antikörper-Interaktion in der Immunhistochemie bei mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Materialien u.a. an der Zelllinie SH-SY5Y, an Gewebeproben aus einem transgenen Tiermodell für PS und entsprechenden humanen post-mortem Hirnschnitten der relevanten Krankheitsbilder IPS, AD und DLK wird durchgeführt. Darüber hinaus ist im Immunoblot von Interesse, welche einzelnen Abschnitte des Peptids  $\alpha$ S bzw. welche strukturverwandten Peptide für die Anlagerung des Antikörpers und ggf. deren Interaktion verantwortlich sind. Im weiteren Verlauf der Experimente werden gezielt relevante Epitope bzw. unterschiedliche Aggregationsformen des Peptids im Hinblick auf das Bindungsverhalten des oben genannten Autoantikörpers untersucht, um eine Abgrenzung zu den bereits bekannten nAbs-A $\beta$  zu ermöglichen bzw. Parallelen aufzuzeigen.

Möglicherweise können aus den gewonnenen Daten weitere Ausblicke auf die mögliche Anwendung der nAbs- $\alpha$ S in der Zellkultur, im Tiermodell bzw. beim Menschen im Rahmen eines diagnostischen oder gar therapeutischen Regimes abgeleitet und initiiert werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Verwendete Geräte und Anlagen

*Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte und Anlagen*

Gerät/Anlage	Name	Firma
Brutschrank	Modell CB210	Binder, Tuttlingen, Deutschland
ELISA-Reader I	Multiscan EX	Thermo Scientific, Rockford, USA
ELISA-Reader II	Infinite 200 series	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Entwicklermaschine	Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	ME 235S-OCE	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelelektrophoresesystem	Xcell SureLock Mini Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Geltransferkammer	XCell II Blot Module CE Mark	Invitrogen, Carlsbad, USA
Immunostaining workstation	Shandon Sequenza Slide Rack / Shandon Coverplate Technology	ThermoFisher Scientific-Shandon, Walldorf, Deutschland
Mikroskop (IF)	Nikon TE2000 inverted fluorescence microscope/ Nikon 10MP camera	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop (IHC)	Nikon Eclipse 80i microscope/Nikon digitalsight 2MP camera	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikroskop (Zellkultur)	Nikon eclipse TS100	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mikrotom	HM 355 S rotary microtome	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle	HMT 842 C 101, 800 W	Robert Bosch GmbH, Erlangen, Deutschland
Mikrozentrifuge	Galaxy 16 DH, max. 13000 rpm	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Reference 0,1–1,5; 1–20; 10–100; 100–1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Platwisher	Biotrack II	General Electric, Piscataway, USA
Power Supply	Electrophoresis Power Supply EPS 3500 XL	General Electric, Piscataway, USA
Reinstwasseranlage	Milli-Q-System mit 0,22µm Millipak Membranfilter	Millipore GmbH, Eschborn, Deutschland
Röntgenfilm	Clear Blue X-Ray Film	Thermo Scientific, Rockford, USA
Röntgenkassette	Cronex Cassete Quanta Detail 24 x 30 cm	Dupont, Bad Homburg, Deutschland
Scanner	GS800 Calibrated Densitometer	Bio-Rad, München, Deutschland
Schüttler I	Rocky 3D	Fröbel Labortechnik, Wasserburg, Deutschland
Schüttler II	Unimax 1010	Heidolph, Kelheim, Deutschland

## 2. Material und Methoden

Gerät/Anlage	Name	Firma
Sicherheitswerkbank	Hera Safe Laminar flow	Kendro Laboratory Products, Osterode, Deutschland
Spektrophotometer	NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex Super RK 31 H	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Vortex-Schüttler	Reagenzglasschüttler	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad	SUB Aqua Range 18	Grant, Cambridgeshire, UK
Zentrifuge (Rotor) I	#3332, max. 17000 rpm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge (Rotor) II	#3046, max. 7500 rpm	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

### 2.2 Verwendete Chemikalien und Materialien

*Tab. 2: Aufstellung über die verwendeten Materialien*

Produkt	Bezug
30% (v/v) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Lösung	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
70% Ameisensäure (formic acid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Brilliant Blau G250	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
BSA Standard	Thermo Scientific, Rockford, USA
CuCl <sub>2</sub> Kupfer[II]chlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DCCD Dicyclohexylcarbodiimide	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Glaeser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Merchweiler, Deutschland
Ethanol absolut	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glyceringel	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
HFIP	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hoechst 33285	Invitrogen, Carlsbad, USA
IgG Elution Buffer (Product No. 21004 or 21009) bzw. 0.1 molarem Glycin, pH 2–3	Thermo Scientific, Rockford, USA
Intravenöses Immunglobulin G (IVIG) Octagam	Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland
Isopropanol	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Merchweiler, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LDS	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

## 2. Material und Methoden

<b>Produkt</b>	<b>Bezug</b>
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mayer's Hämalaun Lösung	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
MES	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Merchweiler, Deutschland
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogen-phosphat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 1M	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Novex Blot Buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
NuPAGE Bis-Tris 4–12%, 1mm gels	Thermo Scientific, Rockford, USA
NuPAGE Sample Reducing Agent mit 500 mM Dithiothreitol (DTT) (10x)	Thermo Scientific, Rockford, USA
Parafilm M Verschlussfolie	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Protein G IgG Binding Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific, Rockford, USA
Roti Block	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
SDS, 10% in Lösung	Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS, ultrapure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
See Blue 2 Plus Protein Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Super Block Buffer in TBS	Thermo Scientific, Rockford, USA
SuperFrost Plus Objekträger	Menzel-Glaeser GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Thioflavin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TMB, löslich	Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris (hydroxy methyl) aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Vectorshield antifade mounting media (Glycerin, H-1000)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Whatman, Protran, 0,2 µm	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Ziegenserum (goat serum)	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA



### 2.3 Verwendete gebrauchsfertige Reaktionslösungen (Kits)

*Tab. 3: Aufstellung über die in der Arbeit verwendeten Kits*

Kit	Bezeichnung	Bezug
AminoLink Plus Immobilization Trial Kit	#20394	Thermo Scientific, Rockford, USA
DAB (3,3-Diaminobenzidin) Substrate Kit	SK-4100	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Memcode Reversible Protein Stain Kit	#24580	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	#23225	Thermo Scientific, Rockford, USA
Pierce Silver Stain-Kit	#24612	Thermo Scientific, Rockford, USA
Protein G UltraLink Resin	#53125	Thermo Scientific, Rockford, USA
Roti-Histokitt	6638.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Super Signal West Dura Extended Duration Substrate	#34076	Thermo Scientific, Rockford, USA
Vectastain Elite ABC-Kit	PK-6200	Biozol, Eching, Deutschland
Vectastain M.O.M.-Kit (M.O.M. = mouse on mouse)	BMK-2202	Biozol, Eching, Deutschland

### 2.4 Verwendete Antikörper und Proteine

*Tab. 4: Aufstellung über die in der Arbeit verwendeten Antikörper und Proteine*

Antikörper	Bezeichnung	Verdünnung	Bezug
FITC labeled anti human IgG antibody	F9512	s. 2.9.2	Sigma-Aldrich company, St. Louis, USA
FITC labeled anti mouse antibody		s. 2.9.2	DAKO A/S Glostrup, Dänemark
Goat anti-human / goat anti-mouse IgG (H+L) HRP (IB)	A18805 / 31430	1:100.000 in PBST	Thermo Scientific, Rockford, USA
Mouse anti human $\alpha$ -synuclein antibody (IB)	AHB0261 Klon Syn211 (Epitop AS 121–125, Isotyp IgG <sub>1</sub> )	1:1000 in Rotiblock	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mouse anti human $\alpha$ -synuclein antibody (IHC)	AT-5008 Klon Syn211 (Epitop AS 121–125, Isotyp IgG <sub>1</sub> )	1:100 in Vectastain	MBL International Woburn, USA
Polyklonal (anti-alpha-Synuclein)	nAbs- $\alpha$ S nach Isolation aus Octagam	1:2000 in Rotiblock (IB) 1:10 (IHC)	Octagam, Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland
Polyklonal (anti-Amyloid beta)	nAbs-A $\beta$ nach Isolation aus Octagam	1:2000 in Rotiblock (IB)	Octagam, Octapharma GmbH, Langenfeld, Deutschland

Protein	MW (ca.)	Bezeichnung	Bezug
α-Synuclein E46K human	14 kDa	# S4447	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
α-Synuclein A30P human	14 kDa	# S1196	
α-Synuclein A53T human	14 kDa	# S1071	
α-Synuclein human	14 kDa	# S7820	
β-Synuclein human	14 kDa	# S5571	
γ-Synuclein human	13 kDa	# S3071	rPeptide Bogart, USA
α-Synuclein human 1–60	6 kDa	# S1011-1	
α-Synuclein human 1–95	9 kDa	# S1012-1	
α-Synuclein human 61–140	8 kDa	# S1013-1	
α-Synuclein human 96–140	5 kDa	# S1014-1	PSL, Heidelberg, Deutschland
Amyloid β human 1–40	4 kDa		

## 2.5 Übersicht über häufig verwendete Puffer

Alle benutzten Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma, Merck, Serva, Roth und Riedel de Haen bezogen. Alle Puffer wurden mit deionisiertem Wasser aus der Reinstwasseranlage angesetzt.

### **1x PBS** (= phosphatgepufferte Salzlösung)

140 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,25

### **1x PBST** (= PBS + Tween)

1x PBS mit 0.05% Tween 20

### **NuPAGE LDS Probenpuffer 4x (nach Invitrogen, Carlsbad, USA)**

106 mM Tris HCl (pH 8,5); 141 mM Tris base; 2% LDS; 10% Glycerol  
0,51 mM EDTA; 0,22 mM SERVA Blue G250; 0,175 mM Phenolrot  
Lagerung bei 4°C für max. 6 Monate.

### **NuPAGE MES SDS Laufpuffer 20x (nach Invitrogen, Carlsbad, USA)**

50 mM MES; 50 mM Tris base (pH 7,3); 0,1% SDS; 1 mM EDTA  
Lagerung bei 4°C für max. 6 Monate.

### **NuPAGE Blotpuffer 20x (nach Invitrogen, Carlsbad, USA)**

25 mM Bicin; 25 mM Bis-Tris (pH 7,2); 1 mM EDTA  
Lagerung bei 4°C für max. 6 Monate.

## 2.6 Zellkultur

### 2.6.1 Zellkulturmedien und Zelllinien

*Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Zellen*

Verwendete Zellen	Bezug	Zellart	Medium
SH-SY5Y	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland	SH-SY5Y, humane Neuroblastomzelllinie	RPMI1640 10% (v/v) FCS 1% (v/v) PEN-STREP

Es wurden Zellen der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y verwendet. Es handelte sich hierbei um eine dreifach geklonte Subzelllinie der 1970 aus einer Knochenmetastase etablierten SK-N-SH Neuroblastomzelllinie (SK-N-SH → SH-SY → SH-SY5 → SH-SY5Y) [Biedler et al. 1973/1978]. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

### 2.6.2 Materialien für die Zellkultur

*Tab. 6: Verwendete Zellkulturmaterialien*

Medium	Bezug
RPMI 1640, BE 12-702F	Lonza, Basel, Schweiz
DMEM, BE 12-733F	Lonza, Basel, Schweiz
<b>Zusätze für Medien</b>	
FCS, DE 14-701F	Lonza, Basel, Schweiz
PEN-STREP, DE 17-602E	Lonza, Basel, Schweiz
<b>Stimulation und Handhabung</b>	
Trypsin EDTA, BE 17-161E	Lonza, Basel, Schweiz
DPBS w/o Ca und Mg, BE 17-512F	Lonza, Basel, Schweiz
DPBS mit Ca und Mg, BE 17-513F	Lonza, Basel, Schweiz
<b>Zellkulturmaterial</b>	
200 ml Zellkulturflasche	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
6- und 12-well Platte	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
50 ml Reagenz- und Zentrifugieröhre	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
15 ml Reagenz- und Zentrifugieröhre	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
96-well Platte für ELISA	Iwaki, Osaka, Japan
Kryoröhrchen (Cryovials)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipetten 5 / 10 / 25 ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Pipettierhelfer Pipetuous Accu Jet	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

### 2.6.3 Kultivierung von Zellen

#### 2.6.3.1 Handhabung der Zellen

Die Zellen wurden täglich sowie nach jedem Medienwechsel mikro- sowie makroskopisch zur Beurteilung des Zellwachstums sowie der Zellqualität begutachtet. Alle Arbeiten erfolgten unter sterilen Werkbankbedingungen. Diese wurde mindestens 15 min vor Arbeitsbeginn in Betrieb genommen, um eine keimfreie Atmosphäre zu gewährleisten. Alle für die Medienwechsel und Zellkulturexperimente eingesetzten Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, zuvor auf 37°C temperiert. Zudem wurden die eingesetzten Puffer und Lösungen durch Autoklavieren bzw. Sterilfiltration von Keimen befreit.

#### 2.6.3.2 Passagieren von Zellen

Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und 5–10 ml DPBS auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend 3–4 min mit 1,0 ml Trypsin inkubiert. Sobald sich die Zellen lösten, wurden 10 ml Medium hinzugegeben, dies in ein 15 ml Reagenzröhrchen überführt und anschließend bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml neuem Medium resuspendiert und dann 1:20 verdünnt ausgesät.

#### 2.6.3.3 Einfrieren von Zellen

Vor dem Sammeln der Zellen wurde zunächst das Einfriermedium (10% FCS + RPMI 1640) auf Eis bereitgestellt. Nun wurde in Analogie zu 2.6.3.2 vorgegangen, nach Zentrifugation der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Kryoröhrchen überführt und in einer speziellen Einfriereinrichtung, die mit Isopropanol gefüllt war, innerhalb von 72 h langsam auf –80°C heruntergekühlt.

#### 2.6.3.4 Auftauen von Zellen

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese in der Regel aus sog. Zellstocks aufgetaut. Zum Auftauen von Zellen wurde 10 ml Medium in eine Zellkulturflasche gegeben und das Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Das Kryoröhrchen mit den Zellen wurde so lange in das Wasserbad getaucht, bis der Inhalt leicht angetaut war. Ein innerer Eiskern war noch erhalten. Nun wurde der Inhalt des Röhrchens in ein Reagenzröhrchen mit dem vorbereiteten Medium überführt, vollständig aufgetaut und die Zellen anschließend bei 1200 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml

frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden im Anschluss in Kulturflaschen 1:20 verdünnt ausgesät.

### 2.6.3.5 Aufbringen der Zellen auf Deckgläser

Die Immunfluoreszenzdarstellung erfolgte an der humanen Neuroblastomzelllinie, den sog. SH-SY5Y-Zellen, die entsprechend der oben aufgeführten Maßnahmen kultiviert und behandelt wurden. Deckgläser, die mit Poly-D-Lysine (PDL) vorbeschichtet waren, wurden in je einem well einer 12-well-Platte verteilt. Anschließend wurden die Zellen einzeln je well 1:20 verdünnt ausgesät. Unter den oben beschriebenen Brutschrankbedingungen erfolgte die Inkubation für mindestens 24 h, um eine Adhäsion und entsprechende Vervielfältigung der Zellen bis zur mikroskopisch beurteilten nötigen Zelldichte zu erreichen.

## **2.7 Antikörperisolation mittels Affinitätschromatographie**

Die Isolation und Aufreinigung der natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen humanes  $\alpha$ S (nAbs- $\alpha$ S) erfolgte mittels Säulen-Affinitätschromatographie sowohl aus Einzelspenderseren als auch aus kommerziell erhältlichen humanen i.v.-Immunglobulin-Präparaten (IVIG). Die Einzelspender-Serumproben von gesunden Personen wurden zuvor ebenfalls mittels Säulen-Affinitätschromatographie durch Protein-G-Kopplung bezüglich ihres IgG-Anteils aufgereinigt.

Grundlage der Chromatographie stellte das AminoLink Plus Immobilization Kit dar, das nach Herstellerangaben mit rekombinatem humanen  $\alpha$ S gekoppelt wurde. Nach Anpassung des Herstellerprotokolls erfolgte die Elution der zuvor gebundenen Proteinanteile durch pH-Wechsel, deren fraktionierte Gewinnung und anschließende Konzentrationsbestimmung mittels BCA- bzw. Nanodrop-Methode dokumentiert wurde. Eine Positiv- und Negativkontrolle erfolgte mit monoklonalem  $\alpha$ S-Antikörper (MAK- $\alpha$ S) bzw. Durchfluss-/Pufferanalysen. Weitere Nachweismethoden (Immunoblot, Immunpräzipitation, ELISA) erfolgten und werden hier nicht gesondert dargestellt. Weiter verweisen wir für nähere Details in Analogie zu den Untersuchungen bei A $\beta$  auf die Arbeiten von Dodel und Besong-Agbo [Dodel et al. 2011; Besong-Agbo et al. 2013].

## 2.8 Proteinanalyse

### 2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Je nach verwendetem Puffer wurde in dieser Arbeit die Proteinkonzentration in der Probe entweder über einen photometrischen Assay mit Bestimmung der Absorption bei 280 nm (Nanodrop) oder über die BCA-Methode gemessen.

#### 2.8.1.1 Spektrophotometer Nanodrop [Stoscheck 1990]

Die Messung der Proteinkonzentration mit Hilfe eines Spektrophotometers beruhte auf der Absorption von UV-Licht durch Proteine. Das Absorptionsmaximum lag dabei bei 280 nm. In dieser Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen bei der Verwendung der aufgereinigten Antikörper mit der Nanodrop-Technik bestimmt. Zum Teil musste auf die BCA-Methode ausgewichen werden, da die Puffer Inhaltsstoffe enthielten, die die Messung stören konnten (z.B. SDS).

#### 2.8.1.2 Die BCA-Methode

Bei dieser Proteinbestimmung [Smith et al. 1985] stand die reduzierende Wirkung von Proteinen auf zweiwertiges Kupfer im Mittelpunkt, welches unter alkalischen Bedingungen proportional zu der Proteinkonzentration zu einwertigem Kupfer reduziert wurde. Es entstand ein violett erscheinender Chelatkomplex aus zwei BCA-Molekülen mit einem Kupfer-Ion. Die Messung der Extinktion im Spektrophotometer ermöglichte die Bestimmung der Eiweisskonzentration über eine zuvor ermittelte Eichkurve. Der Vorteil dieser Methode lag in der Unbeeinflussbarkeit der Reaktion durch andere Reagenzien wie Glukose oder DTT.

Benötigte Reagenzien (enthalten im Pierce BCA Protein Assay Kit) waren:

- Bovines Serumalbumin (BSA), 2 mg/ml
- Reagenz A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninic Acid [BCA] und Natriumtartrat in 0,1 molarem Natriumhydroxid)
- Reagenz B (enthält 4% Kupfersulfat)

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe (25 bis 2000 µg/ml) aus BSA und dem jeweiligen Lysepuffer erstellt. Diese wurde zusammen mit den Proben (jeweils 25 µl) in eine 96 well Platte pipettiert. Anschließend erfolgte pro well die Zugabe von Reagenz A mit Reagenz B (gesamt 200 µl, Verhältnis von 50:1). Die Platte wurde mit einem Klebestreifen verschlossen und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Absorption wurde bei 562 nm in einem Spektrophotometer bestimmt und die Proteinkonzentration der Proben anhand der Eichkurve berechnet.

### 2.8.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE handelte es sich um eine Gelelektrophorese-Methode, bei der Proteine entsprechend ihrer physikalischen Eigenschaften durch eine angelegte elektrische Spannung in einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt werden (PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese). Dabei war die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel von der Nettoladung, der Masse und der Konformation des Proteins abhängig. Beim Lauf der Proteine im elektrischen Feld ist die Beschaffenheit der Gelmatrix von entscheidender Bedeutung. Diese wird von der Acrylamidkonzentration und dem Quervernetzungsgrad bestimmt.

Wollte man die Proteine im Gel nur anhand ihrer Masse und nicht nach Ladung/Konformation auftrennen, erfolgte vor der Auftrennung im elektrischen Feld durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS = engl. *sodium dodecyl sulfate*) oder Lithiumdodecylsulfat (LDS) eine Denaturierung unter Hinzunahme von Hitze. SDS war negativ geladen und band die Mehrzahl der Proteine annähernd proportional zur molekularen Masse. Das gebundene SDS führte somit zu einer hohen negativen Nettoladung, unabhängig von der vorliegenden Eigenladung des entsprechenden Proteins. Zudem wurde die vorher bestehende Konformation des Proteins verändert, so dass alle Proteine in der Gelmatrix eine ähnlich erscheinende Konformation besaßen und die Auftrennung nun nach der molekularen Masse möglich wurde. Überdies erfolgte meist die Hinzugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT), um nach Aufspaltung von Disulfidbrücken Tertiär- bzw. Quartärstrukturen aufzulösen. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine zu bestimmen, wurden kommerziell erhältliche Standards (MW Marker = engl. *molecular weight markers*) verwendet.

Im SDS-PAGE System [Laemmli 1970] bestand das Gel aus zwei Kompartimenten; einem oben befindlichen Sammelgel und einem darunter liegenden Trenngel, die sich durch pH-Wert, Porengröße und Ionenstärke unterschieden. Die zu analysierenden Proben wurden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt wurden. In den Untersuchungen dieser Arbeit fanden NuPAGE-Gele auf Bis-Tris Basis der Firma Invitrogen Verwendung. Die Trenngele besaßen einen kontinuierlichen Gradienten von 4% bis 12% Polyacrylamidkonzentration von Beginn der Laufstrecke bis zum unteren Ende des vorgefertigten Gels. Proteine mit sehr unterschiedlichen Molekularmassen konnten auf einem Gel abgebildet und unterschieden werden. Dies war bei der Untersuchung des hier untersuchten humanen Proteins  $\alpha$ S, seiner Variationen und deren Spaltprodukten nötig.

Die Proteinproben wurden mit dem NuPAGE-LDS-Probenpuffer im Verhältnis 3:1 sowie NuPAGE-Reducing-Agent (DTT, 10x) im Verhältnis 10:1 ver-

setzt und anschließend bei 95°C für 10 min denaturiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 5 min, ehe die Proben bis zur unmittelbar anschließenden Gelelektrophorese gelagert wurden.

In der SDS-PAGE wurden  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein sowie die strukturverwandten  $\alpha$ S-Peptide bzw. deren trunkierte Formen unter denaturierenden Bedingungen in der Gelelektrophorese in kommerziell erhältlichen Gelen in unterschiedlicher, absteigender Dosierung eingesetzt. Die aufgetragenen Proteinmengen reichten von 5,0  $\mu$ g bis 0,1  $\mu$ g in absteigender Menge. Anschließend wurden je nach Anzahl der Taschen/Gel und dem entsprechenden max. Volumen der Taschen in  $\mu$ l Proben bzw. 5  $\mu$ l Marker für die Bestimmung der Peptidgrößen in die Taschen des Gels pipettiert. Nach Zugabe von 1000 ml NuPAGE MES Runningbuffer (Laufpuffer) wurden die Proteine bei 160 V nach Peptidgröße für 35 min bzw. 50 min je nach Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel entweder mit Silber gefärbt oder auf eine Nitrozellulosemembran zur weiteren Proteindetektion geblottet. Die spezifischen Einzelheiten zu den entsprechenden Versuchen sind den Abbildungen bzw. den Abbildungsunterschriften im Teil Ergebnisse, falls hiervon abweichend, zu entnehmen.

### *2.8.3 Proteindetektion im Gel durch Silberfärbung*

Nach der Gelelektrophorese konnten die Proteinbanden durch Färbung sichtbar gemacht werden. Neben der Coomassie-Färbung war die Silberfärbung die am häufigsten verwendete Methode zur Proteindetektion im Polyacrylamid-Gel. Während bei Coomassie-gefärbten Gelen die Intensität der Proteinbanden mit der Proteinkonzentration korreliert, lassen sich die Proteine in silbergefärbten Gelen nicht auf diese Weise quantifizieren. Die Silberfärbung war dagegen sensitiver (bis 0.25 ng/Bande) als die Coomassie-Färbung. Auf die Proteindetektion im Gel mit der Coomassie-Färbung wurde daher verzichtet.

Zur Darstellung der Proteine im Gel wurde in dieser Arbeit das kommerziell erhältliche Pierce Silver Stain Kit entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Vor der Fixierung wurde das Gel 2 x für 5 min mit Reinstwasser (MilliQ) gewaschen, ehe die Fixation mit einer Lösung aus 30% Ethanol/10% Essigsäure für 2 x 15 min erfolgte. Nach zwei weiteren Waschschritten in 10%igem Ethanol folgten zwei Waschschrritte in MilliQ für jeweils 5 min. Die Färbung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit den vorgefertigten Lösungen, ehe sich die Entwicklung des Gels nach zwei Waschschrritten mit MilliQ für je 20 sek anschloss. Die Entwicklung des Gels wurde nach Erscheinen der Banden (ca. 2 min) durch 5%ige Essigsäure und anschließende 10 min Inku-



bation bei Raumtemperatur (RT) gestoppt. Die chemische Reaktion beruhte auf der Behandlung des Gels mit Silbernitrat. Das Silbernitrat band an die im Gel befindlichen Proteine und wurde reduziert.

### 2.8.4 Transfer und Immobilisierung von Proteinen auf Membranen

#### – Immundetektion immobilisierter Proteine – Immunoblot

Der zur Proteinanalyse dienende Immunoblot war ein Western-Blot mit Antigen-detektion mittels Antikörperreaktion [Towbin et al. 1979; Burnette et al. 1981]. Die Antigen-Antikörper-Interaktion ermöglichte die Detektion eines Zielproteins, wobei sich der Begriff des *Blots* auf den Transfer der Proteine aus der Gelmatrix auf eine Membran bezieht. Initial erfolgte die Separation der einzelnen Proteine in der Gelelektrophorese, ehe der Transfer der stark negativ geladenen Proteine durch ein elektrisches Feld zwischen Gel und Blotmembran auf die zweite Matrix, i.d.R. Nitrozellulose- oder Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran, durchgeführt wurde. Die geladenen Proteine wanderten in Richtung der Trägermembran und blieben aufgrund hydrophober Wechselwirkungen in ihr haften. Anschließend waren die auf die Membran übertragenen Proteine weiteren Analysen zugänglich. Verwendet wurden im Rahmen dieser Arbeit Nitrozellulose-Membranen sowie das Tank-Blot-System XCell II Blot der Firma Invitrogen.

Die Vorbereitung des Blotpuffers erfolgte durch:

50 ml NuPAGE Blotpuffer + 100 ml Methanol + 850 ml MilliQ

Mehrere Blot-Papiere wurden mit der Membran im Blotpuffer getränkt und es wurde folgender Aufbau des Blotmoduls gewählt:

**Kathode** : Filterpapier / Nitrozellulosemembran / Gel / Filterpapier : **Anode**.

Anschließend wurden die Proteine bei 170 mA für 40 min auf die Membran übertragen und waren nun weiteren Nachweismethoden zugänglich. Vor der Immundetektion erfolgte die Durchführung einer Ladekontrolle mittels Memcode-Proteindarstellung.

Im Weiteren schloss sich aufgrund der hohen Proteinaffinität der Nitrozellulose das Blocken der Membran an. Diese wurde für 1h bei RT bzw. über Nacht bei 4°C in 1x Roti Block inkubiert, um eine unspezifische Antikörperbindung vor den nächsten Arbeitsschritten zu blocken.

#### 2.8.4.1 Memcode

Das kommerziell erhältliche Memcode-Kit ermöglichte die reversible Darstellung von Proteinbanden auf Nitrozellulose- bzw. PVDF-Membranen nach dem Blotten. Es konnte eine Aussage zum effektiven Proteintransfer vor dem Immunoblot getroffen werden. Zudem ersetzte dies eine Lade-Kontrolle, so

dass eine semiquantitative Aussage über die Proteinmenge möglich war (untere Detektionsgrenze 25–50 ng/Bande). Zudem führte die Methode in den weiteren Arbeitsschritten zu einer besseren Antikörper-Proteinbindung mit verbesserter Signalamplifikation und Visualisierung.

Zunächst wurde die Membran nach Herstellerangaben des Memcode-Kits kurz mit MilliQ gewaschen, bevor mit 25 ml Memcode Stain für 30 sek bei RT inkubiert wurde. Um den Hintergrund zu entfärben, wurde die Membran anschließend 3 x für 5 min mit Memcode Destain Solution und 4 x für 5 min mit MilliQ gewaschen. Diente das Verfahren als Ladekontrolle, so wurde die Membran nun gescannt und digital archiviert. Die nun blau gefärbten Banden wurden nach dem Digitalisieren für 2 min mit Memcode Stain Eraser entfärbt und die Membran 4 x mit MilliQ gewaschen. Nun stand die Membran wieder für weitere Analysen zur Verfügung.

### 2.8.4.2 Immundetektion durch Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörpern

Die Nitrozellulosemembran wurde zur folgenden Antigendetektion mit einem spezifischen Primärantikörper inkubiert, der an das nachzuweisende Protein band. Ein gegen den F<sub>c</sub>-Teil des ersten Antikörpers gerichteter Sekundärantikörper erkannte diesen und unterlag seinerseits einer Enzymkopplung (hier: Meerrettichperoxidase [HRP = engl. *horseradish-peroxidase*]). Dieses Enzym oxidiert in Gegenwart von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das Substrat 3-Amino-Phthal säurehydrazid (Luminol), dessen Elektronen in einen höheren energetischen Zustand übergehen. Bei der Rückkehr auf das niedrigere Energieniveau werden dabei Photonen frei, die einen Film an der entsprechenden Stelle schwärzen. Dieser Prozess mit Emission von Licht als Folge einer chemischen Reaktion wird als Chemilumineszenz bezeichnet. Zur Verbesserung der Chemilumineszenzreaktion wurde in dieser Arbeit das kommerziell erhältliche Kit SuperSignal West Dura der Firma Pierce mit seinem Substrat entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

In den aufgeführten Versuchen wurde der Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration in 20 ml 1x Roti Block verdünnt. Die zuvor geblockte Nitrozellulosemembran (s. 2.8.4) wurde mit dieser Lösung entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4 x für 10 min mit 50 ml 1x PBS + 0,5% Tween (PBST) gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 1x PBST gelöst und die Membran hiermit für 1h bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 3 x mit 50 ml 1x PBST und 1 x mit 50 ml 1x PBS gewaschen. Daraufhin wurde das Substrat ECL (enhanced chemiluminescence) aus dem SuperSignal West Dura-Kit im Mischungsverhältnis 1:1 hinzugegeben, die

Membran durch Schütteln gleichmäßig benetzt und 2 min inkubiert. Nach einem einmaligen Abspülen mit MilliQ erfolgte das Trocknen der Membran auf Blotpapier unter RT. Durch Auflegen der Membran auf einen Röntgenfilm in einer Röntgenkassette wurden die Proteine auf Film mit einer Belichtungszeit von 10 sek bis max. 1 min visualisiert und der Film anschließend entwickelt. Der Film wurde nach Protokoll beschriftet, zur quantitativen Auswertung des Immunoblots eingescannt und digital archiviert. Um den Immunoblot für eine erneute Antikörperfärbung nutzen zu können, wurden die Membranen in den Versuchsreihen teilweise mit Stripping-Puffern behandelt. Neben der kommerziell erhältlichen Reaktionslösung der Firma Pierce, die nach Herstellerprotokoll angewendet wurde, erfolgte die Ablösung der gebundenen Antikörper durch folgendes Denaturierungsprotokoll mit 0,2 molarer NaOH. Die Nitrozellulosemembran wurde dazu initial 5 min mit MilliQ gewaschen, ehe eine Inkubation für 20 min bei RT in 20 ml 0,2 molarer NaOH auf dem Schüttler erfolgte. Nach einem weiteren Waschschriff mit MilliQ für 5 min auf dem Schüttler konnte eine erneute Antikörperinkubation nach zuvor erfolgtem Blocken der Membran in 1x Roti Block für 1h (s. 2.8.4) durchgeführt werden.

### 2.8.5 Oligomerpräparation und -analyse

#### 2.8.5.1 Präparation von $\alpha$ S-Oligomeren/ $\alpha$ S-Fibrillen

Zur Präparation von  $\alpha$ S-Monomeren/-Oligomeren wurden  $\alpha$ S und die weiteren Synucleinproben in MilliQ gelöst und anschließend auf eine Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt. Die gelösten Proteine wurden zu je 25  $\mu$ g in Eppendorf *low bind* Reaktionsgefäße aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur entsprechenden Verwendung aufbewahrt.

Zur Bildung höherer Synuclein-Aggregate wurden die unterschiedlichen Synuclein-Peptide ( $\alpha$ S,  $\beta$ S,  $\gamma$ S,  $\alpha$ S<sub>1-60</sub>,  $\alpha$ S<sub>1-95</sub>,  $\alpha$ S<sub>61-140</sub>,  $\alpha$ S<sub>96-140</sub>,  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K,  $\alpha$ S A53T) nach Paik und Kollegen inkubiert [Paik et al. 1999], im weiteren Verlauf mittels Silbergefärbung nachgewiesen und die Antigen-Antikörper-Reaktion im Immunoblot visualisiert. Für den Immunoblot wurde als Positivkontrolle der monoklonale Antikörper gegen humanes  $\alpha$ S (MAK- $\alpha$ S) verwendet. Um entsprechende Negativkontrollen in den Versuchen zu erhalten, wurden die beschriebenen Schritte jeweils auch ohne  $\alpha$ S durchgeführt. Das Resultat des Protokolls wurde regelmäßig mit Hilfe von Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung überprüft.

Die selbständige Oligomerbildung von  $\alpha$ S in Anwesenheit von Kupfer-Ionen beruhte auf einer zweischrittigen Inkubation des Peptides mit zweiwertigem Kupfer und Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) als Kopplungsreagenz. Im

weiteren Verlauf wurde vor der Gelelektrophorese auf eine Denaturierung bei 95°C und auf eine Zugabe von DTT verzichtet. Es erfolgte lediglich die Hinzugabe des oben beschriebenen 1x LDS-Laufpuffers, um die Tertiär- bzw. Quartärstrukturen der Proteine zu erhalten.

#### 2.8.5.2 Präparation von A $\beta$ -Oligomeren und die Darstellung im Immunoblot

Die Präparation der Amyloid- $\beta$ -Oligomere erfolgte in Analogie zu den Daten von Kaye und Kollegen [Kaye et al. 2003]. Weiter verweisen wir in diesem Zusammenhang auf die Arbeiten von Mengel [Mengel et al. 2013] sowie Dodel und Kollegen [Dodel et al. 2011].

## 2.9 Mikroskopie

### 2.9.1 Verwendete Gewebeproben

Tab. 7: In dieser Arbeit verwendetes humanes Probenmaterial

Proben	Herkunft
<b>Humane Hirngewebeproben von Patienten</b>	<b>Brain Net Europe, GA67</b>
RZ 47/3 + HS190/01	SN eines IPS-Patienten
RZ 59/a	Alters- und geschlechtsadaptierte Kontrolle
	Hirngewebe eines DLK Patienten
	Hirngewebe eines AD Patienten

Hierfür standen Proben von transgenen Mäusen / wt-Mäusen sowie humane Proben zur Verfügung. Die Tierproben von transgenen Tieren mit einer A30P-Mutation (tg(Thy1[A30P]) 46/08–50/08, wt(Thy1[A30P])) unter der Kontrolle eines CD90 (Thy1) Promotors wurden von Herrn Prof. Dr. P. Kahle (Zentrum für Neurologie, Hertie-Institut für klinische Hirnforschung, Abteilung Neurologie mit Schwerpunkt neurodegenerative Erkrankungen, Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt [Kahle et al. 2000; Kahle et al. 2001; Neumann et al. 2004].

Die humanen Proben wurden über das Brain Net Europe bezogen. Das Ethikvotum der Philipps-Universität Marburg (AZ: Studie 06/09) gestattete die Verwendung der Proben im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Die durchgeführten mikroskopischen Arbeiten (Probenvorbereitung, Färbung, Datenaquirierung und Auswertung) erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. med. Frauke Neff.

### 2.9.1.1 Histologische Gefrierschnitte und Färbung

Nach Fixierung des Objektträgers im Kryostaten wurde der Objektisch vorsichtig an das Messer herangeführt. Es wurden einige grobe Schnitte durchgeführt, damit das Messer an den Kern des Präparates gelangt. Danach wurden 3 µm Schnitte angefertigt, die auf der Oberfläche des Messers zu liegen kamen. Von dort wurden sie durch das Heranführen eines Objektträgers entfernt. Die Schnitte wurden zum Trocknen einige Stunden aufbewahrt. Zudem wurden mehrere Präparate 5 min in HE-Lösung gefärbt und nach Entfernen des überschüssigen Farbstoffs (Alkoholreihe) im Mikroskop begutachtet. Hierdurch bestand die Möglichkeit zu überprüfen, ob die Zellarchitektur intakt war oder ob durch das Einfrieren Schäden am Präparat entstanden waren. Anschließend erfolgte die Fixierung des Gewebes mit 4% Paraformaldehyd. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurde das Gewebe 3 x mit PBS gewaschen, gefolgt von einem Permeabilisierungsschritt und einem Absättigungsschritt. Die Antikörperinkubation erfolgte wie in Abschnitt 2.9.2 beschrieben. Alternativ kam eine Fixierung mit Aceton zum Einsatz. Dabei wurde der Objektträger für 10–30 min bei 4°C in Aceton fixiert und anschließend entsprechend immunhistochemisch gefärbt.

### 2.9.1.2 Probenvorbereitung

Die zur Verfügung gestellten Gewebe waren zuvor fixiert und im Anschluss in Paraffin eingebettet worden, um die Struktur der Gewebe zu erhalten und eine Präparateherstellung für die Immunhistochemie (IHC) zu gewährleisten. Für die immunhistochemische Aufarbeitung der Proben wurden 3 µm Paraffin-Schnitte aus den unterschiedlichen Gewebeproben mittels Microtom angefertigt und anschließend auf SuperFrost Plus Objektträger aufgebracht. Die Objektträger banden die Präparate durch elektrostatische Anziehungskraft, so dass kovalente Verbindungen zwischen den mit formalin-fixierten Gewebeschnitten und dem Glas entstanden. Zur Entfernung des Paraffins und Freilegung der Epitope (Vermeidung der Antigenmaskierung) wurden die Gewebeschnitte nach folgendem Protokoll mit absteigender Alkoholreihe gewaschen, wobei jeder Arbeitsschritt in der aufgeführten Reihenfolge für 3 min durchgeführt wurde: Xylen (Xylol) (4 x), 96% (v/v) Ethanol (3 x), 70% (v/v) Ethanol (3 x), deionisiertes Wasser (2 x).

### *2.9.2 Immunhistochemie (IHC)*

Das seit den 1930er Jahren bekannte Prinzip der Immunhistochemie wurde durch Coons beschrieben [Coons et al. 1942]. Die IHC diente dem spezifischen Proteinnachweis mit Hilfe von markierten Antikörpern. Dabei wurde im ersten

Schritt ein spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der an Epitope des entsprechenden Proteins band. Der Sekundärantikörper ist nun gegen den F<sub>c</sub>-Teil des Primärantikörpers gerichtet und zudem an einen Farbstoff gekoppelt. Sind die Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe, wie beispielsweise Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt, spricht man von Immunfluoreszenz (IF). Der Nachweis beruhte auf einer möglichst spezifischen Antigen-Antikörper-Reaktion basierend auf der Antikörperaffinität zu einer bestimmten Gewebeeigenschaft (Epitop). Das in dieser Arbeit verwendete Detektionssystem entsprach einer indirekten Darstellung über Primär- und Sekundärantikörper. Vereinfacht dargestellt ergab dies folgenden Aufbau:

Antigen ( $\alpha$ S)

+ Primärantikörper (nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S)

+ Sekundärantikörper (anti-human-IgG bzw. anti-mouse-IgG) mit Enzym (HRP)

+ Substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)/Chromogen (DAB) = Farbe (braune Einfärbung).

Das Ziel war es, ein Signal am Ort des Epitops erkennen und darstellen zu können. Der Antikörper, der gegen die Zielstruktur gerichtet war, wurde als Primärantikörper bezeichnet. Der Sekundärantikörper diente der Signalamplifikation und Visualisierung. In der IHC hat sich in der Mehrzahl der indirekten IHC die hier verwendete Antikörperfärbung nach der ABC-Methode (= engl. *Avidin-Biotinylated-Enzyme Complex*) durchgesetzt, die auf der Interaktion von Avidin und Biotin, also auf dem Gebrauch biotinylierter Antikörper mit folglich Enzymaktivierung beruht. Der Sekundär-Antikörper war mit Biotin markiert und reagierte mit Avidin. Dieses stellte mit der biotinylierten Meerrettichperoxidase (HRP) als Enzym einen Komplex dar, der einige freie Biotin-Bindungsstellen besaß. Mit diesen lagerte sich der Komplex an den biotinylierten Sekundärantikörper an und es findet eine Verstärkung der Enzymreaktion statt. Der HRP wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) als Substrat angeboten. Die freiwerdenden Protonen oxidierten das vorher fast farblose Chromogen zu seinem farbigen Endprodukt. So bildete das hier verwendete 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) ein braunes Endprodukt.

Für die Antikörperfärbungen wurden neben murinem und humanem Gewebe auch Zellen aus der Zellkultur auf einen Objektträger aufgebracht und immunhistochemisch auf ihre Zusammensetzung untersucht. Zur Darstellung der Zielstrukturen wurde das auf der ABC-Methode basierende, kommerziell erhältliche Vectastain M.O.M.-Kit zur Darstellung des Primärantikörpers auf dem murinen Gewebe und das Vectastain Elite ABC-Kit zur Detektion der Zielstrukturen des humanen Gewebes (entsprechend der Herstellerangaben) verwendet.

Die Gewebeschnitte wurden zur weiteren Vorbereitung der Antigendetektion mit 70% (v/v) Ameisensäure in PBS für 20 min inkubiert und diese wurde in der Folge durch deionisiertes Wasser ersetzt. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit PBS. Die endogene Peroxidase (gegen unspezifische Reaktionen und allgemeine Hintergrundfärbungen) wurde im Anschluss durch Inkubation in 1% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol für 30 min geblockt, ehe die Schnitte in PBS bei 4°C über Nacht gelagert wurden. Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurden die Schnitte für 1 h gemäß den Herstelleranweisungen des Kits mit verdünntem Maus-Ig/Pferdeserum (1:25 in 1x PBS) geblockt. Nach Entfernen der Blocklösung war vor Antikörperinkubation kein weiterer Waschschriff nötig.

Die Primärantikörper wurden in einer Verdünnung von 1:100 (MAK- $\alpha$ S) in Vectastain M.O.M.-Kit Lösung bzw. 1:10 (nAbs- $\alpha$ S) in Vectastain Elite ABC-Kit Lösung aufgebracht. Als Negativ-Kontrollen dienten:

- a) ein Objektträger ohne Antikörper oder Detektionssystem,
- b) zwei Objektträger ohne Primärantikörper, jedoch mit Detektionssystem (Vectastain Elite ABC Kit/Vectastain M.O.M.-Kit),
- c) Objektträger mit Primärantikörper, ohne Detektionssystem.

Die Objektträger wurden mit den Primärantikörpern 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS für je 2 min. Die Sekundärantikörper wurden den Primärantikörpern entsprechend nach Herstellerangaben der Detektionssysteme verdünnt, auf die Gewebeschnitte aufgebracht und für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe mit PBS für je 2 min, um ungebundene Antikörper bzw. unspezifische Bindungen zu entfernen. Es erfolgte eine Inkubation für 30 min mit dem Vectastain Elite ABC-Reagenz entsprechend der Herstellerangaben. Dieser Schriff wurde mit zwei Waschschriffen mit PBS + Triton X-100 für je 2 min abgeschlossen. Im Anschluss wurde das DAB-Reagenz als Chromogen nach den Herstellerangaben aufgebracht. Die Reaktion wurde nach 5 min durch einen Waschschriff mit deionisiertem Wasser gestoppt.

Zur Gegenfärbung und somit Kontrastierung der Zellstrukturen wurden die Schnitte für 10 sek in Mayer's Hämalaun-Lösung getaucht und im Anschluss für 5 min unter fließendes Wasser gehalten. Die anschließende Dehydratation wurde durchgeführt, indem die Schnitte in folgender Abfolge für jeweils 30 sek exponiert wurden:

70% (v/v) Ethanol (3 x), 96% Ethanol (3 x), Isopropanol (1 x), Xylen (4 x).

Die Objektträger wurden unter Zuhilfenahme von RotiHistokitt und Deckgläsern präpariert, bevor die mikroskopische Betrachtung erfolgte. Zur Daten-

speicherung wurden mittels des Nikon Eclipse 80i Mikroskops und der beschriebenen Software digitale Bilder gewonnen.

### 2.9.3 Immunfluoreszenz (IF)

Die Immunfluoreszenzdarstellung erfolgte an der humanen Neuroblastomzelllinie, den sog. SH-SY5Y-Zellen, die entsprechend der oben aufgeführten Maßnahmen kultiviert und behandelt wurden. Zur Fluoreszenzfärbung waren die zuvor auf Deckgläser kultivierten SH-SY5Y-Zellen in 1/1 Methanol/Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) für 5 min fixiert worden. Zur Permeabilisation erfolgte eine Inkubation mit 0,25% Triton-X in PBS für 20 min. Anschließend erfolgte eine 10 min Inkubation mit Ziegenerum (1:25 in PBS) zum Blocken unspezifischer Bindungen. In der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte die Inkubation mit den proteinspezifischen Primärantikörpern für 1h bei  $37^{\circ}\text{C}$  in PBS (Verdünnung 1:100 MAK- $\alpha$ S) / 1:10 nAbs- $\alpha$ S). Nach drei Waschschritten mit PBS schloss sich die Inkubation mit den FITC-gelabelten Sekundärantikörpern in einer 1:30 Verdünnung in PBS für 1h bei RT und lichtgeschützten Bedingungen zur Visualisierung an. Weitere drei Waschschrritte mit PBS folgten vor der 1 minütigen Kernfärbung mit Hoechst 33258. Die Deckgläser wurden mit Vectorshield anti fade media bedeckt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  unter Lichtausschluss gelagert. Zur Datenaquirierung wurden mittels des Nikon TE2000 Mikroskops und der beschriebenen Software digitale Bilder gewonnen.

### 2.9.4 Kernfärbung nach Hoechst

Die Kernfärbung nach Hoechst ermöglichte die Anfärbung von Zellkernen. Der Farbstoff Hoechst 33258 interkalierte in die DNA und konnte im UV-Bereich sichtbar gemacht werden. Eingesetzt wurde eine Verdünnung von 1:1000 (Stocklösung: 1 mg/ml) in PBS. Die Zellen wurden 1 min inkubiert und anschließend zwei Waschschrritte mit PBS durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte das Eindeckeln der Zellen.

### 2.9.5 Thioflavinfärbung [Naiki et al. 1989]

Die verwendete Thioflavin-Lösung wurde durch Auflösen von 1g Thioflavin Pulver in 100ml deionisiertem Wasser zur sofortigen Verwendung hergestellt und nach Gebrauch verworfen. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Gewebeschnitte nach folgendem Protokoll gewaschen, wobei jeder Arbeitsschritt in der aufgeführten Reihenfolge für 3 min durchgeführt wurde:

Xylen (4 x), 96% (v/v) Ethanol (3 x), 70% (v/v) Ethanol (3 x), deionisiertes Wasser (2 x).



Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 5 min in Mayer's Hämalaun-Lösung gefärbt und im Anschluss für 5 min unter fließendes Wasser gehalten.

Nach einem einmaligen Waschschrift mit deionisiertem Wasser wurden die Schnitte in 1% Thioflavin in deionisiertem Wasser für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert, gefolgt von einem Differenzierungsschritt in 70% (v/v) Ethanol (weitere 5 min), ehe die Schnitte zweimalig mit deionisiertem Wasser abgespült, in Glycerin gebettet und mit einem Deckglas versehen wurden. Alle Schritte erfolgten unter lichtgeschützten Bedingungen. Zur Datenaquirierung wurden mittels des Mikroskops digitale Bilder gewonnen.

### 3. ERGEBNISSE

In den Vorarbeiten dieser komplexen Arbeit wurden die humanen polyklonalen nAbs- $\alpha$ S in einer Gemeinschaftsarbeit mit Herrn cand. med. C. Binder aus Einzelspenderserumproben bzw. aus kommerziell erhältlichen i.v.-Immunglobulinkonzentraten isoliert. Nach Nachweis der physiologisch im peripheren Blut vorkommenden nAbs- $\alpha$ S erfolgte in dieser Arbeit die Subdifferenzierung der nAbs- $\alpha$ S bezüglich ihrer Bindungseigenschaften sowohl in vitro als auch in vivo.

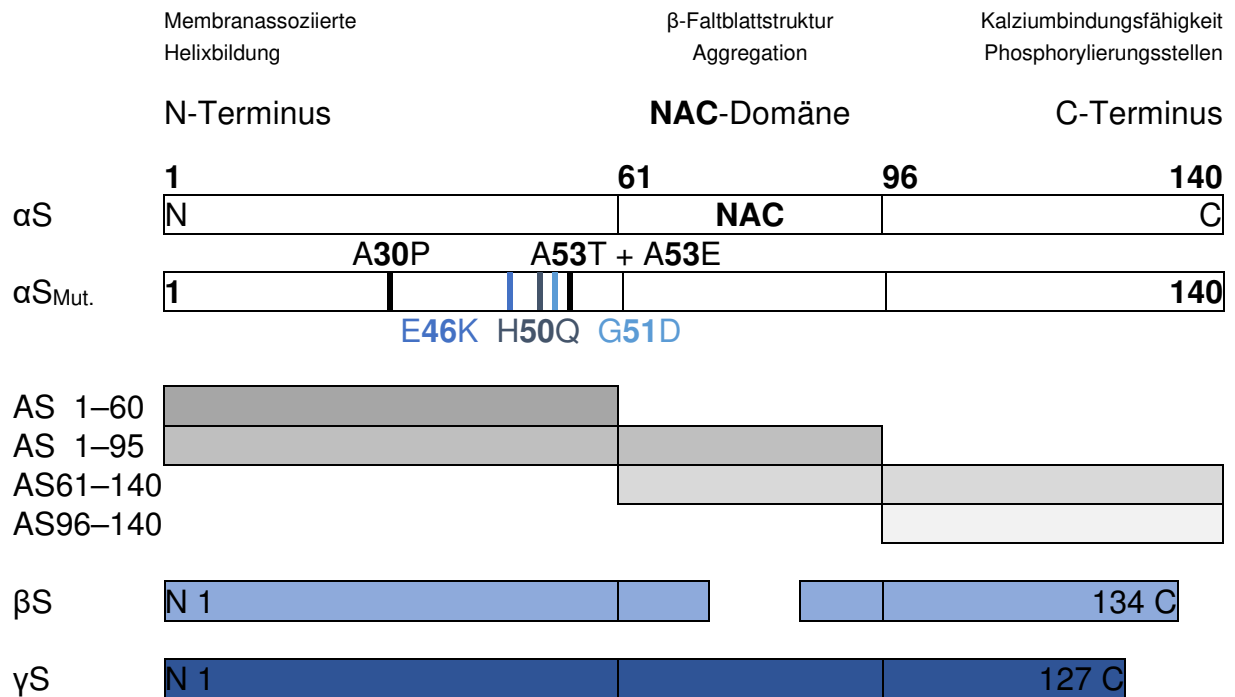
Im ersten Teil wurden die Antigen-detektionseigenschaften des nAbs- $\alpha$ S und dessen histopathologische Zelllokalisierung in der Zellkultur bzw. in humanen und murinen Geweben mittels Immunhistochemie bzw. Immunfluoreszenz untersucht. Zum Einsatz kamen neben der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, murine Gewebe aus dem transgenen  $\alpha$ S Tiermodell (Thy1-h[A30P]), das Bezug auf eine der mit dem PS assoziierten Punktmutation im  $\alpha$ S-Gen nimmt. Humane post-mortem Hirngewebeproben von an PS, AD und DLK Erkrankten wurden überdies auf die Antigen-Antikörper-Interaktion im Vergleich zu kommerziell erhältlichen monoklonalen anti- $\alpha$ S-Antikörpern untersucht.

Der zweite Teil dieser Arbeit untersuchte mittels Immunoblot die Subdifferenzierung der Antigen-Antikörper-Reaktion, um das Epitop bzw. das Bindungsverhalten des nAbs- $\alpha$ S näher einordnen zu können. Neben  $\alpha$ S wurden hierbei die strukturverwandten Homologe  $\beta$ -Synuclein ( $\beta$ S) und  $\gamma$ -Synuclein ( $\gamma$ S) näher beleuchtet. Weiter wurden die ersten drei bekannten und mit dem PS assoziierten bekannten Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen ( $\alpha$ S A30P /  $\alpha$ S E46K /  $\alpha$ S A53T) sowie die einzelnen aus unserer Sicht relevanten und kommerziell erhältlichen Strukturabschnitte des  $\alpha$ S auf ihre Interaktionseigenschaften untersucht. Die zuletzt weiter nachgewiesenen Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen ( $\alpha$ S H50Q,  $\alpha$ S G51D,  $\alpha$ S A53E) waren zu Beginn der Arbeiten nicht verfügbar, so dass eine Beschränkung auf die oben genannten erfolgte.

Den Abschluss bildete die Untersuchung der Antigen-Antikörper-Reaktion von den  $\alpha$ S-Monomeren über die oligomeren Vorstufen bis zur Fibrillenbildung, da  $\alpha$ S den Hauptbestandteil des neuropathologischen Korrelats bei PS mit den charakteristischen zytoplasmatischen Nervenzelleinschlüssen (den LB und LN) darstellt.

Im Folgenden gibt Abbildung 3 einen Überblick über die bei dieser Arbeit eingesetzten Synucleine und die näheren strukturverwandten Peptide.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Synucleinpeptide

Die Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau des Peptids alpha-Synuclein ( $\alpha$ S) aus insgesamt 140 Aminosäuren, das in drei Hauptbestandteile untergliedert werden kann. Über den einzelnen Abschnitten sind die bekannten Funktionen der Peptidbestandteile aufgeführt. Zwischen dem N-terminalen Abschnitt (AS 1–60) und dem C-terminalen Ende (AS 96–140) befindet sich die zentrale NAC-Domäne, die für die Aggregation des Peptids verantwortlich ist. Die Zahlen in der Abbildung beschreiben die Aminosäureposition innerhalb der Peptide. Zudem zeigt die Zeile  $\alpha$ S<sub>Mut.</sub> die klinisch relevanten Punktmutationen des  $\alpha$ S mit Angabe des Aminosäureaustauschs an der entsprechenden Position ( $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K,  $\alpha$ S H50Q,  $\alpha$ S G51D,  $\alpha$ S A53T,  $\alpha$ S A53E), die alle im N-terminalen Abschnitt liegen. Weiter folgen die im Immunoblot eingesetzten  $\alpha$ S-Peptidabschnitte und die nah strukturverwandten, kürzeren Peptide  $\beta$ S und  $\gamma$ S.

(Adaptiert nach: [Iwai et al. 1995; George 2002; Dehay et al. 2015])

### **3.1 Mikroskopische Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

#### *3.1.1 Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw.*

##### *Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S an der SH-SY5Y-Zelllinie*

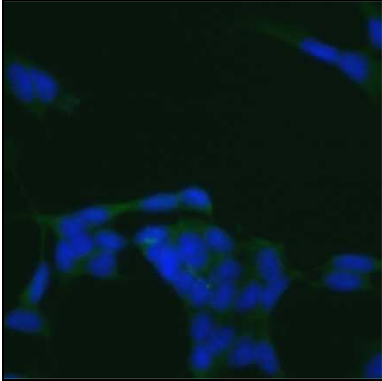
Zum histopathologischen Nachweis der Antigen-Antikörper-Interaktion des isolierten humanen anti- $\alpha$ S-Autoantikörper (nAbs- $\alpha$ S) erfolgte eine erste Analyse an der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y. Als Positiv-Kontrolle diente ein muriner, monoklonaler anti- $\alpha$ S-Antikörper (MAK- $\alpha$ S). Entsprechende Negativ-Kontrollen erfolgten, wie unter 2.9.2 angegeben (Daten nicht gezeigt).

Es zeigte sich in den in Abb. 4 mit I bezeichneten Darstellungen der Nachweis zytoplasmatischer  $\alpha$ S-Strukturen mittels Immunfluoreszenz. In I A ließ sich durch die Positiv-Kontrolle mittels MAK- $\alpha$ S eine schwache, aber spezifische zytoplasmatische Färbung darstellen. Hingegen präsentierte die in I B gezeigte Immunfluoreszenz mit dem nAbs- $\alpha$ S eine stärkere, perinukleär betonte zytoplasmatische Färbung bei weiter bestehendem Nachweis unspezifischer Präzipitate.

Die unter II dargestellten Unterabbildungen zeigen den immunhistochemischen Nachweis der Antigen-Antikörper-Reaktion an den in Paraffin eingebetteten SH-SY5Y-Zellen. In II A ergab die MAK- $\alpha$ S-vermittelte Positiv-Kontrolle eine schwache spezifische zytoplasmatische Färbung des  $\alpha$ S, wohingegen sich in II B durch die nAbs- $\alpha$ S-Antikörperfärbung eine, wie bereits in der Immunfluoreszenz gezeigt, starke zytoplasmatische Färbung der SH-SY5Y-Zellen ergab. II C stellt eine Vergrößerung von II B dar.

Der isolierte nAbs- $\alpha$ S vermochte eine im Vergleich zum MAK- $\alpha$ S stärkere spezifische Darstellung des  $\alpha$ S in den verwendeten Neuroblastomzellen führen. Es zeigte sich, dass der von uns isolierte nAbs- $\alpha$ S in Zellen eine spezifische Bindung zu  $\alpha$ S herstellen konnte.

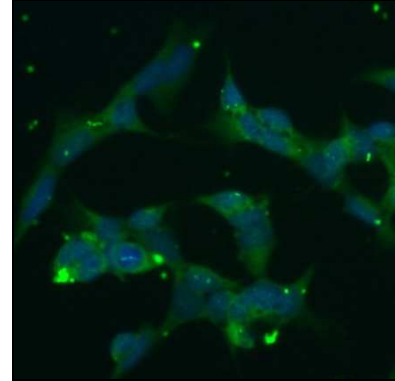
SH-SY5Y IF MAK- $\alpha$ S – 800x



**I A**

Immunfluoreszenz mit *SH-SY5Y*-Zellen:  
**MAK- $\alpha$ S**,  
mit schwacher spez. zytoplasmatischer  
Färbung

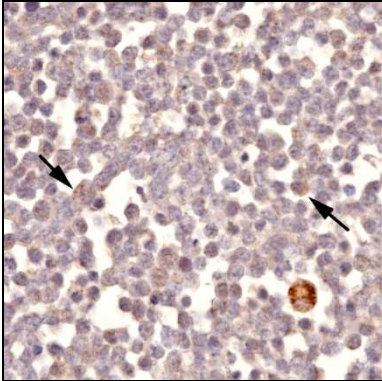
SH-SY5Y IF nAbs- $\alpha$ S – 800x



**I B**

Immunfluoreszenz mit *SH-SY5Y*-Zellen:  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit spez. perinukleärer zyto-  
plasmatischer Färbung bei Nachweis  
unspez. Präzipitate (grüne Punkte)

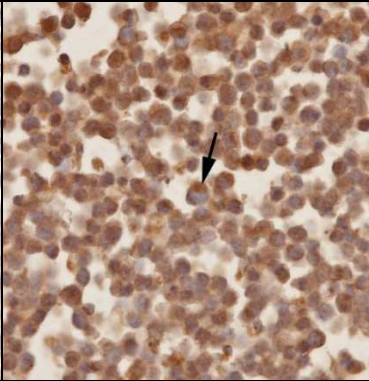
SH-SY5Y IHC MAK- $\alpha$ S – 200x



**II A**

*SH-SY5Y*-Zellen:  
**MAK- $\alpha$ S**,  
mit schwacher spez. zytoplasma-  
tischer Färbung (Pfeile schwarz)

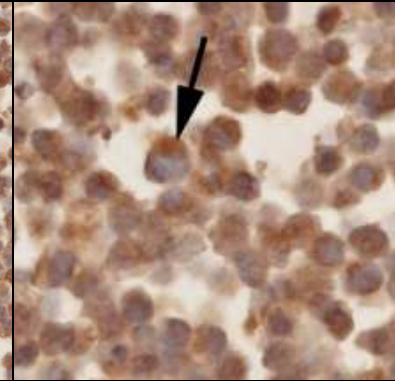
SH-SY5Y IHC nAbs- $\alpha$ S – 200x



**II B**

*SH-SY5Y*-Zellen:  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit starker spez. zytoplasmatischer  
Färbung (Pfeil schwarz)

SH-SY5Y IHC nAbs- $\alpha$ S – 400x



**II C**

*SH-SY5Y*-Zellen:  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit starker spez. zytoplasmatischer  
Färbung (Pfeil schwarz)

**Abb. 4:** Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immun-  
histochemie gegen humanes  $\alpha$ S in der Zellkultur an der humanen Neuro-  
blastomzelllinie *SH-SY5Y*

Darstellung von humanen *SH-SY5Y*-Zellen. I zeigt jeweils die Immunfluoreszenzdarstellung, II die immunhistochemische Färbung der in Paraffin eingebetteten Zellen; A zeigt die jeweiligen Positiv-Kontrollen mittels MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4). B und C zeigen die Färbung mit dem humanen nAbs- $\alpha$ S, wobei II C einen vergrößerten Ausschnitt von II B zeigt. Über den jeweiligen Abbildungen sind die Vergrößerungsangaben zu finden.

Es zeigt sich nach Durchführung der Färbungen (Primärantikörper MAK- $\alpha$ S 1:100 bzw. nAbs- $\alpha$ S 1:10, Sekundärantikörper entsprechend der Primärantikörper aus den Vectastain Kits) der humanen Neuroblastomzelllinie *SH-SY5Y*, die selbst  $\alpha$ S exprimieren, sowohl in der IHC als auch IF eine spezifische Färbung mit dem nAbs- $\alpha$ S im Bereich des Zytoplasmas der Zellen.

#### 3.1.2 Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S am transgenen $\alpha$ S Tiermodell (Thy1)-h[A30P]

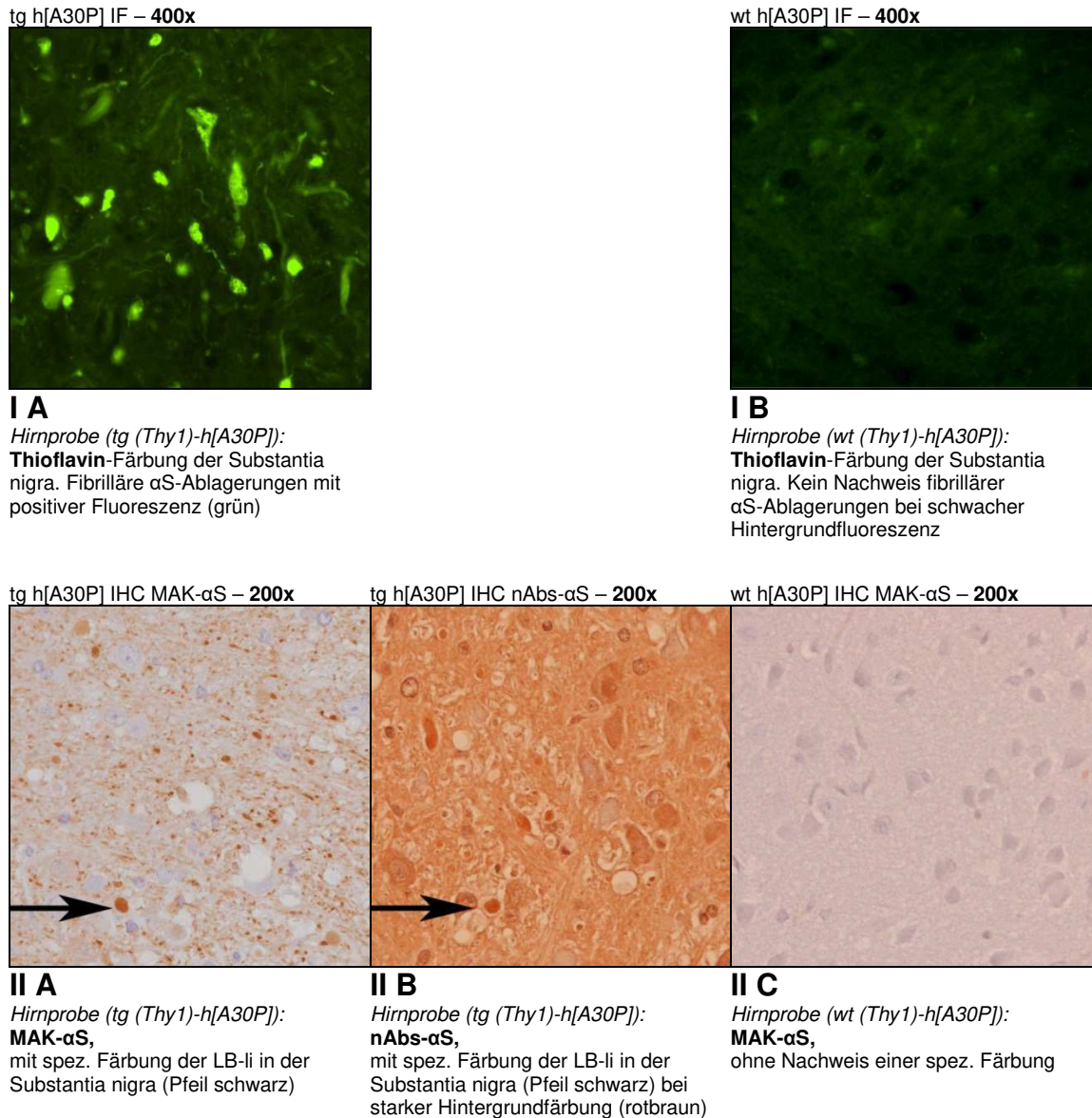
Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Rolle des  $\alpha$ S beim PS spielt die Entdeckung der PS-assoziierten Punktmutationen, die dem  $\alpha$ S-Gen zugeordnet werden konnten [Polymeropoulos et al. 1997]. Überdies sind Tiermodelle für die Entschlüsselung der Rolle des  $\alpha$ S bei neurodegenerativen Erkrankungen von besonderer Bedeutung. Daher ist es wichtig zu klären, ob der nAbs- $\alpha$ S  $\alpha$ S im Tiermodell detektieren kann. In vitro Experimente zeigten, dass durch die A30P-Mutation u.a. eine Steigerung der Fibrillenbildung und vor allem der oligomeren Vorstufen der Fibrillen zu verzeichnen war [Kahle et al. 2000].

Um die Antigen-Interaktion des isolierten nAbs- $\alpha$ S im transgenen Tiermodell nachzuweisen, standen in dieser Untersuchung Hirnproben von unbehandelten Tieren des  $\alpha$ S-Tiermodells (tg/wt (Thy1)-h[A30P]) zur Verfügung. Es bleibt zu beachten, dass in diesem Mausmodell keine klassischen LB nachweisbar sind. Histopathologisches Korrelat der  $\alpha$ S-Aggregate stellen LB-ähnliche Einschlüsse (sog. LB like inclusions = LB-li) dar [Kahle et al. 2001].

Die in Abb. 5 unter I dargestellten Aufnahmen zeigen entsprechende Färbungen mit Thioflavin zur Darstellung fibrillärer Strukturen in der Immunfluoreszenzmikroskopie. Unterabbildung I A führte den Nachweis fibrillärer  $\alpha$ S-Ablagerungen mit positiver Fluoreszenz in der Hirnprobe des transgenen Tieres (tg (Thy1)-h[A30P]). Demgegenüber zeigte die Thioflavin-Färbung der SN der Wildtyp-Maus dieses  $\alpha$ S-Tiermodells keinen Nachweis fibrillärer  $\alpha$ S-Ablagerungen bei schwacher Hintergrundfluoreszenz (I B).

Die unter II dargestellten mikroskopischen Aufnahmen der SN zeigen die immunhistochemische Färbung. Die Färbung der Probe aus dem transgenen [A30P]-Tiermodell mit dem MAK- $\alpha$ S als Positiv-Kontrolle wies in II A eine spezifische Färbung der LB-li in der SN nach. II B zeigt das Korrelat in der Antikörperfärbung mit dem nAbs- $\alpha$ S. Hier ließ sich eine spezifische Färbung der LB-li in der SN bei jedoch starker Hintergrundfärbung feststellen. Demgegenüber präsentierte eine Färbung der Wildtyp-Maus-Hirnprobe mit dem MAK- $\alpha$ S in II C keinen Nachweis einer spezifischen Färbung; LB-li kamen nicht zur Darstellung.

Der isolierte nAbs- $\alpha$ S konnte wie der MAK- $\alpha$ S eine spezifische Darstellung des  $\alpha$ S in den Nervenzellen der SN des transgenen  $\alpha$ S-Mausmodells (tg(Thy1)-h[A30P]) führen. Allerdings war das unspezifische Färben (intensive rotbraune Färbung in II B) des Hintergrundes beim nAbs- $\alpha$ S deutlich im Vergleich zum MAK- $\alpha$ S erhöht, was das Erkennen verschiedener Epitope bzw. unterschiedlicher Konformationen des  $\alpha$ S durch den nAbs- $\alpha$ S anzeigen könnte.



**Abb. 5:** Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes  $\alpha$ S in murinen Hirnproben des transgenen  $\alpha$ S Tiermodells (Thy1)-h[A30P]

Darstellung von Neuronen der SN im transgenen  $\alpha$ S Mausmodell (Thy1)-h[A30P]. I zeigt jeweils die Thioflavinfärbung zur Darstellung fibrillärer Strukturen in der Immunfluoreszenz. I A zeigt im transgenen Tier einen Nachweis fibrillärer  $\alpha$ S-Ablagerungen (grün), wohingegen beim Wildtyp in I B kein  $\alpha$ S-Nachweis geführt werden kann. II stellt die immunhistochemische Färbung gegen humanes  $\alpha$ S dar. A zeigt die jeweilige Positiv-Kontrolle mittels MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4). B zeigt die Färbung mit dem humanen nAbs- $\alpha$ S. Über den jeweiligen Abbildungen sind die Vergrößerungsangaben zu finden. Dabei zeigt sich in den Färbungen (Primärantikörper MAK- $\alpha$ S 1:100 bzw. nAbs- $\alpha$ S 1:10, Sekundärantikörper entsprechend der Primärantikörper aus den Vectastain Kits) im Vergleich von nAbs- $\alpha$ S mit dem MAK- $\alpha$ S eine Detektion der charakteristischen LB-li im transgenen Tier bei jedoch deutlich ausgeprägter Hintergrundfärbung beim nAbs- $\alpha$ S. Beim Wildtyp (II C) ist mittels MAK- $\alpha$ S keine spezifische Färbung in Analogie zu I B zu finden.

#### *3.1.3 Histologische Untersuchungen mittels Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S an humanen Hirngewebeproben*

Nachdem die Antikörper erfolgreich in der Zellkultur und im transgenen Tiermodell getestet wurden, besteht nun die Frage, ob dieser nAbs- $\alpha$ S in der Lage ist, die  $\alpha$ S-Pathologie in humanen Proben zu detektieren. In den folgend dargestellten Untersuchungen wurden die Antigen-Detektionseigenschaften des nAbs- $\alpha$ S in humanen Hirngewebeproben aus Idiopathischem Parkinsonsyndrom (IPS), Alzheimer Demenz (AD) und Demenz mit Lewykörpern (DLK) immunhistochemisch aufgearbeitet.

Abb. 6 zeigt in I die immunhistochemischen Färbungen einer IPS-Hirnprobe. I A führte mittels MAK- $\alpha$ S als Positiv-Kontrolle den Nachweis von Lewy-Körperchen (LB) sowie Lewy-Neuriten (LN). I B zeigt die entsprechende Negativ-Kontrolle zur MAK- $\alpha$ S-Färbung. In I C wurde eine humane Hirnprobe einer gesunden Kontrollperson (hD) mit dem MAK- $\alpha$ S gefärbt und präsentierte ein gesundes Neuron innerhalb der SN ohne LB-Pathologie. Lediglich der Nachweis einer unspezifischen Axonfärbung ließ sich führen. Diesem wurde in I D und I E eine Färbung mit dem nAbs- $\alpha$ S gegenübergestellt. Es zeigte sich analog zu I A die spezifische intrazelluläre Färbung der Synucleinaggregationen in Form von LB und LN. I F zeigt die entsprechende Negativ-Kontrolle zur nAbs- $\alpha$ S-Färbung.

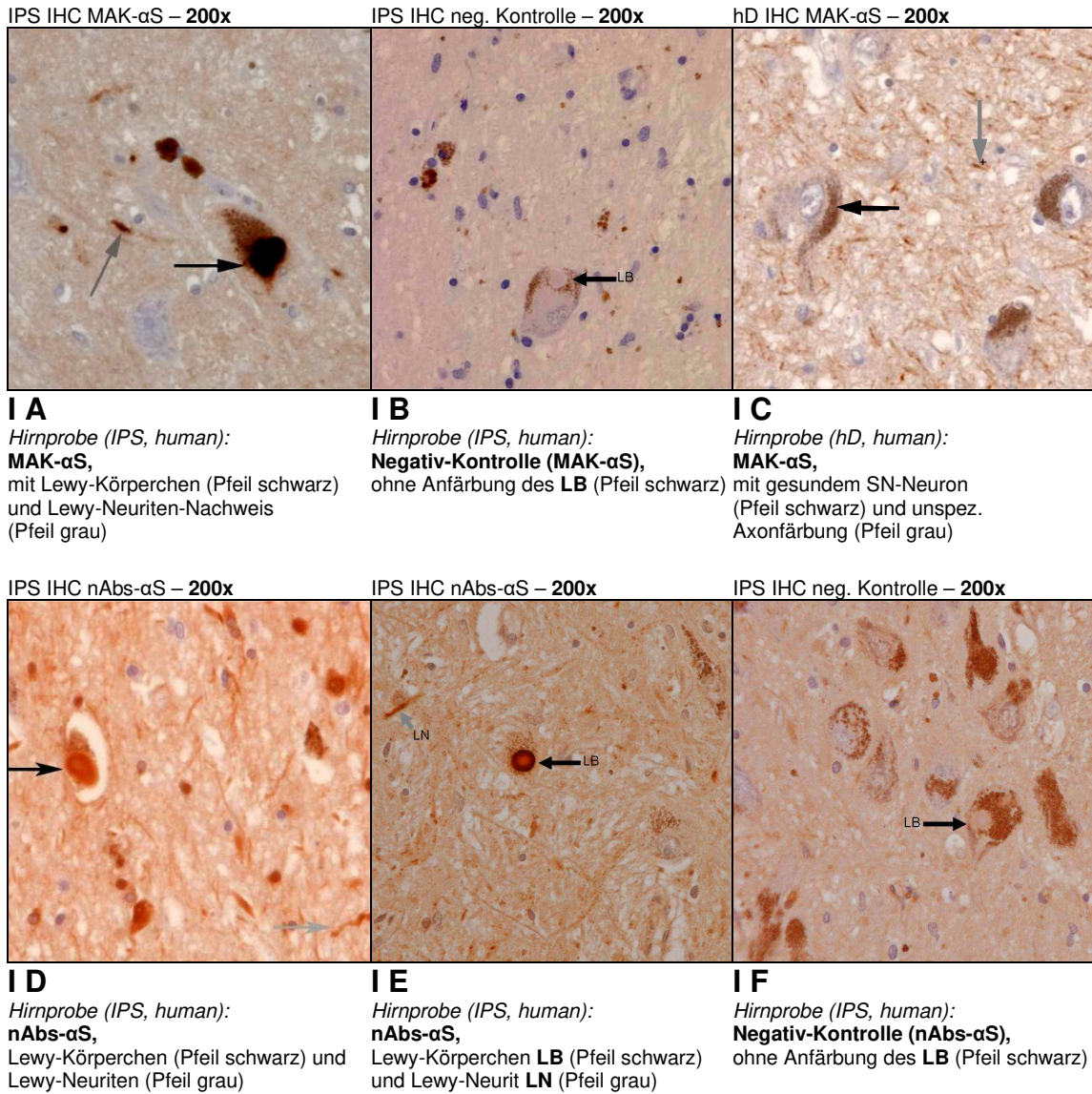
II stellt die histologische Aufarbeitung einer AD-Hirnprobe dar. In der Färbung mittels MAK- $\alpha$ S (II A) konnte keine spezifische Färbung des neuritischen Plaques gezeigt werden. Anders stellt sich dies in II B dar. Mit dem nAbs- $\alpha$ S konnte eine spezifische Färbung der neuritischen Plaque-Komponente nachgewiesen werden.

Eine Hirnprobe aus dem Krankheitsbild der DLK wurde in III aufgearbeitet. Nach Inkubation mit dem MAK- $\alpha$ S als Positiv-Kontrolle konnte, wie in III A gezeigt, eine spezifische Färbung kortikaler LB erzielt werden. Die folgende Darstellung III B zeigt dies analog für die Inkubation mit dem nAbs- $\alpha$ S. Auch hier konnte kortikal ein LB nachgewiesen werden. In III C wird überdies mit nAbs- $\alpha$ S die spezifische Färbung einer neuritischen Plaque-Komponente (Amyloid) gezeigt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war, LB wie LN in IPS bzw. DLK analog zum MAK- $\alpha$ S darzustellen. In den AD-Hirnproben konnten mittels nAbs- $\alpha$ S neuritische Plaques detektiert werden, die einer Färbung mit dem MAK- $\alpha$ S nicht zugänglich waren.



### 3. Ergebnisse

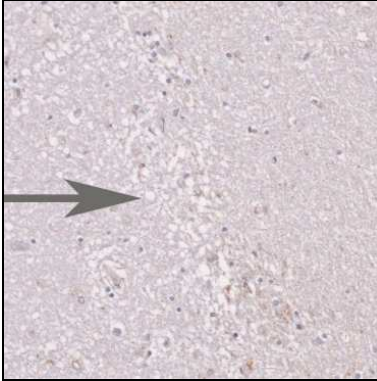


**Abb. 6 (Teil 1: IPS und hD):** Histologische Untersuchungen mittels Immunhistochemie gegen humanes  $\alpha$ S in humanen Hirngewebeproben

Darstellung von humanen Neuronen. I zeigt jeweils die immunhistochemische Färbung der IPS-Proben. A zeigt die Positiv-Kontrolle mittels MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4); D und E zeigen die Färbung mit dem nAbs- $\alpha$ S und den jeweiligen Darstellungen der LB und LN, die durch Pfeile hervorgehoben werden. IC stellt ein gesundes SN Neuron einer altersadaptierten Kontrollperson nach Färbung mit dem MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4) dar, das lediglich eine unspezifische Axonfärbung (grauer Pfeil) zeigt. In B und F finden sich die jeweiligen Negativ-Kontrollen ohne charakteristische Anfärbung der LB und damit des  $\alpha$ S. Über den Abbildungen sind die Vergrößerungsangaben zu finden.

### 3. Ergebnisse

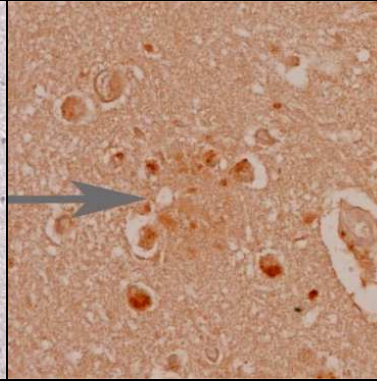
AD IHC MAK- $\alpha$ S – 200x



#### II A

Hirnprobe (AD, human):  
**MAK- $\alpha$ S**,  
ohne spez. Färbung des neuritischen  
Plaques (Pfeil grau)

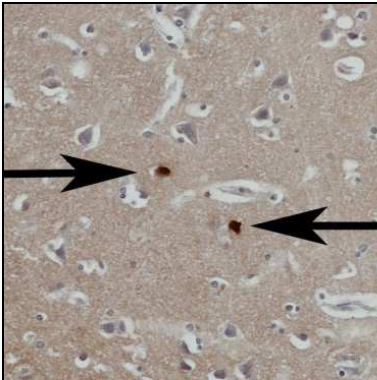
AD IHC nAbs- $\alpha$ S – 200x



#### II B

Hirnprobe (AD, human):  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit spez. Färbung der neuritischen  
Plaques (Amyloid; Pfeil grau)

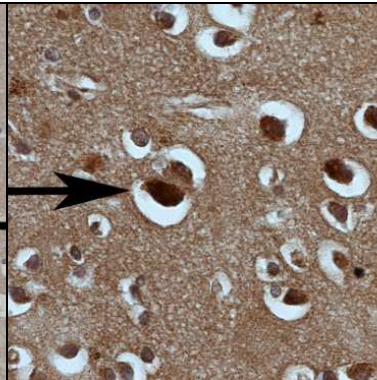
DLK IHC MAK- $\alpha$ S – 200x



#### III A

Hirnprobe (DLK, human):  
**MAK- $\alpha$ S**,  
mit spez. Färbung kortikaler LB  
(Pfeile schwarz)

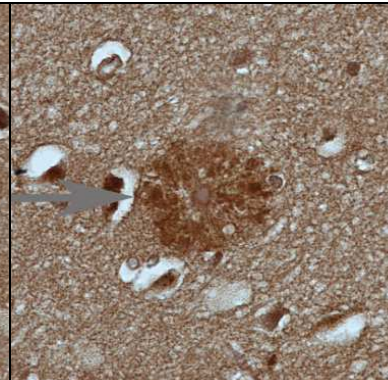
DLK IHC nAbs- $\alpha$ S – 200x



#### III B

Hirnprobe (DLK, human):  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit spez. Färbung kortikaler LB  
(Pfeil schwarz)

DLK IHC nAbs- $\alpha$ S – 200x



#### III C

Hirnprobe (DLK, human):  
**nAbs- $\alpha$ S**,  
mit spez. Färbung der neuritischen  
Plaques (Amyloid;  
Pfeil grau)

**Abb. 6 (Teil 2: AD und DLK):** Histologische Untersuchungen mittels Immun-  
histochemie gegen humanes  $\alpha$ S in humanen Hirngewebeproben

Darstellung von humanen Neuronen. II zeigt jeweils die immunhistochemische Färbung der AD-Proben, III der DLK-Proben. A zeigt die jeweiligen Positiv-Kontrollen mittels MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4). B und C zeigen die Färbung mit dem nAbs- $\alpha$ S. In den Darstellungen III A und III B werden die LB durch Pfeile hervorgehoben. In II B und III C zeigt sich jeweils eine spezifische Färbung des  $\alpha$ S durch den nAbs- $\alpha$ S im Bereich der neuritischen Plaques, die mit dem MAK- $\alpha$ S nicht geführt werden kann (II A).

### 3. Ergebnisse

Gewebe	Probe	Thioflavin Fibrillen- bildung	MAK- $\alpha$ S Positiv- Kontrolle	nAbs- $\alpha$ S anti-alpha- Synuclein	– Negativ- Kontrolle
<b>Zelllinie</b>	<b>SH-SY5Y IF</b>	n.u.	(+)	+	n.g.
	<b>SH-SY5Y</b>	n.u.	(+)	+	n.g.
<b>Murin</b>	<b>tg (Thy1)-h[A30P] IF</b>	+			n.g.
	<b>wt (Thy1)-h[A30P] IF</b>	–			n.g.
	<b>tg (Thy1)-h[A30P]</b>		+	+	n.g.
	<b>wt (Thy1)-h[A30P]</b>		–	n.u.	n.g.
<b>Human</b>	<b>IPS</b>	n.u.	+	+	–
	<b>AD</b>	n.u.	–	+	n.g.
	<b>DLK</b>	n.u.	+	++	n.g.
	<b>hD</b>	n.u.	–	n.u.	n.u.

**Tab. 8:** Die histopathologischen Ergebnisse im Überblick

Die Tabelle zeigt im Überblick die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchungen. In der linken Spalte finden sich die untersuchten Gewebearten mit Zelllinie, Proben aus dem murinen  $\alpha$ S-Tiermodell sowie die humanen Proben, deren Subdifferenzierung in der zweiten Spalte aufgezeigt ist. Die Thioflavinfärbung wurde zur Verdeutlichung der Fibrillenbildung im beschriebenen  $\alpha$ S-Tiermodell in der dritten Spalte aufgeführt. Zur Positivkontrolle diente durchweg der monoklonale Antikörper gegen humanes alpha-Synuclein, kurz MAK- $\alpha$ S (Klon Syn211, MBL, s. Tab. 4), der innerhalb des  $\alpha$ S die AS 121–125 als Epitopregion erkennt. Die Spalte der Ergebnisse der Färbungen mit dem nAbs- $\alpha$ S wurden grau hinterlegt. Prinzipiell wurden Negativkontrollen durchgeführt, die nicht explizit gezeigt werden. Bei der humanen Gewebeprobe eines nicht an einer neurodegenerativen Erkrankung betroffenen Verstorbenen wurde lediglich eine Färbung mit dem MAK- $\alpha$ S durchgeführt.

(n.g. = nicht gezeigt; n.u. = nicht untersucht)

### 3.2 Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot

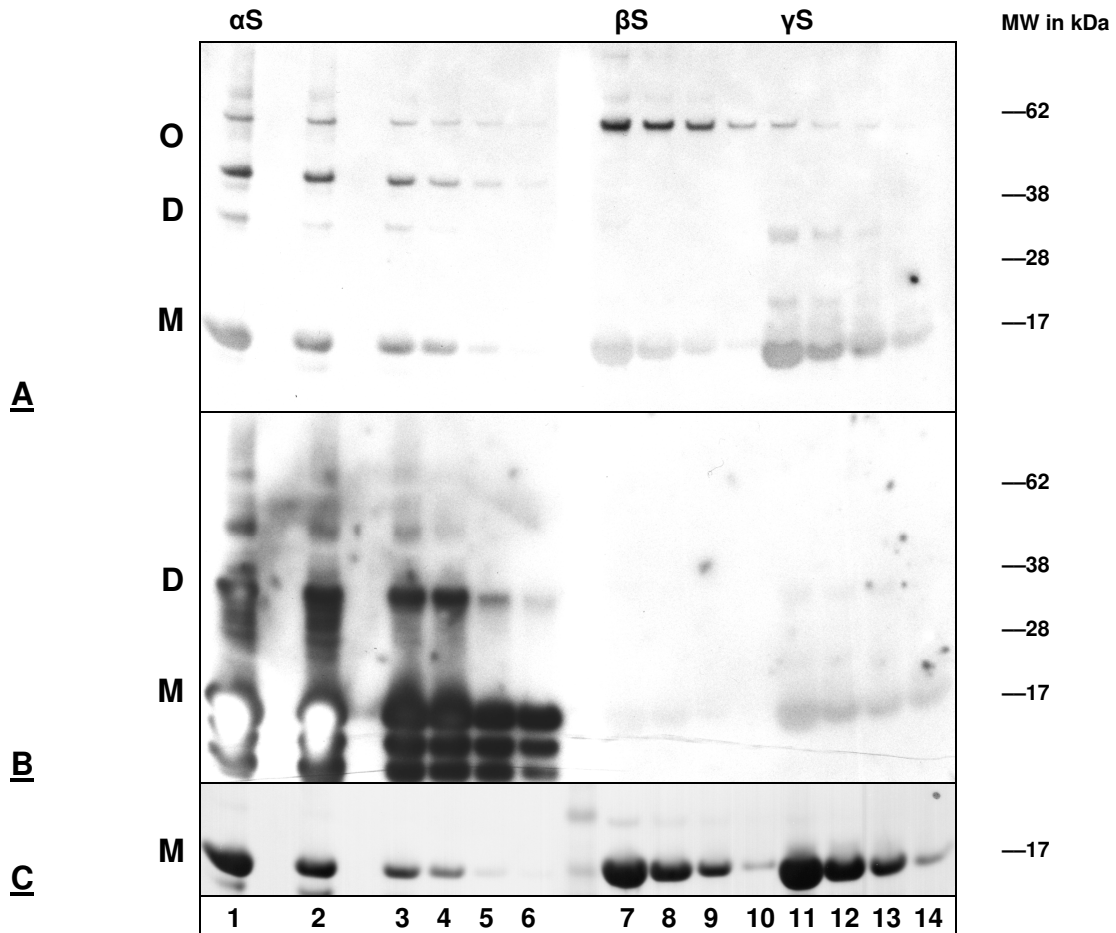
Zur Ermittlung der Antigen-Antikörper-Interaktion wurden die aufgeführten Peptide im Immunoblot eingesetzt, nach Protokoll aufgetrennt, übertragen und detektiert. Nach Separation der Peptide im Polyacrylamid-Gel erfolgte der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die eingesetzten Proben wurden nach Ladungskontrolle mittels Memcode digitalisiert, ehe sich die Immundetektion mittels indirekter Antikörperdarstellung anschloss. Prinzipiell wurde die Positiv-Kontrolle mittels kommerziell erhältlichem MAK- $\alpha$ S (AHB0261, Invitrogen, s. Tab. 4), der als Epitop die AS 121–125 des  $\alpha$ S erkennt, durchgeführt. Alle Versuchsreihen wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens dreimalig durchgeführt.

#### 3.2.1 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels

##### *nAbs- $\alpha$ S gegen humanes $\alpha$ S, $\beta$ S und $\gamma$ S*

In den Untersuchungen wurde die Bindungsspezifität des isolierten humanen anti- $\alpha$ S-Antikörpers (nAbs- $\alpha$ S) mittels Immunoblot untersucht. In der Untersuchung wurde die Detektion von  $\alpha$ S und seiner strukturverwandten Peptide  $\beta$ -Synuclein ( $\beta$ S) und  $\gamma$ -Synuclein ( $\gamma$ S) beleuchtet. Die Proteine besitzen zu einem gewissen Grad Sequenzübereinstimmungen [George 2002].

Abb. 7 zeigt den Immunoblot der Verdünnungsreihe mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein. Unter A ist das Bindungsverhalten des nAbs- $\alpha$ S dargestellt. Es zeigte sich, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war, humanes  $\alpha$ S in seiner monomeren Form (MW ca. 14kD) von 5,0  $\mu$ g bis 1,0  $\mu$ g sicher zu detektieren. Darüber hinaus waren oligomere Formen, insbesondere Di-, Tri- und Tetramere (MW ca. 28kDa, 42kDa, 56kDa) z.T. bis 0,1  $\mu$ g nachzuweisen. Im Weiteren waren schwache Banden für höhere Aggregate des  $\alpha$ S detektierbar. Für  $\beta$ -Synuclein konnte lediglich eine schwache, konzentrationsabhängige Bande auf Höhe der möglichen Tetramerform nachgewiesen werden. Eine spezifische Färbung der Monomere war weder für  $\beta$ -, noch für  $\gamma$ -Synuclein zu bestätigen. Zur Positiv-Kontrolle ist in der Teilabbildung B der identische Immunoblot nach Durchführung eines Stripping-Manövers abgebildet. Der Immunoblot mit dem MAK- $\alpha$ S detektierte die mono- und dimeren Formen des humanen  $\alpha$ S bei schwächerem, konzentrationsabhängigem Nachweis der höher aggregierten Formen. Ein Nachweis des  $\beta$ -/ $\gamma$ -Synucleins war aufgrund des zu erkennenden Epitops durch den MAK- $\alpha$ S (AS 121–125 des humanen  $\alpha$ S) nicht zu erwarten und konnte in dem Versuch bestätigt werden. Die Teilabbildung C zeigt die durchgeführte Ladungskontrolle. Eine gleichmäßige, semiquantitative Proteinladung zwischen den unterschiedlichen Synucleinen war in absteigender Konzentration belegbar.



**Abb. 7:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen  $\alpha$ S,  $\beta$ S und  $\gamma$ S

Darstellung von rekombinantem  $\alpha$ S,  $\beta$ S und  $\gamma$ S im Immunoblot nach Auftrennung in der SDS-PAGE bei 160mV und anschließendem Transfer auf eine Blotmembran im elektrischen Feld. Nach Ladungskontrolle mittels Memcode-Kit stellt sich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper die oben gezeigte Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

**A** zeigt den Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S als Primärantikörper mit Nachweis von  $\alpha$ S in einer Verdünnungsreihe von 5,0 $\mu$ g–0,1 $\mu$ g in seiner Mono-, Di-, Tri-, Tetramer-Form und weiterer Oligomere. Der nAbs- $\alpha$ S erkennt bei  $\beta$ S lediglich eine höher aggregierte Form a.e. Tetramere bei fehlender Detektion von  $\gamma$ S. **B** zeigt den Immunoblot mittels MAK- $\alpha$ S (AHB0261, Invitrogen, s. Tab. 4) mit Nachweis von  $\alpha$ S in v.a. Monomer- und Dimer-Form ohne Detektion von  $\beta$ S oder  $\gamma$ S. **C** zeigt die Ladungskontrolle in absteigender Verdünnung von  $\alpha$ S,  $\beta$ S und  $\gamma$ S mittels Memcode bei deutlicher Darstellung von  $\gamma$ S. Zur besseren Übersicht im Gel wurden die Taschen zwischen den Spalten 1 und 2 sowie 2 und 3 nicht geladen. Zwischen den Spalten 6 und 7 befindet sich der geringer eingesetzte, nicht vollständig gezeigte Standardgrößenmarker, der schematisch am rechten Rand der Abbildung nach MW in kDa ersatzweise aufgeführt ist.

**A** Immunoblot mit nAbs- $\alpha$ S    **B** Immunoblot mit MAK- $\alpha$ S    **C** Memcode

Spalte 1     $\alpha$ S 5,0 $\mu$ g  
 Spalte 2     $\alpha$ S 2,5 $\mu$ g  
 Spalte 3     $\alpha$ S 1,0 $\mu$ g  
 Spalte 4     $\alpha$ S 0,5 $\mu$ g  
 Spalte 5     $\alpha$ S 0,25 $\mu$ g  
 Spalte 6     $\alpha$ S 0,1 $\mu$ g  
 Spalte 7     $\beta$ S 5,0 $\mu$ g  
 Spalte 8     $\beta$ S 2,5 $\mu$ g  
 Spalte 9     $\beta$ S 1,0 $\mu$ g  
 Spalte 10     $\beta$ S 0,5 $\mu$ g

**M** = Monomere ~14kDa  
**D** = Dimere ~28kDa  
**O** = Oligomere >28kDa

Spalte 11     $\gamma$ S 5,0 $\mu$ g  
 Spalte 12     $\gamma$ S 2,5 $\mu$ g  
 Spalte 13     $\gamma$ S 1,0 $\mu$ g  
 Spalte 14     $\gamma$ S 0,5 $\mu$ g



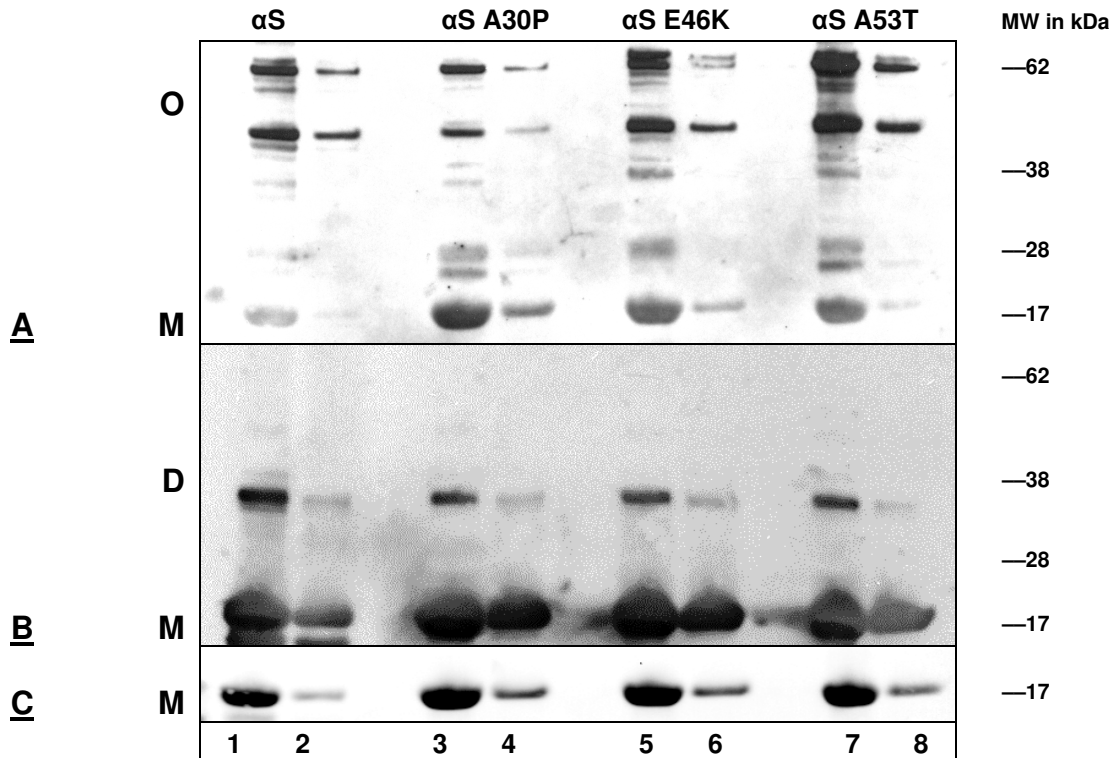
#### 3.2.2 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mit Varianten von $\alpha$ S

Abb. 8 zeigt den Immunoblot der Verdünnungsreihe mit den Synuclein-Proteinen. Unter A ist das Bindungsverhalten des humanen nAbs- $\alpha$ S dargestellt. Es zeigte sich, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war, humanes  $\alpha$ S in seiner monomeren Form (MW ca. 14kD) bei 5,0  $\mu$ g und 1,0  $\mu$ g sicher zu detektieren. Darüber hinaus waren in allen Reihen die oligomeren Formen deutlicher, insbesondere die Tri- und Tetramere (MW ca. 42kDa, 56kDa), nachzuweisen. Für das Dimer kam im Vergleich zur Positiv-Kontrolle nur eine schwache Bande zur Darstellung. Es war zwischen den  $\alpha$ S-Punktmutationen und dem  $\alpha$ S kein wesentlicher Unterschied im Bindungsverhalten zu bestätigen. Es zeigte sich sowohl für die ersten drei bekannten Punktmutationen  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K als auch  $\alpha$ S A53T eine konzentrationsabhängige Detektion des Proteins, ohne dass durch den Austausch der beschriebenen Aminosäuren an den entsprechenden Stellen im Immunoblot ein Unterschied der Detektionsfähigkeit zu finden war.

Zur Positiv-Kontrolle ist in der Teilabbildung B der identische Immunoblot nach Durchführung eines Stripping-Manövers abgebildet. Nach Inkubation mit dem MAK- $\alpha$ S und einem entsprechenden Sekundärantikörper detektierten diese die mono- und dimeren Formen des humanen  $\alpha$ S und seiner  $\alpha$ S-Punktmutationen bei schwächerem, konzentrationsabhängigen Nachweis der höher aggregierten Formen. Tri- oder Tetramere ließen sich nicht nachweisen.

In Teilabbildung C ist die durchgeführte Ladungskontrolle mit dem Memcode-Kit abgebildet. Eine gleichmäßige, semiquantitative Proteinladung zwischen  $\alpha$ S und den einzelnen  $\alpha$ S-Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen war in absteigender Konzentration zu belegen.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 8:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen  $\alpha$ S und die  $\alpha$ S-Punktmutationen  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K sowie  $\alpha$ S A53T

Darstellung von rekombinantem  $\alpha$ S und Peptiden der ersten drei bekannten klinisch relevanten Punktmutationen des  $\alpha$ S (bestehend aus  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K,  $\alpha$ S A53T). Nach Ladungskontrolle mittels Memcode-Kit stellt sich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper die oben gezeigte Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

**A** zeigt den Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S als Primärantikörper mit Nachweis von  $\alpha$ S 5,0 $\mu$ g und 1,0 $\mu$ g in seiner Monomer-, Tri- und Tetramer-Form. Der nAbs- $\alpha$ S erkennt bei den einzelnen  $\alpha$ S-Punktmutationen gleichwertig das punktuell veränderte  $\alpha$ S-Peptid. **B** zeigt den Immunoblot mittels MAK- $\alpha$ S (AHB0261, Invitrogen, s. Tab. 4) mit Nachweis von  $\alpha$ S sowie der Peptide der  $\alpha$ S-Punktmutationen (im Bereich außerhalb des MAK- $\alpha$ S mit Epitopregion AS 121–125) in v.a. Monomer- und Dimer-Form. **C** zeigt die Ladungskontrolle mittels Memcode. Zur besseren Übersicht im Gel wurden die Taschen zwischen den Spalten 2 und 3, 4 und 5 sowie 6 und 7 nicht geladen. Links von Spalte 1 befindet sich der mengenmäßig deutlich geringer eingesetzte und nicht vollständig gezeigte Standardgrößenmarker, der schematisch am rechten Rand der Abbildung nach MW in kDa ersatzweise aufgeführt ist.

**A** Immunoblot mit nAbs- $\alpha$ S    **B** Immunoblot mit MAK- $\alpha$ S    **C** Memcode

Spalte 1     $\alpha$ S 5.0 $\mu$ g  
 Spalte 2     $\alpha$ S 1.0 $\mu$ g  
 Spalte 3     $\alpha$ S A30P 5.0 $\mu$ g  
 Spalte 4     $\alpha$ S A30P 1.0 $\mu$ g  
 Spalte 5     $\alpha$ S E46K 5.0 $\mu$ g  
 Spalte 6     $\alpha$ S E46K 1.0 $\mu$ g  
 Spalte 7     $\alpha$ S A53T 5.0 $\mu$ g  
 Spalte 8     $\alpha$ S A53T 1.0 $\mu$ g

**M** = Monomere ~14kDa  
**D** = Dimere ~28kDa  
**O** = Oligomere >28kDa

#### 3.2.3 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S gegen $\alpha$ S und die verkürzten Peptidabschnitte des $\alpha$ S

Wie in Abb. 3 gezeigt, ist das Protein  $\alpha$ S im Wesentlichen in 3 Teilabschnitte zu unterteilen. Neben dem membranassoziierten N-Terminus (AS 1–60) mit seinen sich inkomplett wiederholenden *KTKEGV*-Bindungsmotiven und den in diesem Bereich lokalisierten  $\alpha$ S-Punktmutationen sind die hydrophobe NAC-Domäne (AS 61–95) mit der für die Fibrillenbildung nötigen Aminosäuresequenz und der an Phosphorylierungsstellen reiche C-terminale Bereich (AS 96–140) abzugrenzen [George 2002]. Im Folgenden wurde untersucht, an welchen Abschnitt der nAbs- $\alpha$ S bindet.

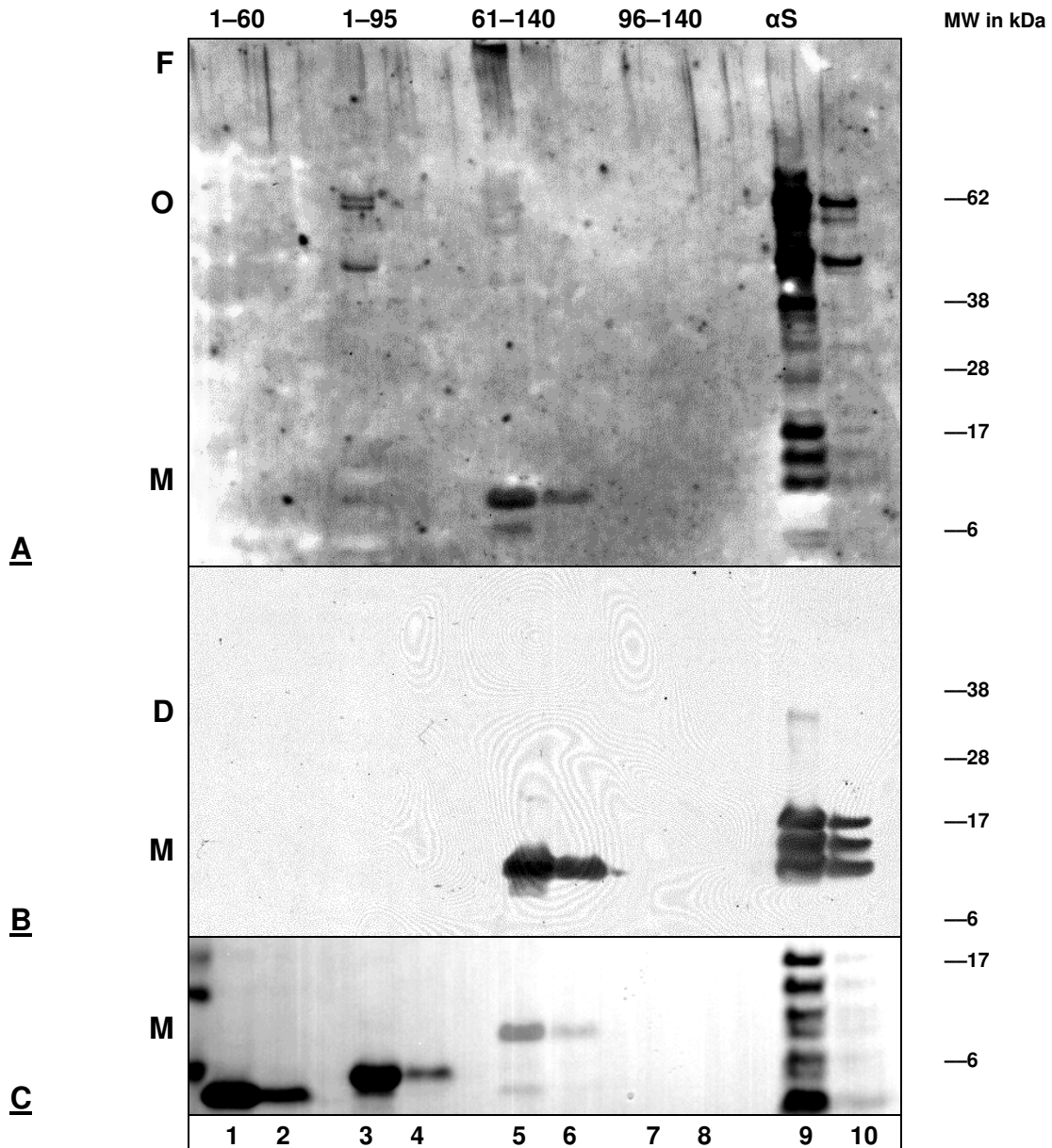
Abb. 9 zeigt den Immunoblot der Verdünnungsreihe mit den verkürzten  $\alpha$ S-Synuclein-Peptiden. Zum Einsatz kamen neben dem humanen  $\alpha$ S die Sequenzen des  $\alpha$ S mit den AS 1–60, AS 1–95, AS 61–140 und AS 96–140 mit je 5,0  $\mu$ g und 1,0  $\mu$ g Peptideinsatz. Unter A ist das Bindungsverhalten des humanen nAbs- $\alpha$ S gegenüber den aufgetragenen Oligopeptiden dargestellt. Es zeigte sich, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war humanes  $\alpha$ S, wie in Abb. 7 und Abb. 8 gezeigt, sicher zu detektieren. Während für die Peptidsequenzen  $\alpha$ S<sub>1–60</sub> und  $\alpha$ S<sub>96–140</sub> keinerlei Bindungsinteraktionen nachweisbar waren, konnte ein starkes Signal des  $\alpha$ S<sub>61–140</sub> in seiner am ehesten dimeren Form und im Verlauf der höher aggregierten Formen i.S. von Fibrillen nachgewiesen werden. Für das Peptid  $\alpha$ S<sub>1–95</sub> konnten nur sehr schwache Banden bei höher aggregierten  $\alpha$ S-Spezies bei deutlicher Hintergrundfärbung vermutet werden.

Zur Positiv-Kontrolle ist in der Teilabbildung B eine Färbung mit dem beschriebenen MAK- $\alpha$ S dargestellt. Dieser detektierte klar die monomeren Formen des humanen  $\alpha$ S bei ähnlich starkem Nachweis der monomeren Form des  $\alpha$ S<sub>61–140</sub> Oligopeptids. Die anderen Oligopeptide ließen sich nicht nachweisen.

Somit erscheint im Vergleich der vier verkürzten, synthetisch hergestellten  $\alpha$ S-Peptide, die die unterschiedlichen Regionen des  $\alpha$ S überspannen, die NAC-Region, die im Bereich der AS 61–95 zu finden ist, für die Bindung des nAbs- $\alpha$ S an humanes  $\alpha$ S relevant zu sein.

In Teilabbildung C ist die durchgeführte Ladungskontrolle mit dem Memcode-Kit abgebildet. Eine gleichmäßige, semiquantitative Proteinladung zwischen  $\alpha$ S und den einzelnen  $\alpha$ S-Oligopeptiden war in absteigender Konzentration zu belegen, wobei eine Darstellung des Peptides  $\alpha$ S<sub>61–140</sub> schwach, des Peptides  $\alpha$ S<sub>96–140</sub> nicht belegbar war.





**Abb. 9:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen  $\alpha$ S und die  $\alpha$ S-Peptidabschnitte  $\alpha$ S<sub>1-60</sub>,  $\alpha$ S<sub>1-95</sub>,  $\alpha$ S<sub>61-140</sub>,  $\alpha$ S<sub>96-140</sub>

Darstellung von rekombinantem  $\alpha$ S und den kürzeren  $\alpha$ S-Peptidabschnitten entsprechend des dreiteiligen Aufbaus des  $\alpha$ S (s. Abb. 3) im Immunoblot nach entsprechender Auftrennung in der SDS-PAGE bei 160mV und anschließendem Transfer auf eine Blotmembran im elektrischen Feld. Nach den Peptidgrößen sind die  $\alpha$ S-Peptide bei folgenden Molekulargewichten zu erwarten:  $\alpha$ S ~14kDa,  $\alpha$ S 1-60 ~6kDa,  $\alpha$ S 1-95 ~9kDa,  $\alpha$ S 61-140 ~8kDa,  $\alpha$ S 96-140 ~5kDa. Nach Ladungskontrolle mittels Memcode-Kit stellt sich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper die oben gezeigte Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

**A** zeigt den Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S als Primärantikörper mit Nachweis von  $\alpha$ S 5,0 $\mu$ g und 1,0 $\mu$ g in seiner Monomer-, Tri- und Tetramer-Form. Der nAbs- $\alpha$ S erkennt bei den kürzeren  $\alpha$ S-Peptidabschnitten lediglich das Dimer  $\alpha$ S 61-140 und höhere Aggregate von  $\alpha$ S 1-95 sowie  $\alpha$ S 61-140 sicher. **B** zeigt den Immunoblot mittels MAK- $\alpha$ S (AHB0261, Invitrogen, s. Tab. 4, mit Epitopregion AS 121-125) mit Nachweis von  $\alpha$ S sowie  $\alpha$ S 61-140. **C** zeigt die Ladungskontrolle mittels Memcode ohne Darstellung von Banden im Bereich von  $\alpha$ S 96-140. Zur besseren Übersicht im Gel wurden die Taschen zwischen den Spalten 2 und 3, 4 und 5, 6 und 7 sowie 8 und 9 nicht geladen. Links von Spalte 1 befindet sich der mengenmäßig deutlich geringer

### 3. Ergebnisse

---

eingesetzte und nicht vollständig gezeigte Standardgrößenmarker, der schematisch am rechten Rand der Abbildung nach MW in kDa ersatzweise aufgeführt ist.

**A** Immunoblot mit nAbs- $\alpha$ S    **B** Immunoblot mit MAK- $\alpha$ S    **C** Memcode

Spalte 1     **$\alpha$ S 1–60** 5.0 $\mu$ g

Spalte 2     **$\alpha$ S 1–60** 1.0 $\mu$ g

Spalte 3     **$\alpha$ S 1–95** 5.0 $\mu$ g

Spalte 4     **$\alpha$ S 1–95** 1.0 $\mu$ g

Spalte 5     **$\alpha$ S 61–140** 5.0 $\mu$ g

Spalte 6     **$\alpha$ S 61–140** 1.0 $\mu$ g

Spalte 7     **$\alpha$ S 96–140** 5.0 $\mu$ g

Spalte 8     **$\alpha$ S 96–140** 1.0 $\mu$ g

Spalte 9     **$\alpha$ S** 5.0 $\mu$ g

Spalte 10     **$\alpha$ S** 1.0 $\mu$ g

**M** =  $\alpha$ S-Monomer ~14kDa

**D** =  $\alpha$ S-Dimer ~28kDa

**O** = Oligomere >28kDa

**F** = Fibrillen

### **3.3 Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot gegenüber $\alpha$ S-Oligomeren und $\alpha$ S-Fibrillen**

Da insbesondere die oligomeren Vorstufen bei der Bildung der fibrillären Strukturen von Bedeutung sind, wurde in diesem Abschnitt versucht, die Detektionseigenschaften des nAbs- $\alpha$ S gegenüber diesen zu beleuchten.

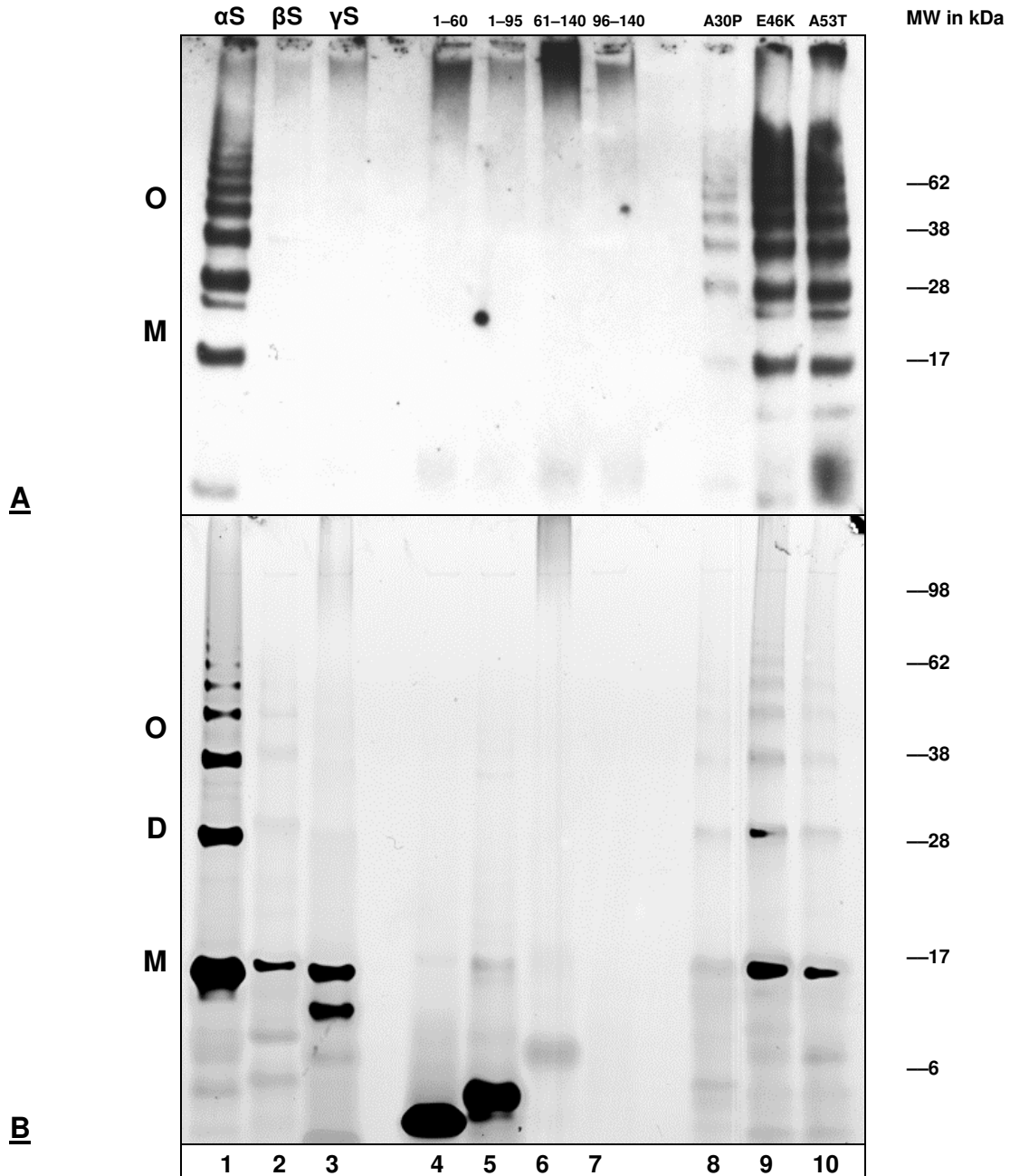
#### *3.3.1 Der Nachweis der höheren $\alpha$ S-Aggregationsformen in der Silber-Gel-Färbung*

Zur Darstellung der gebildeten  $\alpha$ S-Oligomere bzw.  $\alpha$ S-Fibrillen erfolgte eine Silberfärbung, wie sie in Abb. 10 B zu sehen ist. Es zeigte sich, dass unter  $\alpha$ S sowie seiner drei eingesetzten  $\alpha$ S-Punktmutationen eine schrittweise Bildung höherer Oligomere nachweisbar war, wobei die eingesetzte Menge des  $\alpha$ S A30P-Proteins deutlich geringer zu sein schien.  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein zeigten in dieser Darstellung keine nachweisbaren Banden höherer Aggregate. Bezüglich der einzelnen verkürzten  $\alpha$ S-Abschnitte konnte in den Peptiden  $\alpha$ S<sub>1-95</sub> und  $\alpha$ S<sub>61-140</sub> bei schwachem Signal eine Bildung vermutet werden.

#### *3.3.2 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S gegen die $\alpha$ S-Oligomerformen und $\alpha$ S-Fibrillen*

Im Immunoblot war eine Detektion durch den nAbs- $\alpha$ S der höheren Oligomerisierungsstufen des  $\alpha$ S, aber auch seiner  $\alpha$ S-Punktmutationen nachzuweisen (s. Abb. 8 A). Die schwächere Detektion der  $\alpha$ S A30P-Proben ist auf die geringer eingesetzte Proteinmenge zurückzuführen (siehe auch Abb. 8). Semiquantitativ ergab sich bezüglich der Detektion der Synucleine kein Unterschied zwischen  $\alpha$ S und den  $\alpha$ S-Punktmutationen. Es zeigten sich Banden, die den Mono-, Di-, Tri-, Tetra- und entsprechend höheren Oligomeren entsprachen. Darüber hinaus zeigte sich ein Erkennen von Aggregaten höheren Molekulargewichtes, die den Fibrillen entsprechen können. Bezüglich  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein konnte kein Signal detektiert werden. Für die trunkierten  $\alpha$ S-Abschnitte konnte lediglich für das synthetische Peptid  $\alpha$ S<sub>61-140</sub> ein Signal detektiert werden, das Aggregaten hohen Molekulargewichts entsprach. Für die weiteren  $\alpha$ -Synucleinabschnitte konnte dies analog zu den unter 3.2.3 gezeigten Daten nicht mit dem nAbs- $\alpha$ S nachgewiesen werden.

Somit war der nAbs- $\alpha$ S in der Lage Oligomere und höhere Aggregationsformen des  $\alpha$ S sowie seiner  $\alpha$ S-Punktmutationen zu erkennen. Aufgrund der weiteren Ergebnisse, die NAC-Region, den AS 61-95 entsprechend, zu binden, scheint diese in Analogie zu den obigen Daten für die Bindung des nAbs- $\alpha$ S an humanes  $\alpha$ S relevant zu sein.



**Abb. 10:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs-αS im Immunoblot gegen höher aggregierte Strukturen / Oligomere / Fibrillen von αS, βS, γS, der αS Peptidabschnitte αS<sub>1-60</sub>, αS<sub>1-95</sub>, αS<sub>61-140</sub>, αS<sub>96-140</sub> sowie der αS-Punktmutationen αS A30P, αS E46K und αS A53T

Darstellung von rekombinantem αS, βS, γS und den kürzeren αS-Peptidabschnitten entsprechend des dreiteiligen Aufbaus des αS (s. Abb. 3) sowie der ersten drei bekannten αS-Punktmutationen αS A30P, αS E36K und αS A53T im Immunoblot nach entsprechender Auftrennung in der SDS-PAGE bei 160mV und anschließendem Transfer auf eine Blotmembran im elektrischen Feld. Nach Ladungskontrolle mittels Memcode-Kit (hier nicht gezeigt) stellt sich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper die oben gezeigte Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

**A** zeigt den Immunoblot mittels nAbs-αS als Primärantikörper mit Nachweis von αS 5,0μg in seinen Monomer- und Oligomer-Formen. Für die αS Punktmutationen αS A30P, αS E36K und αS A53T gilt dies (bei geringerem Proteinauftrag von αS A30P) ebenso. Entsprechendes kann

### 3. Ergebnisse

---

für  $\beta$ S und  $\gamma$ S nicht gezeigt werden. Der nAbs- $\alpha$ S erkennt bei den kürzeren  $\alpha$ S-Peptidabschnitten lediglich höhere Aggregate von  $\alpha$ S 61–140 im Bereich der Geltasche analog zur Anreicherung in der Silber-Gel-Färbung wie in B gezeigt. B zeigt die entsprechende Silberfärbung des Gels nach PAGE mit analogem Aufbau zu A jedoch verlängerter PAGE-Laufzeit als detaillierte Ladungskontrolle mit Darstellung von Banden im Bereich der monomeren Peptidstrukturen aller aufgetragenen Peptide mit Ausnahme von  $\alpha$ S 96–140. Für  $\alpha$ S sowie die  $\alpha$ S-Punktmutationen  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E36K und  $\alpha$ S A53T zeigt sich die stufenweise Bildung höherer Peptidaggregate von Monomeren über Dimere bis hin zu höheren Oligomeren, z.T. in nur schwacher Ausprägung. Für  $\alpha$ S 61–140 zeigt sich v.a. eine Bildung fibrillärer Strukturen, die in der adaptierten, unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführten PAGE, nicht aufgegliedert wurden. Zur besseren Übersicht im Gel wurden die Taschen zwischen den Spalten 3 und 4 sowie 7 und 8 nicht geladen. Links von Spalte 1 befindet sich der mengenmäßig deutlich geringer eingesetzte und nicht gezeigte Standardgrößenmarker, der schematisch am rechten Rand der Abbildung nach MW in kDa ersatzweise aufgeführt ist.

**A** Immunoblot mit nAbs- $\alpha$ S    **B** Silber-Gel-Färbung

Spalte 1     $\alpha$ S 5.0 $\mu$ g  
Spalte 2     $\beta$ S 5.0 $\mu$ g  
Spalte 3     $\gamma$ S 5.0 $\mu$ g

**M** =  $\alpha$ S-Monomere ~14kDa  
**D** =  $\alpha$ S-Dimere ~28kDa  
**O** = Oligomere >28kDa

Spalte 4     $\alpha$ S 1–60 5.0 $\mu$ g  
Spalte 5     $\alpha$ S 1–95 5.0 $\mu$ g  
Spalte 6     $\alpha$ S 61–140 5.0 $\mu$ g  
Spalte 7     $\alpha$ S 96–140 5.0 $\mu$ g

Spalte 8     $\alpha$ S A30P 5.0 $\mu$ g  
Spalte 9     $\alpha$ S E46K 5.0 $\mu$ g  
Spalte 10     $\alpha$ S A53T 5.0 $\mu$ g

#### 3.3.3 Die Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot zur Differenzierung der nAbs- $\alpha$ S und der nAbs-A $\beta$

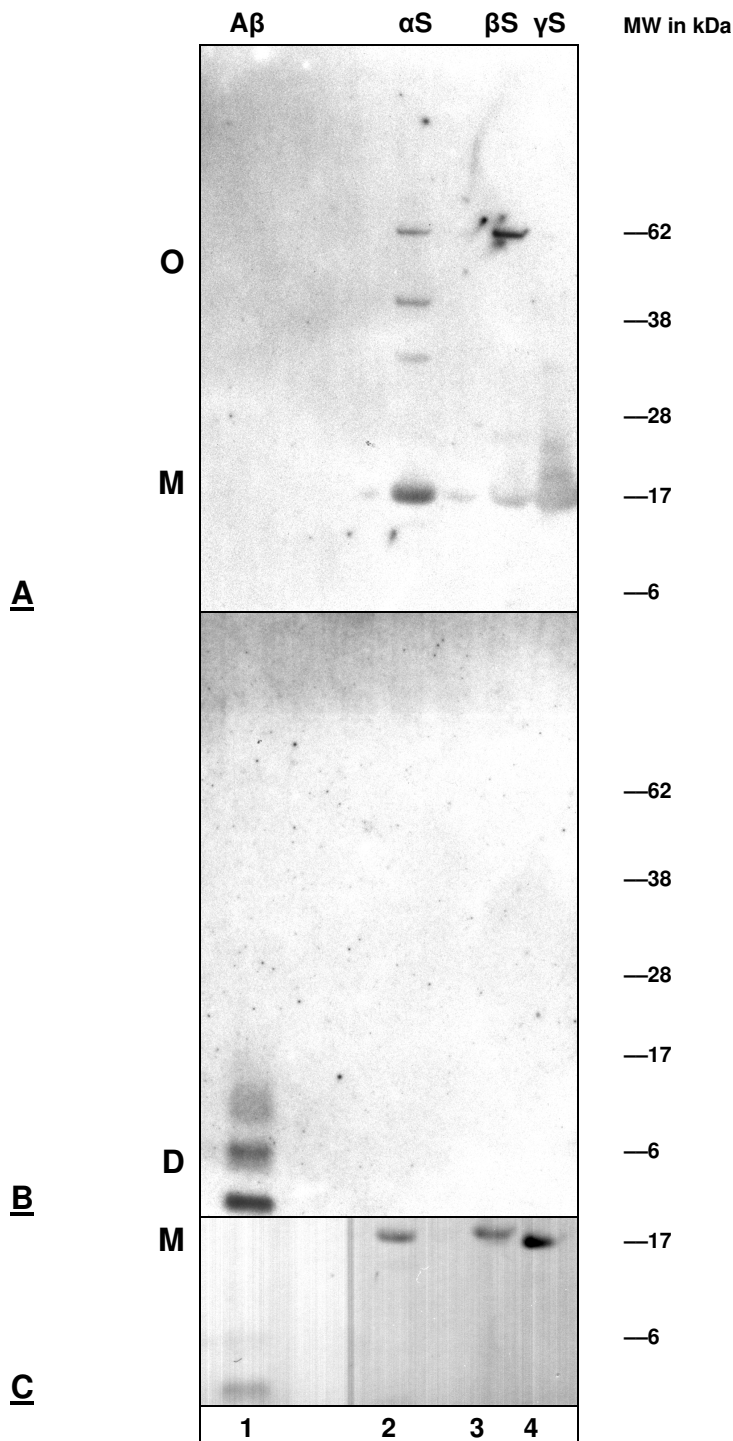
Den zwei führenden neurodegenerativen Erkrankungen sind amyloidbildende Proteine gemeinsam. Klinisch und neuropathologisch überschneiden sich die Charakteristika beider in der Demenz mit Lewykörpern (DLK) nicht zuletzt durch das NAC-Fragment des  $\alpha$ S (AS 60–95) in den amyloiden Plaques der DLK. Um eine Differenzierung der methodisch ähnlich isolierten nAbs sowohl gegen humanes Amyloid  $\beta$  (nAbs-A $\beta$ ) als auch  $\alpha$ S (nAbs- $\alpha$ S) zu ermöglichen, wurde der im Folgenden dargestellte Immunoblot durchgeführt.

Zur Differenzierung der Spezifität des isolierten nAbs- $\alpha$ S wurden nach Gelelektrophorese von Amyloid- $\beta$ -Spezies sowie  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Synuclein (je 0,5  $\mu$ g/Geltasche) Immunoblots mit dem jeweils aus humanem Serum bzw. kommerziellen Immunglobulinkonzentraten isolierten Autoantikörpers gegen humanes  $\alpha$ S (nAbs- $\alpha$ S) bzw. humanes A $\beta$  (nAbs-A $\beta$ ) untersucht.

Abb. 11 zeigt in A den Immunoblot mit dem nAbs- $\alpha$ S. Eine Detektion von  $\alpha$ S und  $\beta$ S konnte belegt werden. Dabei erkannte der nAbs- $\alpha$ S keine Monomere bzw. Oligomere von A $\beta$ . Eine schwache Bande von A $\beta$ -Fibrillen der A $\beta$ -Probe konnte nicht sicher detektiert werden. Demgegenüber war in B zu erkennen, dass der nAbs-A $\beta$  keine der Synuclein-Proteine detektierte. Weder  $\alpha$ S, noch  $\beta$ S oder  $\gamma$ S konnten markiert werden. Die einzelnen A $\beta$ -Proteine wurden vom nAbs-A $\beta$  in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung erkannt, wobei keine höheren Oligomerisierungsgrade bzw. Fibrillen nachzuweisen waren.

In Teilabbildung C ist die durchgeführte Ladungskontrolle mit dem Memcode-Kit abgebildet. Eine gleichmäßige, semiquantitative Proteinladung zwischen  $\alpha$ S und den einzelnen Oligopeptiden des A $\beta$  konnte bei ausbleibender Bildung von Proteinaggregaten mit hohem Molekulargewicht belegt werden.

Die methodisch ähnlich isolierten natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen die jeweiligen Peptide detektierten demnach unterschiedliche Epitope. Der nAbs- $\alpha$ S erkannte die Synucleine wie bereits zuvor beschrieben, während der nAbs-A $\beta$  die A $\beta$ -Peptide detektierte.



**Abb. 11:** Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. nAbs-A $\beta$  im Immunoblot gegen  $\alpha$ S,  $\beta$ S,  $\gamma$ S und A $\beta$

Darstellung von rekombinantem  $\alpha$ S,  $\beta$ S und  $\gamma$ S sowie A $\beta$  im Immunoblot nach entsprechender Auftrennung in der PAGE bei 160mV und anschließendem Transfer auf eine Blotmembran im elektrischen Feld. Nach Ladungskontrolle mittels Memcode-Kit stellt sich nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper die oben gezeigte Antigen-Antikörper-Interaktion dar.

**A** zeigt den Immunoblot mittels nAbs- $\alpha$ S als Primärantikörper mit Nachweis von  $\alpha$ S mit 0,5 $\mu$ g in seiner Monomer-, Tri- und Tetramer-Form. Der nAbs- $\alpha$ S erkennt bei  $\beta$ S lediglich eine höher aggregierte Form a.e. Tetramere bei fehlender Detektion von  $\gamma$ S. Ein Nachweis von A $\beta$  kann mit dem nAbs- $\alpha$ S nicht geführt werden. **B** zeigt den Immunoblot mittels nAbs-A $\beta$  mit Nachweis des mengenmäßig deutlich geringer eingesetzten A $\beta$  (0,1 $\mu$ g) a.e. in Monomer- und Dimer-Form

### 3. Ergebnisse

---

ohne Detektion von  $\alpha$ S,  $\beta$ S oder  $\gamma$ S. **C** zeigt die Ladungskontrolle mittels Memcode mit semiquantitativer Verdeutlichung der unterschiedlichen Peptidmengen von A $\beta$  und der Synucleine. Zur besseren Übersicht im Gel wurden die Taschen zwischen den Spalten 1 und 2 sowie 2 und 3 nicht geladen. Der mengenmäßig deutlich geringer eingesetzte Standardgrößenmarker ist nicht gezeigt, wird jedoch schematisch am rechten Rand der Abbildung nach MW in kDa ersatzweise aufgeführt.

**A** Immunoblot mit nAbs- $\alpha$ S   **B** Immunoblot mit nAbs-A $\beta$    **C** Memcode

Spalte 1   **A $\beta$**  0.1 $\mu$ g

Spalte 2    **$\alpha$ S** 0.5 $\mu$ g

Spalte 3    **$\beta$ S** 0.5 $\mu$ g

Spalte 4    **$\gamma$ S** 0.5 $\mu$ g

**M** = Monomere der Synucleine

**D** = Dimere A $\beta$

**O** = Oligomere



### 3. Ergebnisse

Zielpeptid	MAK- $\alpha$ S	nAbs- $\alpha$ S anti-alpha-Synuclein			nAbs-A $\beta$ anti-Amyloid $\beta$	
	Positiv- Kontrolle	M	O	F	M	O
$\alpha$ S	++	++	+++	+++	–	–
$\beta$ S	–	–	+	–	–	–
$\gamma$ S	–	–	–	–	–	–
$\alpha$ S A30P	++	++	+++	+++	n.u.	n.u.
$\alpha$ S E46K	++	++	+++	+++	n.u.	n.u.
$\alpha$ S A53T	++	++	+++	+++	n.u.	n.u.
$\alpha$ S <sub>1–60</sub>	–	–			n.u.	n.u.
$\alpha$ S <sub>1–95</sub>	–	–	+		n.u.	n.u.
$\alpha$ S <sub>61–140</sub>	+	+	–	+	n.u.	n.u.
$\alpha$ S <sub>96–140</sub>	–	–	–	–	n.u.	n.u.
A $\beta$ <sub>1–40</sub>	–	–	–	–	++	(+)

**Tab. 9:** Die Ergebnisse im Immunoblot im Überblick

Die Tabelle zeigt im Überblick die Ergebnisse der Immunoblots. In der linken Spalte finden sich die untersuchten Peptide, Spalte zwei zeigt die Ergebnisse der Positivkontrolle mit dem monoklonalen Antikörper gegen humanes alpha-Synuclein, kurz MAK- $\alpha$ S. Dem folgend sind die Ergebnisse der Versuche mit dem nAbs- $\alpha$ S bzw. dem nAbs-A $\beta$  aufgeführt.

(M = Monomer, O = Oligomer, F = Fibrillen)

(n.u. = nicht untersucht)

## 4. DISKUSSION

Einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen ist der Nachweis unlöslicher Proteinablagerungen gemeinsam. Die auf immunhistologischen und genetischen Analysen beruhenden Nachweise haben schließlich zur Identifikation der Hauptkomponenten dieser Einschlüsse und zum Konzept der Proteinopathien geführt. So legen die Synucleinopathien und die Amyloidopathien einen kausalen Zusammenhang zwischen Proteinaggregation, -ablagerung und neuronalem Zelltod nahe.

Der wissenschaftliche Fokus im Bereich der Parkinson Syndrome lag in den vergangenen Jahren vermehrt auf dem aus 140 Aminosäuren bestehenden Protein  $\alpha$ S, das mit der Bildung fibrillärer Strukturen von Monomeren ausgehend, über Oligomere und Protofibrillen eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie bei den LB-assoziierten Erkrankungen darstellt. Es ist aufgrund der Häufigkeit der Synucleinopathien von besonderem Interesse, verlässliche Methoden für die Diagnostik und Therapie zu entwickeln, um diese Proteinablagerungen detektieren, einzuordnen und ggf. therapeutische Optionen ableiten zu können.

### 4.1 Die histopathologischen Untersuchungen

Die initial durch Papachroni und Kollegen erstmalig 2007 beschriebenen natürlich vorkommenden Autoantikörper gegen humanes  $\alpha$ S (nAbs- $\alpha$ S) konnten in dieser Arbeit aus Einzelspenderseren bzw. IVIG gewonnen und erstmals in immunhistochemischen Untersuchungen diverser Gewebe in unterschiedlichen Fixierungen eingesetzt werden [Papachroni et al. 2007].

Immunhistochemisch konnte in dieser Arbeit die zelluläre Lokalisation der Bindungspartner des nAbs- $\alpha$ S in der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, in Gewebeproben aus dem gewählten transgenen  $\alpha$ S Tiermodell (Thy1)-h[A30P] sowie in humanen Gewebeproben von PS-, DLK- und AD-Patienten gezeigt werden. Eine Korrelation mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern (MAK- $\alpha$ S) belegte die Spezifität der eingesetzten nAbs- $\alpha$ S bezüglich der relevanten Aggregate.

In der Zellkultur teilt die humane Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y zahlreiche Charakteristika der dopaminergen Neuronen wie die Synthese des Neurotransmitters Dopamin und deren Differenzierung in einen neuronalen Phänotyp. Die SH-SY5Y-Klone bieten die Möglichkeit, hohe Spiegel an

$\alpha$ S zu produzieren und stellen eine gute Option dar, die  $\alpha$ S-nAbs- $\alpha$ S-Interaktion in der Zellkultur zu untersuchen. Leng und Kollegen konnten in ihren Untersuchungen mit der beschriebenen Zelllinie  $\alpha$ S-Proteinvorstufen nachweisen. Demnach sind zellulär physiologischerweise  $\alpha$ S-Peptide als lösliches Monomer und in lipidgebundener, höher aggregierter oligomerer Form belegbar [Leng et al. 2001]. Vamvaca und Kollegen konnten den Nachweis des  $\alpha$ S vor allem im Zytosol der Zelle bestätigen [Vamvaca et al. 2011].

Unsere Daten zeigten, dass die nAbs- $\alpha$ S-Färbung im Vergleich zum kommerziell erhältlichen und in der Immunhistochemie verwendbaren MAK- $\alpha$ S gleichermaßen eine ausgeprägte zytoplasmatische, spezifische Detektion des  $\alpha$ S belegte. Sowohl die Immunfluoreszenzdarstellung als auch die Färbung in Paraffin eingebetteter Zellen präsentierten eine zum MAK- $\alpha$ S vergleichbare Detektionsfähigkeit. Die punktförmigen Präzipitate in der IF des nAbs- $\alpha$ S waren am ehesten als unspezifische Präzipitate zu werten. Nach Wakabayashi und Mitarbeitern entspricht die gezeigte diffuse zytoplasmatische Färbung der Entwicklung der LB mit zunehmender Intensität der  $\alpha$ S-Färbung, die mit der Dichte des  $\alpha$ S korreliert und von einer schwachen Färbung über sog. *pale-bodies* in kompakten  $\alpha$ S-Filamenten mit der Bildung der LB mündet [Wakabayashi et al. 1998].

Der isolierte nAbs- $\alpha$ S vermag sowohl in der IF als auch in den in Paraffin eingebetteten Zellen eine spezifische Detektion des  $\alpha$ S, so dass ein Einsatz in weiterführenden Untersuchungen z.B. in der Frühdiagnostik der Synucleinopathien vorstellbar ist.

Um die in vitro gewonnenen Daten auf ihre biologische Relevanz zu testen, wurden weiter diverse Tiermodelle etabliert. So wurden unter der Annahme, dass Veränderungen im  $\alpha$ S-Proteinumsatz kausal für die Neurodegeneration sind, Tiermodelle entwickelt, die versuchen den Metabolismus, die Bildung der Proteinaggregate bzw. deren Neurotoxizität zu beleuchten. Dabei konnte in vitro gezeigt werden, dass die Bildung unlöslicher fibrillärer Aggregate durch die  $\alpha$ S A53T-Punktmutation im  $\alpha$ S-Gen deutlich, durch die  $\alpha$ S A30P-Punktmutation leicht gesteigert werden kann [Narhi et al. 1999]. Conway und Kollegen lieferten zudem Daten für eine Oligomerisierungshypothese in Zusammenhang mit den beschriebenen Punktmutationen des  $\alpha$ S ( $\alpha$ S A53T sowie  $\alpha$ S A30P); die mit der  $\alpha$ S A30P-Punktmutation assoziierten PS scheinen eine Oligomerisierung des  $\alpha$ S zu forcieren und zeigen möglicherweise Vorstufen der höheren Aggregate in den eingesetzten Geweben [Conway et al. 2000]. In Anlehnung an die bei familiären PS gefundene Punktmutation  $\alpha$ S A30P wurde das durch den Neuronen-spezifischen Promotor Thy1 getriggerte (Thy-1)<sub>h</sub>-[A30P]- $\alpha$ S-Mausmodell entworfen. Das homozygote transgene Tier

zeigte in diesem Modell eine bis zu zweifache Erhöhung des endogen vorhandenen  $\alpha$ S. Das für unsere Untersuchungen gewählte Tiermodell kennzeichnet sich vor allem durch den beschreibbaren Zusammenhang zwischen Verhaltensveränderung, detektierbarer Fibrillenbildung und der folgenden Neurodegeneration. Es stellt den Versuch dar, die klinische Ausprägung mit der Synucleinaggregation in Einklang zu bringen. So lässt sich bereits im jungen Tier der (Thy1)-h[A30P]- $\alpha$ S transgenen Maus eine zunehmende Bildung höherer  $\alpha$ S-Aggregate im Immunoblot analog zu den hier gezeigten Immunoblots belegen [Kahle et al. 2000; Kahle et al. 2001].

Histologisch zeigt das (Thy1)-h[A30P]- $\alpha$ S transgene Tiermodell (Maus) auf zellulärer Ebene eine somatodendritische Anhäufung des  $\alpha$ S bei Nachweis von Thioflavin-positiven fibrillären Einschlüssen, die sich im Verhalten der tg-Tiere mit zunehmendem Alter durch einen fortschreitenden kognitiven und lokomotorischen Abbau niederschlagen [Freichel et al. 2007]. Diese fibrillären  $\alpha$ S-Ablagerungen konnten in unseren Thioflavin-Färbungen bestätigt werden. Im Vergleich zum MAK- $\alpha$ S konnte der isolierte nAbs- $\alpha$ S eine spezifische Detektion des  $\alpha$ S in den Nervenzellen der SN des transgenen Mausmodells führen. Allerdings war eine deutliche, unspezifische Hintergrundfärbung beim nAbs- $\alpha$ S zu verzeichnen. Dies kann für das Erkennen mehrerer Epitope bzw. Konformationen des  $\alpha$ S durch den polyklonalen nAbs- $\alpha$ S sprechen. Alternativ muss ein Problem mit dem Blocken unspezifischer Bindungen in der Probenverarbeitung diskutiert werden. Dies kann ebenfalls zu einer deutlichen unspezifischen Hintergrundfärbung führen. Gegen diese Annahme spricht jedoch vor allem die klare Detektion der LB durch den nAbs- $\alpha$ S, wie dies vergleichbar durch den MAK- $\alpha$ S geschieht. Der nAbs- $\alpha$ S erfüllte demnach auch in Paraffin eingebetteten Gewebeproben seine Aufgabe.

111 Jahre nach Erstbeschreibung der LB in humanen Gehirnproben ist deren Funktion im Zuge der Neurodegeneration weitgehend ungeklärt. So finden sich in PS, DLK und AD zahlreiche klinische, biochemische und morphologische Überschneidungen, die einen Zusammenhang der LB-Formation mit der AD-Pathologie nahelegen [McKeith et al. 2005]. AD und PS sind neuropathologisch durch ihre Proteinaggregate charakterisiert und finden unter anderem in der DLK überlappende klinische Symptome und neuropathologische Korrelate mit Nachweis amyloider Plaques, neurofibrillärer Tangles sowie kortikaler LB. Insbesondere der zentrale Anteil des  $\alpha$ S, die sogenannte NAC-Domäne findet sich in den senilen Plaques aufgearbeiteter DLK-Fälle wieder [Yokota et al. 2002; McKeith et al. 2003; McKeith et al. 2005]. In diesem Zusammenhang stellt sich neben der möglichen Rolle der Interaktion der Proteine zur Aggregatbildung bei der DLK auch die Frage der

Detektionsfähigkeit der in dieser Arbeit beschriebenen nAbs- $\alpha$ S bzw. der möglichen Differenzierung der Proteine  $\alpha$ S und A $\beta$ .  $\alpha$ S seinerseits bildet abhängig vom zellulären Milieu unterschiedliche Strukturen aus, wobei neben der ungefalteten nativ-Konformation, der  $\alpha$ -helikalen membranassoziierten Struktur, vor allem die  $\beta$ -Faltblattstruktur der aggregierten Form von Interesse erscheint. Die membrangebundene Form stellt nur einen Bruchteil der gesamten  $\alpha$ S-Menge im humanen Gehirn dar, spielt jedoch eine Rolle bei der Bildung der Proteinaggregation [Lee et al. 2002].

Es ist im Hinblick auf den weiteren Einsatz des nAbs- $\alpha$ S von großer Bedeutung, dessen Spezifität für  $\alpha$ S im Vergleich zu A $\beta$  zu untersuchen und Unterschiede in der Detektionsfähigkeit und damit im möglichen späteren Einsatz für die entsprechenden klinischen Krankheitsentitäten zu finden.

*Tab. 10: Die histopathologischen Eigenschaften von AD, DLK und PS im Überblick (adaptiert nach [McKeith et al. 2003])*

	<b>AD</b>	<b>DLK</b>	<b>PS</b>
<b>Neuropathologie</b>			
Senile Plaque-Dichte	+++	++	–
Tangle-Dichte	+++	++	–
Subkortikale LB	–	++	+++
Kortikale LB	–	+++	+

In den uns vorliegenden humanen Hirngewebeproben erkannten die nAbs- $\alpha$ S sowohl LB als auch LN bei Nachweis einer ausgeprägten Hintergrundfärbung. Möglicherweise erkennen die nAbs- $\alpha$ S nicht nur die LB/LN, die als Endstrecke der Erkrankung gelten, sondern sind in der Lage Vorläuferproteine bzw. Aggregationsstufen des  $\alpha$ S im Sinne von Oligomeren/Protofibrillen zu detektieren, die möglicherweise Korrelat eines früheren Krankheitsstadiums darstellen. Die Abläufe zur Formation der höheren Aggregationsstufen des  $\alpha$ S, insbesondere der Fibrillen, sind weitgehend bekannt. Konformationsänderungen der monomeren  $\alpha$ S-Proteine führen über die Bildung von Oligomeren zu Protofibrillen. Eine Aneinanderlagerung selbiger führt zu einer Größenzunahme und der Aggregationsprozess resultiert in der Ablagerung unlöslicher Fibrillen, die in der Bildung der charakteristischen LB münden [Uversky et al. 2001].

Dabei spielt die zentrale Region, der 35 AS umfassende NAC-Teil des  $\alpha$ S eine besondere Rolle. Diese Komponente selbst besitzt amyloidogene

Eigenschaften und vermag selbständig Fibrillen zu bilden [Giasson et al. 2001]. Die Verbindung dieses  $\alpha$ S-Peptidteils zur A $\beta$ -Pathologie bei der AD liegt in der initialen Entdeckung dieses Peptides innerhalb von amyloiden Plaques in menschlichen Gehirnen, das treffend als *Nicht-Amyloid-Beta-Komponente* (engl. *non-amyloid  $\beta$  component* = NAC) bezeichnet wurde [Ueda et al. 1993]. Werden die Primärsequenzen des  $\alpha$ S, insbesondere in der NAC-Region verglichen, zeigen sich Parallelen zwischen den Aminosäuren 66–73 des  $\alpha$ S (VGGAVVTG) und dem Bereich zwischen den Aminosäuren 36–42 des A $\beta$ -Peptids (VGGVVIA) [Tofaris et al. 2005]. Ein Interaktionsnachweis zwischen  $\alpha$ S und A $\beta$  innerhalb der amyloiden Plaques konnte zudem experimentell gezeigt werden. Basierend auf Studien mit doppelt transgenen Mäusen für  $\alpha$ S und A $\beta$  konnten Masliah und Kollegen die unterschiedliche Interaktion von A $\beta$ <sub>40</sub> bzw. A $\beta$ <sub>42</sub> mit  $\alpha$ S zeigen [Masliah et al. 2001]. Die zweifach transgenen Tiere zeigten morphologische Veränderungen, die der LB-Variante der AD entsprachen. Es wurde postuliert, dass A $\beta$  die Aggregation von  $\alpha$ S und die  $\alpha$ S-assoziierte Pathologie exazerbiert.

Das aus 39–43 AS bestehende A $\beta$ -Peptid mit seiner Neigung zur Bildung einer  $\beta$ -Faltblattstruktur und folglich extrazellulärer Proteinhäufung ist als zentrale Komponente der amyloiden Plaques anzusehen [Masters et al. 1985]. Die Funktion der löslichen A $\beta$ -Peptide in Form des Monomers ist bislang nicht vollständig bekannt, wobei die Neurotoxizität der oligomeren A $\beta$ -Konformationen belegt ist. Sowohl A $\beta$ <sub>40</sub>, das den größten Anteil in Plasma und Liquor darstellt, als auch das nur in deutlich geringerer Menge sezernierte A $\beta$ <sub>42</sub> [Selkoe 1999], lassen sich membranassoziiert [Shao et al. 1999; Mandal et al. 2004] und in senilen Plaques nachweisen [Dickson 1997]. A $\beta$ <sub>42</sub> wird dabei aufgrund seiner hohen Selbstaggregationstendenz als Faktor für die Bildung des amyloiden Kernkonstruktes angesehen [Jarret et al. 1993].

Histopathologische Untersuchungen belegen, dass die LB-Bildung häufig mit Plaquelagerungen von A $\beta$ -Protein kolokalisiert ist [Galpern et al. 2006]. So findet sich bei an AD erkrankten Personen in der Autopsie in bis zu 50%, in der alterskorrigierten Kontrollgruppe bei bis zu 30% eine begleitende LB-Pathologie [Jellinger 2004]. Kotzbauer und Kollegen bestätigen diese Größenordnung und Kolokalisation von  $\alpha$ S und A $\beta$  in den Autopsien klinisch gesicherter Demenzerkrankter [Kotzbauer et al. 2012].

In der Literatur lassen sich Nachweise mit vermehrten  $\alpha$ S-Aggregaten in Gewebeproben von DLK-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe finden. Paleologou und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Level von löslichem, oligomerem  $\alpha$ S aus postmortem Hirnproben im eingesetzten

ELISA im Vergleich zu AD und einer Kontrollgruppe um bis zu 1,5fach signifikant höher waren [Paleologou et al. 2009]. Ein Korrelat des klinischen Schweregrads des dementiellen Syndroms bzw. zur Erkrankungsdauer stellte die Ausprägung der LB-Pathologie bei der DLK bisher jedoch nicht dar, was den Stellenwert der LB-Quantität in den Hintergrund und die Bildung selbiger in den Fokus rückt [Harding et al. 2001].

In den hier gezeigten Untersuchungen vermochte der nAbs- $\alpha$ S eine Detektion der LB und LN bei den PS- und DLK-Hirnschnitten in Analogie zum MAK- $\alpha$ S darzustellen. Dies entspricht in Form und Lokalisation sowohl beim MAK- $\alpha$ S als auch beim nAbs- $\alpha$ S den zu erwartenden Ergebnissen aus der Literatur. Die Darstellung der neuritischen Plaques bei der AD gelang zudem mit dem nAbs- $\alpha$ S. Demgegenüber konnte der MAK- $\alpha$ S die neuritischen Plaques bei AD nicht anfärben. Dies spricht aus unserer Sicht am ehesten für ein epitopspezifisches Erkennen des MAK- $\alpha$ S im C-Terminalen Teil des  $\alpha$ S (AS 121–125), das eine Detektion der amyloiden Plaques beim AD-Hirnschnitt nicht ermöglicht. Der nAbs- $\alpha$ S ist jedoch in der Lage, die höheren Aggregate zu erkennen, so dass vom Erkennen einer bestimmten Konformation auszugehen ist, die durch Zusammenlagerung der einzelnen Peptide entsteht. Sowohl Oligomere als auch Protofibrillen müssen demnach in den hier gezeigten immunhistochemischen Untersuchungen (im transgenen  $\alpha$ S Tiermodell / in den humanen Gewebeproben) nachweisbar sein, ohne dass aufgrund der Polyklonalität des isolierten nAbs- $\alpha$ S in diesem Stadium der Untersuchungen eine Differenzierung der einzelnen  $\alpha$ S-Proteine stattfinden kann.

In den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen zeigten sich gewisse Limitationen. Zum einen waren mit den gezeigten Daten keine spezifische intrazelluläre Verteilung des  $\alpha$ S bzw. die unterschiedlichen Entwicklungsstufen der LB-Formation zu belegen. Inwiefern der nAbs- $\alpha$ S es vermag spezifisch die unterschiedlichen Konformation des  $\alpha$ S i.S. der Monomere, Oligomere, Protofibrillen oder gar der letztendlichen LB als Proteinaggregate zu erkennen und zu unterscheiden, bleibt in unserer immunhistochemischen Untersuchung offen. Weiter sind Gegenfärbungen, wie oben geschildert, mit dem nAbs-A $\beta$  zu fordern, um die Spezifität des isolierten nAbs- $\alpha$ S besser klassifizieren zu können. Versuche an weiteren Zelllinien bzw. die Anfärbung weiterer Gewebeproben aus den zur Verfügung stehenden Tiermodellen vermögen ggf. weitere Klarheit verschaffen. Quantitative Analysen biologischer Proben aus dem transgenen Tiermodell (Hirnextraktionen) oder von Liquorproben (CSF) / peripherem Blut, z.B. durch ELISA, sind weiter denkbar.

Um dies näher einordnen zu können, folgten schließlich Experimente im Immunoblot, um das Detektionsvermögen der nAbs- $\alpha$ S hinsichtlich der zu erkennenden Proteingrößen und Proteinarten zu bestimmen.

### **4.2 Die Charakterisierung der Antigen-Antikörper-Interaktion der nAbs im Immunoblot**

Zur weiteren Charakterisierung des Bindungsverhaltens des nAbs- $\alpha$ S erfolgten nähere Untersuchungen der Antigen-Antikörper-Interaktion im Immunoblot. Um ein mögliches Epitop, das der nAbs- $\alpha$ S erkennen kann, näher einzuordnen, wurden unmittelbar strukturverwandte Peptide im Immunoblot eingesetzt. Die aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeit bekannten Synucleine  $\beta$ S und  $\gamma$ S unterscheiden sich im Wesentlichen in ihrer Länge vom humanen  $\alpha$ S.

Den Arbeiten von Jakes und Kollegen ist es zu verdanken, dass mittels Antikörperdetektion zwei Proteine, die gegen filamentäre Strukturen in humanen Gehirnen von an AD Erkrankten gerichtet waren, erkannt wurden [Jakes et al. 1994]. Im weiteren Verlauf reifte die Erkenntnis, dass  $\alpha$ S dem NAC-Vorläuferprotein entsprach und Ähnlichkeit zu dem bereits aus dem Nagetiermodell isolierten  $\beta$ S besteht [Tobe et al. 1992]. Während es sich bei humanem  $\beta$ S ( $\beta$ S = Phosphoneuroprotein 14) um ein aus 134 AS bestehendes neuronales Protein handelt, das in seiner Primärstruktur bis zu 78% dem  $\alpha$ S entspricht und vor allem im Gehirn exprimiert wird, fehlt diesem insbesondere in der zentralen NAC-Region ein 11 AS umfassender Abschnitt (AS 73–83) bei großer Strukturähnlichkeit im C-Terminus [Shibayama-Imazu et al. 1993; Jakes et al. 1994; Goedert 2001]. Dementsprechend konnte eine Aggregation und Detektion höherer Aggregate des  $\beta$ S durch den nAbs- $\alpha$ S nicht in unseren Untersuchungen gezeigt werden.

Das weiter eingesetzte humane  $\gamma$ S ( $\gamma$ S = engl. *breast cancer-specific gene 1*) aus der Familie der Synucleine besteht aus 127 AS. Das Protein teilt ca. 60% seiner Primärsequenz mit  $\alpha$ S und ist ebenfalls im neuronalen Zytoplasma nachweisbar. Strukturell fehlt bei  $\gamma$ S im Vergleich zu  $\alpha$ S und  $\beta$ S der tyrosinreiche C-terminale Teil [Buchman et al. 1998].

Aggregationsstudien konnten belegen, dass der Zusammenschluss von  $\alpha$ S den Mechanismen der keiminduzierten Aggregation folgt, bei der die initiale Keimbildung („*seeding*“) den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt markiert [Wood et al. 1999]. Während dieses Prozesses können intermediäre Zwischenstufen auftreten, die einen erhöhten Anteil an  $\beta$ -Faltblattstruktur und



eine größere Neigung zur Fibrillenbildung aufweisen [Uversky et al. 2001]. In unseren Untersuchungen war es daher nötig, zwischen den einzelnen  $\alpha$ S-Spezies zu unterscheiden, um einen möglichen Zusammenhang der nAbs- $\alpha$ S in der Entstehung der LB zu untersuchen.

Der nAbs- $\alpha$ S erkannte humanes  $\alpha$ S in seiner monomeren Form (MW ca. 14kD) in absteigender Konzentration im Vergleich zum MAK- $\alpha$ S sicher. Darüber hinaus waren deutlich oligomere Formen, insbesondere Di-, Tri- und Tetramere (MW ca. 28kDa, 42kDa, 56kDa) nachzuweisen. Weiter scheinen höhere Aggregate des  $\alpha$ S erkannt zu werden, obwohl die Proteinkonzentration diesbezüglich im Vergleich zu der aufgetragenen, monomeren Proteinmenge deutlich geringer war. Im Vergleich hierzu war keine spezifische Färbung der  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Synucleine im Monomerbereich nachzuweisen, was für ein spezifisches Erkennen des  $\alpha$ S spricht. In Anbetracht der guten Darstellung der höheren Aggregate des  $\alpha$ S scheint die Bildung selbiger für das entsprechende Epitop des nAbs- $\alpha$ S wichtig zu sein. Im Vergleich zum MAK- $\alpha$ S ergeben sich Detektionsunterschiede, die für ein Erkennen eines bestimmten Konformationszustandes des  $\alpha$ S durch den nAbs- $\alpha$ S sprechen, der evtl. das durch den MAK- $\alpha$ S zu erkennende Epitop maskieren könnte. Daher erkennt der MAK- $\alpha$ S möglicherweise keine  $\alpha$ S Oligomere. Dieser Befund zeigt sich konstant in allen Positiv-Kontrollen unserer Immunoblots.

Vergleicht man, wie oben aufgeführt, die Primärsequenzen des humanen  $\alpha$ S mit  $\beta$ S und  $\gamma$ S, so fehlt vor allem  $\beta$ S der zentrale Anteil, die für die Aggregation relevante sog. *NAC-Domäne*. Dem  $\gamma$ S fehlt der entsprechende negativ geladene C-terminale Teil, der für die Konformationsveränderungen wichtig scheint.  $\beta$ S und  $\gamma$ S fehlen zudem innerhalb der charakteristischen Ablagerungen, den LB [Spillantini et al. 1998]. Funktionell zeigen experimentelle Daten, dass  $\beta$ S und  $\gamma$ S die  $\alpha$ S-Fibrillation zudem behindern können [Uversky et al. 2002].

Es ist zu diskutieren, dass dies auf die hydrophobe NAC-Domäne, die allein nur innerhalb des  $\alpha$ S zu finden ist, zurückgeführt werden kann. Entfernt man die NAC-Domäne aus der  $\alpha$ S-Primärstruktur oder tauscht hydrophobe gegen hydrophile Aminosäuren aus, so verliert sich die amyloidogene Eigenschaft. Isoliert man die NAC-Domäne einzeln, ist diese in der Lage Fibrillen zu bilden bzw. die Fibrillenbildung des vollständigen  $\alpha$ S-Proteins zu fördern [Giasson et al. 2001]. Dies spiegelte sich in den gezeigten Immunoblots hier wider. Während  $\alpha$ S unter den Untersuchungsbedingungen in begrenztem Maß ohne explizite Provokation Oligomere bildete, konnte dies für die weiteren Synucleine nicht nachgewiesen werden.

Auf der einen Seite scheint die Bildung höherer Aggregate einen Teil der Detektionsfähigkeit des nAbs- $\alpha$ S zu beeinflussen, zum anderen bleibt das zu erkennende Epitop noch unklar, so dass weitere Untersuchungen nötig wurden. Es war naheliegend weitere Strukturverwandte des  $\alpha$ S zu untersuchen.

Zu den aggregationsfördernden Faktoren zählen neben den drei erstbeschriebenen und hier eingesetzten Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen (SNCA) der seltenen autosomal-dominanten Formen der PS ( $\alpha$ S A53T /  $\alpha$ S A30P /  $\alpha$ S E46K) [Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998; Zarranz et al. 2004] die Duplikation bzw. Triplikation des  $\alpha$ S-Gens mit einer möglicherweise erhöhten  $\alpha$ S Proteinkonzentration und folglich Anreicherung [Chartier-Harlin et al. 2004; Singleton et al. 2003]. Weiter zeigen Polymorphismen des  $\alpha$ S-Gens eine erhöhte Proteinexpression ähnlich den Genmultiplikationen [Fuchs et al. 2008; Mata et al. 2010]. Es ist anzunehmen, dass hohe Mengen endogenes  $\alpha$ S unabhängig von ihrer Konformation zu einer Proteinaggregation und folglich Neurotoxizität führen.

Die entsprechend im Immunoblot als Antigen eingesetzten Proteine haben ihre Punktmutationen alle im N-terminalen Teil, der vor allem für die membranassoziierte Helixbildung verantwortlich gemacht wird. Unter der Annahme einer Konformationsspezifität sollten sich ähnliche Detektionseigenschaften des nAbs- $\alpha$ S gegenüber der  $\alpha$ S Punktmutationen im Vergleich zum  $\alpha$ S ergeben. Es zeigte sich in unseren Daten konstant, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war, humanes  $\alpha$ S zu erkennen. Darüber hinaus waren in allen dargestellten Reihen ( $\alpha$ S,  $\alpha$ S A30P,  $\alpha$ S E46K,  $\alpha$ S A53T) die oligomeren Formen deutlicher, insbesondere die Tri- und Tetramere (MW ca. 42kDa, 56kDa) ohne Unterschiede zwischen den einzelnen eingesetzten Punktmutationspeptiden nachzuweisen. Die Positivkontrolle mit dem spezifischen MAK- $\alpha$ S (Epitop AS 121–125) bestätigte die gezeigten Voruntersuchungen erneut. Zwischen den im Immunoblot aufgetragenen  $\alpha$ S Punktmutationen und dem  $\alpha$ S ist kein Unterschied im konzentrationsabhängigen Bindungsverhalten zu bestätigen. Demnach sind die Veränderungen der Aminosäuresequenz im N-Terminalen Teil des  $\alpha$ S nicht für die Antigen-nAbs- $\alpha$ S-Interaktion von Bedeutung. Die aggregationsfördernde Wirkung der  $\alpha$ S Punktmutationen bestätigte sich wie in der Literatur bereits angegeben. Es zeigten sich trotz gering eingesetzter Proteinmenge reproduzierbare, aufgrund ihres Molekulargewichtes den Oligomeren entsprechende Banden, die durch den nAbs- $\alpha$ S detektiert wurden.

Es war weiter nachvollziehbar, die einzelnen Strukturabschnitte des  $\alpha$ S im Immunoblot näher zu untersuchen, nachdem die bisherigen strukturver-

wandten Peptide keine einschränkende Einordnung eines Epitops zeigen konnten. Mittels kommerziell erhältlicher Peptide wurde das  $\alpha$ S in unseren Untersuchungen in seine drei einzelnen Bestandteile mit entsprechend überlappenden Arealen unterteilt. Neben dem isolierten Einsatz des N-Terminus (AS 1–60) des  $\alpha$ S und des C-Terminus (AS 96–140) des  $\alpha$ S wurden die trunkierten Peptide jeweils in Kombination mit der zentralen NAC-Domäne eingesetzt. Auf einen isolierten Einsatz der NAC-Domäne wurde aufgrund der bereits bekannten Spontanaggregation verzichtet.

Es zeigte sich in den Immunoblots reproduzierbar, dass der nAbs- $\alpha$ S zwingend auf die NAC-Domäne angewiesen war. Hier stellten sich nach Antigen-Detektion mit dem nAbs- $\alpha$ S vor allem die höher aggregierten  $\alpha$ S-Spezies, wenn auch in verkürzter Form, dar. Vergleicht man die eingesetzten Proteinmengen, so zeigte sich nur bei der NAC + C-Terminus-Variante (AS 61–140) eine schwache Detektion eines Mono- bzw. Dimers. Interessanterweise werden die hoch aggregierten Formen, wie sie in der Tasche des Gels zu finden sind, erkannt. In der Schlussfolgerung kann in Analogie zu den oben gezeigten Daten, eine Konformationsspezifität des nAbs- $\alpha$ S postuliert werden. Niedermolekulare Strukturen oder gar ein isoliertes Erkennen des C- oder N-Terminus können, soweit in dieser Methode beurteilbar, ausgeschlossen werden.

Wiederholt konnte belegt werden, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage war, humanes  $\alpha$ S zu detektieren, während für die  $\alpha$ S Peptidsequenzen AS 1–60 und AS 96–140 keinerlei Bindungsinteraktion nachweisbar war. Korrekterweise ist die Untersuchung den C-Terminalen  $\alpha$ S-Teil betreffend kritisch zu hinterfragen. Die aufgeführte Ladungskontrolle konnte keinen Nachweis einer Proteinmenge führen. Zudem zeigte der spezifische MAK- $\alpha$ S, der das Epitop AS 121–125 erkennt, keine Färbung, obwohl dies möglich sein sollte. Neben einer unzureichenden Proteinvorbereitung, einem falschen Probeneinsatz in der Gelelektrophorese ist ein prozeduraler Fehler bei sehr kleiner Peptidgröße mit einem Molekulargewicht  $< 10$  kDa zu diskutieren. Es ist vorstellbar, dass in der Gelelektrophorese ein zu rasches und anhaltendes Auftrennen der eingesetzten Peptide stattgefunden hat, das für alle Peptide, außer der verkürzten Version des  $\alpha$ S mit den AS 96–140, adäquat war. Ein Verlust der Probe in der Gelelektrophorese bzw. beim Transfer in der Blotkammer vom Gel auf die Membran wäre aufgrund der geringen Peptidgröße im elektrischen Feld bei negativ geladenem C-Terminus denkbar, aber hoch unwahrscheinlich.

In Kenntnis der Parallelen und der Annahme einer Konformationsspezifität des nAbs- $\alpha$ S ist es wichtig, einen Vergleich zwischen A $\beta$  und  $\alpha$ S zu ziehen. Dabei hatte in den Untersuchungen die Unterscheidung zwischen A $\beta$  und  $\alpha$ S sowie der nAbs- $\alpha$ S und den bereits bekannten nAbs-A $\beta$ , wie oben aufgeführt, besondere Bedeutung. Der hier gezeigte Immunoblot belegte eine Unterscheidung der nAbs- $\alpha$ S und nAbs-A $\beta$ . Der in den Arbeiten von Dodel sowie Mengel ausführlich beschriebene nAbs-A $\beta$  kann die unterschiedlichen Synucleine  $\alpha$ S,  $\beta$ S und  $\gamma$ S nicht detektieren [Dodel et al. 2011; Mengel et al. 2013].

Demgegenüber erkannte der nAbs- $\alpha$ S keine Monomere bzw. Oligomere von A $\beta$ . Die einzelnen eingesetzten A $\beta$ -Proteine wurden vom nAbs-A $\beta$  in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung erkannt, wobei keine höheren Oligomerisierungsgrade bzw. Fibrillen nachzuweisen waren. Dies entspricht den bereits publizierten Daten, die dem nAbs-A $\beta$  das Erkennen eines Epitops im C-Terminalen Teil des A $\beta$ <sub>1-40</sub> zuschreiben. Dieser nAbs-A $\beta$  kann A $\beta$  Oligomere, jedoch keine Monomere oder fibrilläre Formen des A $\beta$  detektieren [Dodel et al. 2011]. Die Bestätigung der Existenz dieser nAbs-A $\beta$  führten Szabo und Kollegen, die ebenfalls eine Isolation aus IVIG durchführten [Szabo et al. 2010].

Von Interesse sind zudem die Daten von Kaye und Kollegen. Diese beschreiben einen selektiven, Oligomer-spezifischen monoklonalen Antikörper (A11), der Oligomere, jedoch nicht fibrilläre Proteinaggregate des A $\beta$  erkennt. Oligomere des  $\alpha$ S und anderer Peptide werden zudem sicher durch diesen MAK erkannt [Kaye et al. 2010]. Dieser monoklonale Antikörper scheint die Detektion der Proteinablagerung nicht an einer spezifischen linearen Aminosäuresequenz in der Primärstruktur zu bewerkstelligen. Vielmehr scheinen bestimmte Konformationszustände bzw. die Zusammenlagerung von Oligomeren unterschiedlicher Peptide als Epitop vom Antikörper erkannt zu werden. Der Brückenschlag von der AD-Pathologie zu den Synucleinopathien mit dem PS erfolgt darüber hinaus über die vorhandene Detektionsfähigkeit dieses Antikörpers für oligomere und präfibrilläre Aggregate von  $\alpha$ S [Kaye et al. 2003]. Es ist aus unserer Sicht vorstellbar, dass dieses Erkennungsmuster dem hier untersuchten nAbs- $\alpha$ S ähnelt.

### 4.3 Die Untersuchungen aggregierter $\alpha$ S-Spezies im Immunoblot

Zu diskutieren ist nun inwieweit höher aggregierte Formen eine Rolle bei den Synucleinopathien spielen und wie die Einordnung dieser nAbs- $\alpha$ S und ihrer Spezifität zu erfolgen hat. Die bisherigen Untersuchungen zeigen konstant:

1.  $\alpha$ S wird durch den isolierten nAbs- $\alpha$ S sicher in der Immunhistochemie und im Immunoblot erkannt.
2. Höher aggregierte  $\alpha$ S-Formen werden durch den nAbs- $\alpha$ S bevorzugt detektiert, ohne dass punktuelle Veränderungen in der Primärsequenz zu einer Veränderung der Antigen-Antikörper-Interaktion führen.
3. Die zentrale NAC-Domäne nimmt nach Auswertung der Immunoblots und in Kenntnis der Immunhistochemie mit Detektion der LB als auch der amyloiden Plaques eine entscheidende Rolle ein.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse versuchten unterschiedliche Arbeitsgruppen eine quantitative Bestimmung des  $\alpha$ S in biologischen Proben zu führen. Es zeigten sich in Analogie zu den Untersuchungen bei A $\beta$  initial widersprüchliche Ergebnissen, die nicht zuletzt auf die unspezifische Messung des  $\alpha$ S zurückzuführen waren.

Nach den Arbeiten von El-Agnaf und Kollegen lässt sich  $\alpha$ S im peripheren Blut als auch im Liquor (CSF) nachweisen [El-Agnaf et al. 2003]. Dies trifft sowohl für neurologisch gesunde Kontrollgruppen als auch auf am PS erkrankte Personen zu. Einen Überblick hierzu gibt Mollenhauer [Mollenhauer et al. 2010]. So ergaben beispielsweise die im CSF zu messenden Spiegel von  $\alpha$ S keinen signifikanten Unterschied zur Differenzierung der DLK zur AD, so dass kein sensitiver diagnostischer Marker postuliert werden konnte. Bei der DLK konnte eine positive Korrelation von Krankheitsdauer und geringeren  $\alpha$ S-Spiegeln gezeigt werden. Für AD war dies nicht der Fall [Noguchi-Shionhara et al. 2009].

Im Weiteren konnten unterschiedliche Varianten des  $\alpha$ S, sowohl in seiner oligomeren als auch in phosphorylierter Form im peripheren Blut und im CSF detektiert werden [El-Agnaf et al. 2006]. Li und Kollegen postulierten einen erniedrigten  $\alpha$ S-Spiegel in Plasma (Detektion der  $\alpha$ S-Monomere), der bei PS mit frühem Beginn noch niedriger ausgeprägt sein soll [Li et al. 2007]. Duran und Kollegen publizierten dem entgegengesetzte Ergebnisse bei therapierten und untherapierten PS-Patienten [Duran et al. 2010]. Mit am ehesten posttranslational verändertem  $\alpha$ S und seiner Detektion setzten sich

Foulds und Kollegen in einer kleinen Serie mit 32 PS-Patienten auseinander und fanden erhöhte phosphorylierte  $\alpha$ S-Plasmaspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Für die Gesamt- $\alpha$ S-Spiegel und seine oligomeren Spezies konnte hier keine Signifikanz nachgewiesen werden [Foulds et al. 2011]. In Zusammenschau ist es von Bedeutung, die zu untersuchenden  $\alpha$ S-Peptide genauer zu spezifizieren.

Sharon und Kollegen zeigten in ihren Westernblot-basierten Untersuchungen erhöhte  $\alpha$ S-Oligomer- bzw. Protofibrillenspiegel in Hirnproben aus transgenen Tiermodellen sowie in PS- und DLK-Proben [Sharon et al. 2003]. Mittels ELISA konnten sowohl Paleologou als auch Tokuda und Kollegen unterschiedliche  $\alpha$ S-Spezies, vom Dimer bis hin zu Multimeren, in humanen post-mortem Hirn-Gewebeproben bzw. im CSF detektieren [Paleologou et al. 2009; Tokuda et al. 2010].

Weitere posttranslationale Veränderungen des  $\alpha$ S mit aggregationssteigernder Wirkung sind zudem bekannt. Dazu gehören in erster Linie Oxidation und Nitrierung [Duda et al. 2000] sowie die Phosphorylierung an Position 129 im C-Terminus [Kahle et al. 2002]. Diese wurden hier nicht explizit untersucht und sollte gegebenenfalls der Vollständigkeit halber ergänzt werden. Da aktuell am ehesten eine bestimmte Konformation als Antikörper-Epitop in Frage kommt, wurde darauf verzichtet.

### **4.4 Die Oligomerisierungshypothese des $\alpha$ S**

Die wissenschaftlichen Daten zeigen zunehmend, dass in der Konformation veränderte und aggregierte  $\alpha$ S-Spezies zur Proteinablagerung und folglich zur Neurodegeneration führen können. In diesem Zusammenhang fokussiert sich das gegenwärtige Interesse auf neue Ansätze, die die Ablagerung der  $\alpha$ S-Aggregate reduzieren bzw. verhindern. Unsere bisher analysierten Daten legen vor allem eine Detektion selbiger, sowohl bei  $\alpha$ S als auch bei den entsprechend untersuchten Punktmutationen im  $\alpha$ S-Gen durch den nAbs- $\alpha$ S nahe.

Die Kaskade der  $\alpha$ S-Aggregation führt über die Dimerisierung und Oligomere zum Auftreten höherer Aggregationsformen bis zu Protofibrillen [Uversky et al. 2001]. Die  $\alpha$ S-Oligomere stellen in diesem Konstrukt eine Zwischenstufe dar, die nicht wie die nächsthöhere Stufe der Protofibrillen (Multimere) zur unmittelbaren Fibrillenformation führen [Cole et al. 2005] und in der inerten Endstrecke der Bildung der intrazellulär gelegenen LB bzw. LN münden [Spillantini et al. 1997]. Nach Bodner und Kollegen dient in diesem Zusammenhang die Zellmembran als kernbildendes Zentrum

für die Oligomerisierung des membrangebundenen  $\alpha$ S. So kann in einem mehrstufigen Prozess die Aggregation in fibrilläre Zusammenschlüsse in Gang gesetzt werden [Bodner et al. 2010]. Die Assoziation des  $\alpha$ S und die Rolle des N-Terminus zur Bindung an die Zellmembran zeigen Bartels und Kollegen [Bartels et al. 2010].

Unterschiedliche Arbeiten haben sich mit der Detektion der als möglicherweise toxisch anzusehenden  $\alpha$ S-Oligomere befasst. So können nach Outerio und Kollegen  $\alpha$ S-Oligomere gegenwärtig in Zelllinien und Neuronen intrazellulär detektiert und gemessen werden [Outerio et al. 2008]. Den extrazellulären Nachweis der Oligomere und ihren toxischen Einfluss auf die Zelle konnten die Arbeitsgruppe um Danzer und Kollegen in der Zellkultur zeigen [Danzer et al. 2011].  $\alpha$ S und insbesondere seine Oligomere zeigten bei Untersuchungen der  $\alpha$ S Punktmutationen [Conway et al. 1998], in der Zellkultur [Tetzlaff et al. 2008] und in histopathologischen Untersuchungen [Sharon et al. 2003; Paleologou et al. 2009] eine toxische Wirkung auf die neuronalen Strukturen.

Winner und Kollegen zeigten in ihren 2011 veröffentlichten Arbeiten in vivo in einem Ratten-Lentivirus-System eine über Mutationen des  $\alpha$ S vermittelte Oligomerisierung und Fibrillenbildung, die zur Toxizität gegenüber dopaminergen Neuronen in der SN führten [Winner et al. 2011]. Toxizitätsuntersuchungen am transgenen Drosophila-Modell belegten zudem die Neurotoxizität des aggregierten  $\alpha$ S gegenüber dopaminergen Neuronen [Periquet et al. 2007]. Danzer und Kollegen zeigten in ihren Vorarbeiten aus dem Jahr 2007, dass insbesondere die höheren Aggregationsstufen des  $\alpha$ S einen unmittelbaren zellmembranvermittelten neurotoxischen Effekt ausbilden können und postulieren einen möglichen Mechanismus der Schädigung [Danzer et al. 2007].

Desplats zeigte einen weiteren Weg der Toxizitätsvermittlung dieser oligomeren Formen in der unmittelbaren Zell-zu-Zell-Interaktion. Die als pathologisch anzusehenden  $\alpha$ S-Spezies können von Zelle zu Zelle weitergegeben werden, über Exozytose nach extrazellulär gelangen, mittels Endozytose wieder in neuronale und gliale Zellen aufgenommen werden und zu einer Ausbreitung der als nicht physiologisch angesehen Form des  $\alpha$ S führen. Das extrazelluläre  $\alpha$ S triggert in der Zellkultur somit apoptotische Prozesse in den umgebenden Neuronen [Desplats et al. 2009].

Exogene  $\alpha$ S-Fibrillen neigen in der Zellkultur zur Formation von LB-ähnlichen intrazellulären Einschlüssen [Luk et al. 2009]. Weitere Belege hierzu und zur Verbreitung der  $\alpha$ S-assoziierten Pathologie konnten Danzer und Mitarbeiter in ihren Arbeiten zeigen [Danzer et al. 2009]. Möglicherweise wird

dies auch über direkte Neuroinflammation vermittelt. Die Triggerung neuroinflammatorischer Prozesse, z.B. über Mikrogliaaktivierung, die Freisetzung proinflammatorischer und neurotoxischer Faktoren beschreiben die im Folgenden aufgeführten Arbeiten in Zusammenhang mit  $\alpha$ S und der möglichen Krankheitsprogression bei den Synucleinopathien [Zhang et al. 2005; Lee et al. 2010].

Liu und Kollegen postulieren mit ihren Arbeiten zu Varianten des  $\alpha$ S, insbesondere verkürzten  $\alpha$ S-Peptiden, einen weiteren Mechanismus, bei dem Fragmente des  $\alpha$ S zu einer rascheren Aggregation des Volllängenpeptides und ähnlich wie beispielsweise bei der Chorea Huntington zu neuronalem Zelltod führen [Liu et al. 2005]. Möglicherweise können Antikörper, wie der von uns postulierte nAbs- $\alpha$ S, die extrazelluläres  $\alpha$ S detektieren, über Mikrogliaaktivierung zur Proteinclearance und damit verminderten Proteinakkumulation beitragen [Bae et al. 2012].

Somit eröffnen sich mögliche therapeutische Optionen dieser frühen Proteinaggregation entgegenzuwirken. Es bleibt offen wie diese  $\alpha$ S-Spezies detektiert und ggf. für den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden können. Eine Detektion z.B. durch die von uns beschriebenen nAbs- $\alpha$ S ist denkbar. Es bleibt zu klären, was der nAbs- $\alpha$ S genau erkennt und inwieweit dies in das physiologische Setting des  $\alpha$ S-Stoffwechsels passt. Allerdings ist es gut vorstellbar, dass der Antikörper das  $\alpha$ S extrazellulär erkennt, folglich bindet und dadurch die Oligomerisierung behindert. Zudem ist es vorstellbar, dass der Antikörper-Antigen-Komplex durch Mikroglia phagozytiert werden kann. Bartels und Mitarbeiter stellten entgegen der bisher aus biophysikalischen und biochemischen Untersuchungen weit verbreiteten Annahme, dass  $\alpha$ S als nativ ungefaltetes Monomer mit einer Größe von ca. 14kDa in seiner physiologischen Form in humanen Zellen zu finden ist [Fauvet et al. 2012], die Hypothese auf, dass endogenes  $\alpha$ S in Form eines helikal gefalteten Tetramers mit einer Größe von ca. 56–58kDa in neuronalen sowie nicht neuronalen Zellkulturen und humanem Hirngewebe zu finden ist [Bartels et al. 2011]. Für das strukturverwandte  $\beta$ S soll dies analog gelten. Unsere Untersuchungen zeigten, dass der isolierte nAbs- $\alpha$ S vor allem Aggregate, die am ehesten einem Tetramer entsprachen, detektieren konnte. Dies galt vor allem für  $\alpha$ S, in geringem Maße jedoch auch für das  $\beta$ S, dessen Detektion in einem weitaus geringeren Ausmaß und nur in diesem Bereich des Oligomers zu finden war.

Im Gegensatz zur bisher angenommenen  $\alpha$ S-Monomerform, die sich in rekombinanter Form in vitro unmittelbar zu amyloiden Fibrillen zusammenlagert, zeigten diese humanen  $\alpha$ S-Tetramerformen kaum eine bis keine Aggregation. Nach Lyse der Zellen in vitro destabilisiert sich das Tetramer



und führt zur vorrangigen Freisetzung von Monomeren [Bartels et al. 2011]. Weitere Arbeiten von Wang und Trexler belegen diese neue Tetramer-Hypothese zudem [Wang et al. 2011; Trexler et al. 2012]. Es erscheint möglich, dass diese endogene  $\alpha$ S-Form unter physiologischen Verhältnissen intrazellulär stabilisiert, erst nach dem Untergang der Zelle freigesetzt wird und die  $\alpha$ S-Homöostase aus dem Gleichgewicht gerät [Dettmer et al. 2013]. Es ist denkbar, dass unser nAbs- $\alpha$ S in dieser Situation in der Lage ist, das veränderte  $\alpha$ S-Verhältnis zu stabilisieren, indem die Tetramere detektiert und vor dem Zerfall in die Monomere bewahrt werden. Möglicherweise verliert der Körper mit zunehmendem Alter und Krankheitsverlauf die Fähigkeit, dieses Missverhältnis bei voranschreitendem Zelluntergang zu regulieren und endet in der Proteinhäufung bei vermehrtem Anfall der  $\alpha$ S-Monomerstrukturen, die folglich aggregieren.

Eine mögliche Interventionsstrategie bei  $\alpha$ S liegt in der Reduktion der toxischen  $\alpha$ S-Spezies. Eine Stabilisierung und Verhinderung einer möglichen Fehlfaltung stellt eine weitere Option dar. Einen Überblick hierzu geben Al-Mansoori bzw. Valera und Kollegen [Al-Mansoori et al. 2013; Valera et al. 2013]. Es bleibt zu konstatieren, dass in Zusammenschau der neuropathologischen Ergebnisse aus seriellen humanen postmortem Daten und den Tiermodellen die LB alleine nicht als zulässiges und einziges  $\alpha$ S-assoziiertes Korrelat für den neuronalen Zelluntergang entscheidend sind. Eine hiervon zu unterscheidende Form des  $\alpha$ S muss zur neuronalen Toxizität und folglich Degeneration beitragen.

Darüber hinaus scheint die stattgehabte  $\alpha$ S-Proteinablagerung nicht alleine für die Pathologie des PS verantwortlich zu sein. Neuropathologische Analysen der häufigsten autosomal rezessiven PS-Form mit frühem Beginn und sich rasch entwickelnder klinischer Ausprägung, die mit einer Parkin-Mutation assoziiert ist, zeigten nur eine geringe bis keine LB-Pathologie [Pramstaller et al. 2005; van de Warrenburg et al. 2001]. Diese neuropathologische Heterogenität zeigt sich weiter in der LRRK2-Mutation, die 10% der Patienten mit autosomal dominantem PS und circa 4% der sporadischen Formen haben, deren Neurodegeneration sowohl mit als auch ohne LB-Pathologie postmortem gezeigt werden konnte [Covy et al. 2009; Gaig et al. 2007]. Im PS-Tiermodell kann die Heterogenität der LB-Pathologie ebenfalls nachgewiesen werden. Das klassische Toxin-induzierte PS-Tiermodell mit MPTP (1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin) mit motorischen Störungen und dopaminergener Neurodegeneration lässt  $\alpha$ S-Einschlüsse vermissen, wohingegen das Toxin Rotenon zu nigralen Einschlusskörperchen führt [Bezard et al. 2011].

Diskutiert werden muss nicht nur eine Störung im Proteinstoffwechsel bzw. der Prozessierung des  $\alpha$ S als solches, sondern auch die Dysfunktion des zellulären Systems an sich. So stellt das Alter mit fortschreitender neuronaler Dysfunktion und zunehmenden Einschränkungen des Chaperon-Netzwerkes zur Regulation des neuronalen Proteinhaushaltes mittels proteasomalem (UPS = Ubiquitin-Proteasom System) und lysosomalem (ALP = Autophagie-lysosomaler Pfad) Abbauweg der schädigenden Proteine einen Hauptrisikofaktor für PS dar [Tyedmers et al. 2010; Collier et al. 2011]. Möglicherweise spielt dies eine Rolle bei der Destabilisierung der  $\alpha$ S Tetramere und deren Freisetzung.

### 4.5 Immuntherapeutische Ansätze bei Synucleinopathien

Immuntherapien werden vermehrt bei neurodegenerativen Erkrankungen eingesetzt. Auch beim PS gibt es sowohl den Ansatz der aktiven als auch der passiven Immunisierung. Eine Übersicht findet sich bei Oertel und Schulz [Oertel et al. 2016]. Ähnlich wie bei der AD wird auch hier diskutiert, dass vermutlich oligomere Vorstufen des  $\alpha$ S besonders relevant für den Krankheitsfortschritt sind. Ziel ist daher, möglichst niedermolekulare Strukturen wie Monomere, Dimere sowie Tetramere als Oligomere zu erkennen und unschädlich zu machen. Unsere Daten sprechen dafür, dass der nAbs- $\alpha$ S hierfür besonders geeignet erscheint, da er eben diese Formen des  $\alpha$ S korrekt erkennt. Hierfür sind weitere Arbeiten im Tiermodell notwendig. Zudem kann im Tiermodell dann auch untersucht werden, inwieweit der Antikörper zu einer Reaktion der Mikroglia führt.

Das von uns postulierte Immunisierungskonzept bei Synuclein-assoziierten Erkrankungen folgt den bereits weiter fortgeschrittenen Ergebnissen bei der AD mit den extrazellulär lokalisierten A $\beta$ -Aggregaten und Ansätzen, die zum Teil in klinischen Studien geprüft werden [Wisniewski et al. 2008]. Eine Übersicht zum aktuellen Stand der Immunisierungskonzepte bei neurodegenerativen Erkrankungen zeigen hierzu Bach und Schulz [Bach et al. 2017]. In Anlehnung an diese Daten entstanden in unserem Labor Arbeiten zur Isolation natürlich vorkommender Autoantikörper gegen A $\beta$ , sog. nAbs-A $\beta$ . Bei Patienten mit AD waren diese nAbs-A $\beta$  reduziert nachweisbar [Du et al. 2001; Weksler et al. 2002]. In weiteren Folgeuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese nAbs-A $\beta$  in unterschiedlichen Untersuchungsmethoden in der Lage waren, die Neigung des A $\beta$  zur Fibrillation und somit zur Bildung höherer Aggregationsformen zu blockieren. Folglich zeigte sich eine reduzierte Toxizität

der Amyloidablagerungen, da diese in einem früheren Stadium angegangen wurden.

Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe und von Relkin und Kollegen belegten den Einsatz dieser aus humanen i.v.-Immunglobulinen (IVIg) extrahierbaren nAbs-A $\beta$ , die A $\beta$ -Spezies detektieren und einen positiven Einfluss in kleinen klinischen Fallserien zeigen konnten [Dodel et al. 2004; Bacher et al. 2009; Relkin et al. 2009; Du et al. 2003].

So könnte die von uns vorgeschlagene humorale Immunisierung gegen  $\alpha$ S auf zwei verschiedene Arten erfolgen. Neben der aktiven Immunisierung mit Stimulation des Immunsystems zur Produktion von Antikörpern gegen humanes  $\alpha$ S (Abs- $\alpha$ S), besteht die Möglichkeit zur passiven Immunisierung mit direkter Applikation von Abs- $\alpha$ S mit vorübergehendem Schutz vor weiterer Progression. Reynolds und Mitarbeiter beschreiben zudem einen Ansatz zur Zell vermittelten Immunantwort über regulatorische T-Zellen als mögliche Behandlungsoption der Synucleinopathien [Reynolds et al. 2010].

In Analogie zur AD konnten Immunisierungsansätze mit dem Zielprotein  $\alpha$ S einen positiven Effekt auf die Reduktion der  $\alpha$ S-Aggregatbildung im neuronalen Umfeld zeigen. Masliah zeigte 2005, dass es im transgenen Tiermodell nach aktiver Immunisierung mit rekombinantem humanen  $\alpha$ S in Korrelation mit der Antikörperantwort zu einer Reduktion der  $\alpha$ S-Ablagerungen in der Zelle und insbesondere den Synapsen kam. Letztlich konnte durch die produzierten Antikörper gegen  $\alpha$ S, die vor allem eine hohe Affinität mit Epitoperkennung im C-terminalen Teil des  $\alpha$ S zeigten, ein Rückgang der neuronalen Degeneration erreicht werden [Masliah et al. 2005]. Verfolgt man diese Hypothese weiter, erscheint es sinnvoll im frühest möglichen Stadium der Erkrankung bzw. im bestmöglichen Fall vor Erkrankungsbeginn mit der Gegenregulation der intraneuronalen Aggregatbildung zu beginnen [Kofler et al. 2012]. Möglicherweise kann durch diese vorbeugende *präventive Immunisierung* eine anhaltende humorale Immunantwort in Form hoher Antikörpertiter mit entsprechender Effektivität geschaffen werden. Von dieser Idealvorstellung ist der gegenwärtige Stand der Wissenschaft in Bezugnahme auf eine mögliche Immunisierung bei den Synucleinopathien weit entfernt. Beim PS bietet sich hier vor allem der Einsatz bei Patienten mit einer REM-Schlaf-Verhaltensstörung (RBD) an. Diese Patienten leiden an einer  $\alpha$ -Synucleinopathie und mindestens die Hälfte der Betroffenen entwickelt nach 10 Jahren ein PS, wobei es sich in den meisten Fällen um ein IPS, seltener um eine Multi-System-Atrophie handelt [Howell et al. 2015].

Zur passiven Immunisierung wurde 2011 von Masliah und Kollegen im transgenen Mausmodell der DLK nach Applikation von Antikörpern eine Verbesserung des neuropathologischen und klinischen Outcomes im beobachteten Modell erreicht. Antikörper mit unterschiedlichen epitopbindenden Regionen wurde appliziert, wobei die höchste Spezifität für ein Epitop im C-terminalen Bereich des humanen  $\alpha$ S belegt werden konnte. Der Nachweis der Antikörperbindung im ZNS konnte gezeigt werden, so dass ein Überwinden der Blut-Hirn-Schranke und letztendlich eine mögliche Endozytose des Antigen-Antikörper-Komplexes in das lysosomale Kompartiment zum Abbau möglich wurde [Masliah et al. 2011].

Die nötige Aufnahme eines  $\alpha$ S-Antikörper-Komplexes in lebende Zellen zeigten Näsström und Mitarbeiter in ihrer Arbeit. Mittels monoklonalem  $\alpha$ S-Antikörpern konnte im BiFC-Assay in der Zellkultur mit H4-Neurogliomzellen die Internalisierung der Antikörper nachgewiesen werden. Die C-Terminal- und Oligomer-selektiven Antikörper reduzierten die  $\alpha$ S-Dimer- und Oligomerisierung und damit die  $\alpha$ S-Spiegel, so dass ein Einfluss der Abs- $\alpha$ S auf den zellulären  $\alpha$ S-Umsatz anzunehmen ist [Näsström et al. 2011]. Die scheinbar höhere Affinität der Antikörper, die gegen den C-terminalen Teil des  $\alpha$ S gerichtet waren, könnten möglicherweise in der Membranassoziation des C-Terminus liegen, der eine Exposition in den Extrazellularraum und damit eine Antikörperbindung ermöglicht.

Andere passiv ausgerichtete Ansätze zielen überdies auf intrazelluläre  $\alpha$ S-Aggregate ab. Sog. *Intrabodies* oder *intrazelluläre Antikörper* sind durch Genetic-Engineering geschaffene Antikörper, die intrazellulär exprimiert werden und dort ihre Funktion entfalten sollen. Durch Zelltransfektion bzw. -infektion mit scFv-cDNA enthaltenden Plasmiden oder Viren werden diese exprimiert [Chen et al. 1994]. Exemplarisch konnten Lynch und Kollegen in ihrer Untersuchung einen positiven Effekt dieser *Intrabodies* auf die Verminderung der  $\alpha$ S-Aggregation und damit eine reduzierte Toxizität erreichen [Zhou et al. 2004; Lynch et al. 2008].

Im Bereich dieser passiven humoralen Immunisierung könnte der hier präsentierte nAbs- $\alpha$ S mit seiner Neigung zur Detektion oligomerer  $\alpha$ S-Spezies seine Wirkung entfalten. Die nAbs- $\alpha$ S wurden erstmals 2007 von Papachroni und Kollegen im peripheren Blut detektiert [Papachroni et al. 2007]. Diese konnten mit einer positiven Korrelation gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe im peripheren Blut bei Patienten mit familiärem PS, nicht jedoch beim IPS, nachgewiesen werden. So waren in 65% aller getesteten Patienten nAbs- $\alpha$ S nachweisbar. 90% der Fälle mit einer familiären Belastung waren überdies positiv, so dass eine Rolle in der Pathogenese des PS postuliert

wurde. Unterschiedliche Arbeitsgruppen bestätigen die von uns ebenfalls erfolgreich durchgeführte Isolation dieser Autoantikörper aus peripheren Blutproben bzw. i.v.-Immunglobulinlösungen.

Daten aus unserem eigenen Labor zeigen, dass die Antikörperspiegel des untersuchten nAbs- $\alpha$ S bei Patienten mit PS signifikant erniedrigt sind und einen möglichen Beitrag bei der Diagnosestellung darstellen können. Auf Grundlage der hier vorgestellten Daten wurde eine Assay entwickelt, der nAbs- $\alpha$ S und  $\alpha$ S im Serum messen kann. Es konnten bei 62 Patienten mit PS im Vergleich zu 42 Patienten mit AD und 46 alterskorrigierten, gesunden Kontrollen erniedrigte nAbs- $\alpha$ S gezeigt werden. Eine Korrelation mit der klinischen Symptomausprägung/-dauer (Hoehn & Yahr Stadium, Lebensalter, Krankheitsdauer) war nicht nachzuweisen. Es bleibt jedoch zu konstatieren, dass das untersuchte Kollektiv eher fortgeschrittene PS-Krankheitsstadien mit einer mittleren Krankheitsdauer >10 Jahren darstellte [Besong-Agbo et al. 2013].

Eine aktuellere Arbeit von Maetzler und Kollegen stützt die in unserem Labor durchgeführten Untersuchungen zu den nAbs- $\alpha$ S. Im Gegensatz zu der wissenschaftlich akzeptierten Tatsache erniedrigter nAbs- $\alpha$ S bei der AD konnte die Arbeitsgruppe keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten nAbs- $\alpha$ S-Spiegeln im Serum bei 93 PS-Patienten im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv aus 194 Personen zeigen. Des Weiteren war keine Korrelation nach klinischen, demographischen oder neurodegenerativen Markern möglich [Maetzler et al. 2014]. Andere hingegen wie Gruden und Kollegen führten den Nachweis erhöhter Titer von nAbs- $\alpha$ S gegenüber unterschiedlichen  $\alpha$ S-Konformationen bei PS-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe. Die maximalen Spiegel der nAbs- $\alpha$ S wurden 5 Jahre nach Diagnosestellung erreicht und fielen im weiteren Krankheitsverlauf deutlich ab [Gruden et al. 2011]. Dem pflichteten Yanamandra und Mitarbeiter mit Nachweis erhöhter nAbs- $\alpha$ S-Level gegen monomeres  $\alpha$ S bei einer kleinen Anzahl von PS-Patienten bei. Die Untersuchungen im ELISA und Immunoblot zeigten ebenfalls mit zunehmender Krankheitsdauer einen Abfall der Immunantwort [Yanamandra et al. 2011].

Betrachtet man die beschriebenen, uneinheitlichen Ergebnisse scheint der Zeitpunkt bzw. das Krankheitsstadium von Bedeutung für die gemessenen nAbs- $\alpha$ S-Level zu sein. Es ergeben sich Hinweise, dass die nAbs- $\alpha$ S im Verlauf abnehmen. Warum keine signifikanten Unterschiede in den Arbeiten aufgezeigt werden konnten, könnte u.a. auch an der Heterogenität der PS liegen. Möglicherweise unterliegen nur einzelne Phänotypen des PS einer Immunkontrolle. Andererseits untersuchten wir und andere das

Bindungsvermögen des nAbs- $\alpha$ S außerhalb des physiologischen Settings, so dass nicht zwischen freien und gebundenen Antikörpern unterschieden werden kann. Nach Notkins zeichnen sich nAbs im Allgemeinen durch eine hohe Bindung von körpereigenen Antigenen aus und dieser Antigen-Antikörper-Komplex kann nach Isolation aus biologischen Flüssigkeiten (Serum/CSF) in den verwendeten Untersuchungsmethoden nicht immer adäquat zugänglich sein [Notkins 2004; Fetissov 2011].

Es zeigte sich in Zusammenschau der Analysen zur näheren Charakterisierung des nAbs- $\alpha$ S, dass als epitopbindende Region die zentrale NAC-Region von besonderer Bedeutung war. Ein direkter Vergleich mit den nAbs-A $\beta$  zeigte, dass es sich bei den isolierten Autoantikörpern gegen  $\alpha$ S und A $\beta$  um unterschiedliche Typen mit unterschiedlichen Epitopen handelte. Einen Überblick über die immuntherapeutischen Ansätze bei weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, die z.T. über natürlich vorkommende Autoantikörper vermittelt werden, zeigten Brody sowie Agbo und Kollegen [Brody et al. 2008; Agbo et al. 2009].

Die klinische Forschung versucht dabei diese Grundlagenarbeiten in ihren immuntherapeutischen Ansätzen zu integrieren. Dabei nehmen wie oben bereits beschrieben die Vorarbeiten bei A $\beta$  eine zentrale Rolle ein und weisen den Weg hin zum erforschenden Zielprotein  $\alpha$ S.

Die gegenwärtigen in klinischen Studien getesteten aktiven Immunisierungsstrategien gegen  $\alpha$ S werden mit AFFITOPE von AFFiRiS durchgeführt [Mandler et al. 2014]. AFFiRiS entwickelte einen Impfstoff unter dem Namen AFFITOPE, der im menschlichen Körper (ähnlich einer Gripeschutzimpfung) die Produktion von  $\alpha$ S-Antikörpern initiiert. Hierzu wurde u.a. die Substanz AFFITOPE PD01a entwickelt. Eine Phase I Studie mit dem subkutan applizierten Wirkstoff AFFITOPE PD01 (NCT 01568099), einem an Aluminiumhydroxid gekoppelten Peptid, das in zwei Mausmodellen der Synucleinopathien die  $\alpha$ S-assoziierten neuropathologischen Veränderungen positiv beeinflusste, wurde initiiert [Schneeberger et al. 2012]. Nach einem Beobachtungszeitraum von 1 Jahr zeigten sich bei guter Verträglichkeit zum einen ein deutlicher Unterschied bezüglich der Krankheitsprogression im Vergleich zum Placeboarm und zum anderen der Nachweis AFFITOPE-spezifischer Antikörper im Serum der Hälfte der Probanden sowie zu einem geringeren Teil im CSF [Schneeberger et al. 2016]. Die in die Studie eingeschlossenen Patienten mit früher Form des PS wurden in 2 Folgestudien weiter untersucht. Hieraus resultierend ist eine Phase II Studie für 2020 geplant [McFarthing et al. 2019; Oertel et al. 2016].

Unter A $\beta$  konnten beispielsweise die in Phase III Studien eingesetzten humanisierten monoklonalen Antikörper Bapineuzumab und Solanezumab (bei milder bis moderater AD) die Erwartungen nicht erfüllen und zeigten keinen klinischen Vorteil. Aktuell präsentiert sich Aducanumab, ein aus B-Zellen von gesunden Spendern isolierter nAbs-A $\beta$ , derzeit am vielversprechendsten. Nach Reduktion der cerebralen A $\beta$ -Läsionslast in der Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) über 54 Wochen mit Reduktion des kognitiven Abbaus (prodromale bis milde AD), folgten 2 Phase III Studien (ENGAGE und EMERGE), deren Ergebnisse derzeit ausstehen [Sevigny et al. 2016].

Der Transfer des bei A $\beta$  verfolgten Konzepts erfolgte auf  $\alpha$ S, wobei ein frühest möglicher Interventionsbeginn angestrebt wird. Unter diversen Substanzen erscheinen folgende interessant: Cinpanemab (BIIB0054), ein monoklonaler Antikörper der nAbs ähnelt, wird seit 2018 in einer klinischen Studie näher untersucht [Weihofen et al. 2019; Brys et al. 2019]. Cinpanemab bindet an aggregiertes  $\alpha$ S und wird in einer Phase II Studie (SPARK Studie, NCT03318523) über 52 Wochen an Patienten mit PS im frühen Krankheitsstadium gegen Placebo untersucht. Daneben stellt Prasinezumab (RO7046015 / PRX002) einen weiteren anti- $\alpha$ S-Antikörper dar, der gegen  $\alpha$ S-Aggregate gerichtet ist. Wie bei Cinpanemab erfolgt die Applikation bei Prasinezumab in der Phase II Studie intravenös und wird über 52 Wochen gegen Placebo bei frühen Stadien des PS untersucht (PASADENA Studie, NCT03100149) [Jankovic et al. 2018]. Ergebnisse werden im Verlauf des Jahres 2020 bzw. 2021 erwartet (siehe hierzu die ClinicalTrials.gov Datenbank unter: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>). Einen aktuellen Überblick zu den klinischen Studien, die  $\alpha$ S als Zielprotein für eine Immunisierung verfolgen, geben McFarthing und Kollegen [McFarthing et al. 2019].

### 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass natürlich vorkommende Autoantikörper gegen humanes  $\alpha$ S existieren. Diese lassen sich sowohl aus Einzelspenderseren von gesunden Kontrollpersonen, als auch aus kommerziell erhältlichen IVIG extrahieren. In den immunhistochemischen Untersuchungen an der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y, am exemplarisch ausgewählten transgenen  $\alpha$ S Tiermodell und in den post-mortem Hirngewebebeobachtungen neurodegenerativer Krankheitsbilder können die Proteinablagerungen sicher und ausgeprägt mit dem nAbs- $\alpha$ S detektiert werden.

Die Proteinuntersuchungen im Immunoblot zur Epitopcharakterisierung legen den Schluss nahe, dass der nAbs- $\alpha$ S in der Lage ist, die oligomeren Zwischenstufen des  $\alpha$ S zu detektieren, dies aber eher dem Erkennen eines Konformationszustandes des Proteins denn einem linearen Epitop entspricht. Dies spiegelt Beobachtungen wider, die zu anderen nAbs bekannt sind [Bach et al. 2012]. Ähnlich wie nAbs-A $\beta$  bei der AD spielen nAbs- $\alpha$ S möglicherweise eine Funktion in der Krankheitsprogression bzw. könnten eine therapeutische Rolle einnehmen. Die Daten von Besong-Agbo zeigen reduzierte nAbs- $\alpha$ S-Spiegel bei Patienten mit PS [Besong-Agbo et al. 2013]. Da nAbs- $\alpha$ S Bestandteil von IVIG sind, könnte dies Potential für eine mögliche Therapie bei Synucleinopathien darstellen. Dies ist in Anbetracht der Daten von Bartels, Wang sowie Trexler und Kollegen, die eine native  $\alpha$ S-Tetramer-Hypothese postulieren, von Bedeutung und könnte die Hypothese stützen [Bartels et al. 2011; Wang et al. 2011; Trexler et al. 2012]. Der nAbs- $\alpha$ S könnte in diesem Zusammenspiel die natürliche, endogene  $\alpha$ S-Tetramerform unter physiologischen Verhältnissen stabilisieren. Wie sich das postulierte Gleichgewicht zwischen nAbs- $\alpha$ S und  $\alpha$ S darstellt und welche Faktoren zur neuronalen Zytotoxizität führen ist offen.

Als weiterer nächster Schritt ist sicherlich zu klären, welchen Einfluss die nAbs- $\alpha$ S auf die oligomeren Strukturen haben und ob dies ein Korrelat in der klinischen Ausprägung findet. Ist der nAbs- $\alpha$ S beispielsweise in der Lage die Oligomerkonzentration zu reduzieren und führt dies zu einer Zunahme des monomeren  $\alpha$ S, wie dies analog für die Interaktion der nAbs-A $\beta$  mit A $\beta$  von Mengel und Kollegen gezeigt werden konnte [Mengel et al. 2013]. Hierzu sind weitere Untersuchungen in der Zellkultur, in extrahierten Gewebebeobachtungen von Betroffenen bzw. im entsprechend zu wählenden Tiermodell nötig.

Es ist unbekannt, ob eine Therapie mit IVIG, die die nAbs- $\alpha$ S enthalten, in frühen Formen der Synucleinopathien einen anhaltenden klinischen Effekt haben können. Hierfür wird ein Setting zum Erkennen der frühest möglichen



Krankheitsausprägung nötig werden, um erfolgsversprechend mit einer Immuntherapie anknüpfen zu können. Die weiteren Untersuchungen bei der AD werden ggf. weitere Hinweise liefern können, wobei deutlich die Unterscheidung der charakteristischen extrazellulär dominierten AD-Pathologie von den intrazellulären Proteinaggregationen bei den Synucleinopathien stattfinden muss. Ähnlich den bekannten Veränderungen bei den Prionenerkrankungen ist es aus unserer Sicht vorstellbar, dass ein Peptid wie beim Prionprotein gezeigt, im Verlauf eine sekundäre Konformationsänderung präsentiert und dies in einer rasch progredienten Aggregation und Toxizität mündet [Roettger et al. 2013].

Weiter ist es vorstellbar, dass der nAbs- $\alpha$ S in der histopathologischen Aufarbeitung einen Beitrag zur Verteilung des  $\alpha$ S bei den neurodegenerativen Krankheitsbildern haben kann. Ein Einsatz des nAbs- $\alpha$ S kann in unterschiedlichen Geweben in diversen Einbettungen erfolgen. Um dies im klinischen Alltag zu etablieren, bedarf es sicherlich weiterer Untersuchungen an verschiedenen Gewebeproben im Vergleich zu etablierten Färbemethoden, insbesondere immunologisch basierten Möglichkeiten.

Wir sehen mit unseren Daten eine Basis, die im Verlauf ggf. eine Grundlage für therapeutische Ansätze legt. Die isolierten nAbs- $\alpha$ S können möglicherweise die Aggregation von  $\alpha$ S, die assoziierte Neurotoxizität und letztendlich die Progression der Grunderkrankung vermindern oder im besten Fall stoppen. Es wird von Interesse sein, den Einfluss der nAbs- $\alpha$ S in vivo zu untersuchen. Unter anderem sind Toxizitätsuntersuchungen in der Zellkultur und Experimente im transgenen Tiermodell des PS geplant. Sowohl aktive als auch passive Ansätze im Labor zeigen vielversprechende Optionen, doch nicht zuletzt die Entwicklung der Immuntherapien bei der AD hat gezeigt, dass die Umsetzung der im Labor gefundenen Möglichkeiten in den klinischen Alltag mit relevanten Problemen wie z.B. Autoimmunität und weiteren Nebenwirkungen vergesellschaftet ist.

Überdies bleibt jedoch zu beachten, dass wir aus der Historie unterschiedlicher immunologischer Ansätze bei der AD Parallelen ziehen können: Eine Therapie muss in einem Frühstadium, am besten vor Erkrankungsmanifestation beginnen. Im Falle des PS könnte dies bei der REM-Schlaf-Verhaltensstörung, einem Prodromalstadium der Synucleinopathien, erfolgen.

Es ist zu diskutieren, dass die Konzentration der nAbs- $\alpha$ S in IVIG unzureichend ist. Daher ist die Isolation von nAbs- $\alpha$ S aus isolierten B-Zellen gesunder altersentsprechender hD (Einzelzellanalyse) zu fordern. Diese nAbs- $\alpha$ S sollten auf ihre Bindungscharakteristik untersucht und der bestmögliche nAbs auf gentechnischem Weg hergestellt werden. Dieser therapeutische Ansatz wurde bei der AD mit Aducanumab und Cinpanemab beim PS, den vielversprechendsten Kandidaten, verfolgt [Sevigny et al. 2016; Weihofen et al. 2019].

## 6. ABSTRACT

**Introduction:** PD is one of most common neurodegenerative disorders with a prevalence of 0.3% in the United States. Age is the most common risk factor and responsible for the observed increase in prevalence with increasing age. Pathophysiologically, the disease is associated with the deposition of  $\alpha$ -synuclein throughout the brain. This spread is associated with progressive neuronal loss, mainly in the substantia nigra. The role of  $\alpha$ S in the development of this disorder is strengthened by the fact that  $\alpha$ S mutations lead to genetic PD. In addition,  $\alpha$ S is the main content of Lewy-bodies, which are characteristic of this disease. Recent work has revealed that naturally occurring antibodies exist against  $\alpha$ S. We further elucidated their binding partners as well as their ability to detect  $\alpha$ S in immunohistochemistry.

**Material and Methods:** Antibodies against  $\alpha$ S were isolated from healthy human donors or from IVIG preparations. The establishment of a protocol to isolate these antibodies was part of this work. The antibodies were then used to detect  $\alpha$ S in the neural cell line SH-SY5Y, transgenic animal brain slices (Thy1)-h[A30P] as well as in human brain slices. These were obtained from BrainNet Europe. Next, interaction studies followed to determine the binding epitope. Using immunoblot technique, possible binding partners of these nAbs were identified. We used different synuclein proteins such as  $\alpha$ S,  $\beta$ S and  $\gamma$ S. Further, we used several point mutations as well as shortened peptides. Finally, we compared nAbs- $\alpha$ S to nAbs against A $\beta$ .

**Results:** This work demonstrates the existence of naturally occurring antibodies against  $\alpha$ S. Immunohistochemical analyses of these antibodies reveal binding of the antibody to  $\alpha$ S in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y, in transgenic animal models as well as in post mortem brains of PD patients. nAbs- $\alpha$ S strongly bind  $\alpha$ S and can be used for reliable detection of  $\alpha$ S in all these settings. Further analysis reveals that nAbs- $\alpha$ S mainly detect low molecular oligomers, that are currently discussed as main culprits in many neurodegenerative disorders. In addition, our analyses reveal that nAbs- $\alpha$ S mainly detect a protein conformation rather than a linear epitope. Similar observations can be made for other nAbs [Bach et al. 2017].

**Discussion:** The presented data reveal the existence of naturally occurring antibodies against  $\alpha$ S. Similar to AD, these antibodies may play a role in disease progression and may also serve as a therapeutic instrument. Data by Besong-Agbo et al. demonstrate reduced nAbs- $\alpha$ S in patients suffering from

PD [Besong-Agbo et al. 2013]. Since nAbs- $\alpha$ S are part of IVIG, these may also constitute a possible therapy for  $\alpha$ -synucleinopathies. However, in AD, many trials so far were not convincing. In order to investigate a possible therapeutic role of nAbs- $\alpha$ S, these need further be tested in animal models of the disease. If these are convincing, then therapeutic approaches in humans may be conducted. Nevertheless, several lessons were learned from similar approaches in AD. Therapy needs to start early, preferentially in prodromal disease. For PD, this may be easy to pursue since REM-sleep movement behaviour disorder is regarded as a prodromal disorder of  $\alpha$ -synucleinopathies. Patients at risk can thus be easily identified. In addition, the concentration of IVIG in nAbs- $\alpha$ S may be insufficient. Therefore, B-cells from healthy aged human donors should be isolated and nAbs- $\alpha$ S isolated on a single cell base. These then need to be tested for their binding capabilities and the most suited antibody then should be genetically engineered. This approach was pursued for Aducanumab therapy in AD and Cinpanemab in PD, currently the most convincing candidates.

**7. LITERATURVERZEICHNIS**

- Agbo DB, Neff F, Seitz F, Binder C, Oertel WH, Bacher M, Dodel R. Immunization as treatment for Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl.* 2009; (73): 311–315.
- Al-Mansoori KM, Hasan MY, Al-Hayani A, El-Agnaf OM. The role of  $\alpha$ -synuclein in neurodegenerative diseases: from molecular pathways in disease to therapeutic approaches. *Curr Alzheimer Res.* 2013; 10(6): 559–568.
- Alzheimer A. Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr Psych-Gerichtl Med.* 1907; 64: 146–148.
- Arawaka S, Saito Y, Murayama S, Mori H. Lewy body in neurodegeneration with brain iron accumulation type 1 is immunoreactive for alpha-synuclein. *Neurology.* 1998; 51(3): 887–889.
- Arima K, Uéda K, Sunohara N, Hirai S, Izumiyama Y, Tonzuka-Uehara H, Kawai M. Immunoelectron-microscopic demonstration of NACP/alpha-synuclein-epitopes on the filamentous component of Lewy bodies in Parkinson's disease and in dementia with Lewy bodies. *Brain Res.* 1998; 808: 93–100.
- Athanassiadou A, Voutsinas G, Psiouri L, Leroy E, Polymeropoulos MH, Ilias A, Maniatis GM, Papapetropoulos T. Genetic analysis of families with Parkinson disease that carry the Ala53Thr mutation in the gene encoding alpha-synuclein. *Am J Hum Genet.* 1999; 65(2): 555–558.
- Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnothi seauton'. *Immunol Today.* 1991; 12(5): 154–159.
- Bach JP, Dodel R. Naturally occurring autoantibodies against  $\beta$ -Amyloid. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 750: 91–99.
- Bach JP, Schulz JB. Alzheimer-Krankheit. Neue Ansätze in der medikamentösen Therapie. *Arzneimitteltherapie.* 2017; 35: 3–11.
- Bacher M, Depboylu C, Du Y, Noelker C, Oertel WH, Behr T, Henriksen G, Behe M, Dodel R. Peripheral and central biodistribution of (111)In-labeled anti-beta-amyloid autoantibodies in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2009; 449: 240–245.
- Bae EJ, Lee HJ, Rockenstein E, Ho DH, Park E, Yang NY, Desplats P, Masliah E, Lee SJ. Antibody-aided clearance of extracellular  $\alpha$ -synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. *J Neurosci.* 2012; 32(39): 13454–13469.
- Bartels T, Ahlstrom LS, Leftin A, Kamp F, Haass C, Brown MF, Beyer K. The N-terminus of the intrinsically disordered protein  $\alpha$ -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J.* 2010; 99(7): 2116–2124.

- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ. alpha-Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature*. 2011; 477: 107–110.
- Bendor JT, Logan TP, Edwards RH. The function of  $\alpha$ -synuclein. *Neuron*. 2013; 79(6): 1044–1066.
- Bertler A, Rosengren E. Occurrence and distribution of dopamine in brain and other tissues. *Experientia*. 1959; 15: 10–11.
- Besong-Agbo D, Wolf E, Jessen F, Oechsner M, Hametner E, Poewe W, Reindl M, Oertel WH, Noelker C, Bacher M, Dodel R. Naturally occurring  $\alpha$ -synuclein autoantibody levels are lower in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2013; 80(2): 169–175.
- Bezard E, Przedborski S. A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2011; 26: 993–1002.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973; 33(11): 2643–2652.
- Biedler JL, Roffler-Tarlov S, Schachner M, Freedman LS. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res*. 1978; 38(11 Pt 1): 3751–3757.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O. Der L-Dioxyphenylalanineeffekt bei der Parkinson-Akinese. *Wien klin Wschr*. 1961; 73: 787–788.
- Bodner CR, Maltsev AS, Dobson CM, Bax A. Differential phospholipid binding of alpha-synuclein variants implicated in Parkinson's disease revealed by solution NMR spectroscopy. *Biochemistry*. 2010; 49(5): 862–871.
- Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003; 24: 197–211.
- Britschgi M, Olin CE, Johns HT, Takeda-Uchimura Y, LeMieux MC, Rufibach K, Rajadas J, Zhang H, Tomooka B, Robinson WH, Clark CM, Fagan AM, Galasko DR, Holtzman DM, Jutel M, Kaye JA, Lemere CA, Leszek J, Li G, Peskind ER, Quinn JF, Yesavage JA, Ghiso JA, Wyss-Coray T. Neuroprotective natural antibodies to assemblies of amyloidogenic peptides decrease with normal aging and advancing Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106: 12145–12150.
- Brody DL, Holtzman DM. Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders. *Annu Rev Neurosci*. 2008; 31: 175–193.
- Brys M, Fanning L, Hung S, Ellenbogen A, Penner N, Yang M, Welch M, Koenig E, David E, Fox T, Makh S, Aldred J, Goodman I, Pepinsky B, Liu Y, Graham D, Weihofen A, Cedarbaum JM. Randomized phase I clinical trial of anti-a-synuclein antibody B1B054. *Mov Disord*. 2019; 34(8): 1154–1163.

- Buchman VL, Hunter HJ, Pinon LG, Thompson J, Privalova EM, Ninkina NN, Davies AM. Persyn, a member of the synuclein family, has a distinct pattern of expression in the developing nervous system. *J Neurosci.* 1998; 18(22): 9335–9341.
- Burnet FM. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. *CA Cancer J Clin.* 1976; 26(2): 119–121.
- Burnette WN. „Western blotting“: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981; 112(2): 195–203.
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Südhof TC. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science.* 2010; 329(5999): 1663–1667.
- Campbell BC, McLean CA, Culvenor JG, Gai WP, Blumbergs PC, Jäkälä P, Beyreuther K, Masters CL, Li QX. The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2001; 76(1): 87–96.
- Campos-Acuña J, Elgueta D, Pacheco R. T-Cell-Driven Inflammation as a Mediator of the Gut-Brain Axis Involved in Parkinson's Disease. *Front Immunol.* 2019; 10: 239.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, Waldeck B. On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science.* 1958; 127: 471.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature.* 1957; 180: 1200.
- Carlsson A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. *Pharmacol Rev.* 1959; 11: 490–493.
- Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H, Yavich L. Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Res.* 2011; 1382: 37–44.
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC. Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell.* 2005; 123(3): 383–396.
- Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destée A. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet.* 2004; 364(9440): 1167–1169.
- Chen SY, Bagley J, Marasco WA. Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 1994; 5(5): 595–601.

- Cole NB, Murphy DD, Lebowitz J, Di Noto L, Levine RL, Nussbaum RL. Metal-catalyzed oxidation of alphasynuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments. *J Biol Chem.* 2005; 280: 9678–9690.
- Collier TJ, Kanaan NM, Kordower JH. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of nonhuman primates. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12: 359–366.
- Conway KA, Harper JD, Lansbury PT. Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med.* 1998; 4: 1318–1320.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 571–576.
- Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol.* 1942; 45: 159–170.
- Covy JP, Yuan W, Waxman EA, Hurtig HI, Van Deerlin VM, Giasson BI. Clinical and pathological characteristics of patients with leucine-rich repeat kinase-2 mutations. *Mov Disord.* 2009; 24(1): 32–39.
- Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M. Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci.* 2007; 27: 9220–9232.
- Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B. Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J Neurochem.* 2009; 111: 192–203.
- Danzer KM, Ruf WP, Putsch P, Joyner D, Hashimoto T, Glabe C, Hyman BT, McLean PJ. Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J.* 2011; 25: 326–336.
- Dehay B, Bourdenx M, Gorry P, Przedborski S, Vila M, Hunot S, Singleton A, Olanow CW, Merchant KM, Bezard E, Petsko GA, Meissner WG. Targeting alpha-synuclein for treatment of Parkinson's disease: mechanistic and therapeutic considerations. *Lancet Neurol.* 2015; 14(8): 855–866.
- Del Tredici K, Braak H. Review: Sporadic Parkinson's disease: development and distribution of a-synuclein pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016; 42(1): 33–50.

- Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H. Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61: 413–426.
- DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW. Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2008; 65(8): 1074–1080.
- Delrieu J, Ousset PJ, Caillaud C, Vellas B. Clinical trials in Alzheimer's disease: Immunotherapy approaches. *J Neurochem.* 2012; 120(Suppl. 1): 186–193.
- Desplats P, Lee HJ, Bae EJ, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee SJ. Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(31): 13010–13015.
- Dettmer U, Newman AJ, Luth ES, Bartels T, Selkoe D. In vivo cross-linking reveals principally oligomeric forms of  $\alpha$ -synuclein and  $\beta$ -synuclein in neurons and non-neural cells. *J Biol Chem.* 2013; 288(9): 6371–6385.
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie. Leitlinien online 2016. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Kapitel: Extrapyramidalmotorische Störungen. Idiopathisches Parkinson-Syndrom. [https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030010\\_LL\\_langfassung\\_ips\\_2016.pdf](https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030010_LL_langfassung_ips_2016.pdf) (Stand: 06.01.2021).
- Dickson DW, Fujishiro H, DelleDonne A, Menke J, Ahmed Z, Klos K, Josephs K, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Ahlskog JE. Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2008; 115(4): 437–444.
- Dickson DW. The pathogenesis of senile plaques. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997; 56: 321–339.
- Dodel R, Balakrishnan K, Keyvani K, Deuster O, Neff F, Andrei-Selmer LC, Röskam S, Stür C, Al-Abed Y, Noelker C, Balzer-Geldsetzer M, Oertel W, Du Y, Bacher M. Naturally occurring autoantibodies against beta-amyloid: investigating their role in transgenic animal and in vitro models of Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 2011; 31(15): 5847–5854.
- Dodel R, Du Y, Depboylu C, Hampel H, Frölich L, Haag A, Hemmeter U, Paulsen S, Teipel SJ, Brettschneider S, Spottke A, Nölker C, Möller HJ, Wei X, Farlow M, Sommer N, Oertel WH. Intravenous immunoglobulins containing antibodies against beta-amyloid for the treatment of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2004; 75: 1472–1474.
- Dodel R, Hampel H, Depboylu C, Lin S, Gao F, Schock S, Jäckel S, Wei X, Buerger K, Höft C, Hemmer B, Möller HJ, Farlow M, Oertel WH, Sommer N,



- Du Y. Human antibodies against amyloid beta peptide: a potential treatment for Alzheimer's disease. *Ann Neurol.* 2002; 52(2): 253–256.
- Dodel R, Rominger A, Bartenstein P, Barkhof F, Blennow K, Förster S, Winter Y, Bach JP, Popp J, Alferink J, Wiltfang J, Buerger K, Otto M, Antuono P, Jacoby M, Richter R, Stevens J, Melamed I, Goldstein J, Haag S, Wietek S, Farlow M, Jessen F. Intravenous immunoglobulin for treatment of mild-to-moderate Alzheimer's disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding trial. *Lancet Neurol.* 2013; 12(3): 233–243.
- Du Y, Dodel R, Hampel H, Buerger K, Lin S, Eastwood B, Bales K, Gao F, Moeller HJ, Oertel W, Farlow M, Paul S. Reduced levels of amyloid beta-peptide antibody in Alzheimer disease. *Neurology.* 2001; 57(5): 801–805.
- Du Y, Wei X, Dodel R, Sommer N, Hampel H, Gao F, Ma Z, Zhao L, Oertel WH, Farlow M. Human anti-beta-amyloid antibodies block beta-amyloid fibril formation and prevent beta-amyloid-induced neurotoxicity. *Brain.* 2003; 126(Pt 9): 1935–1939.
- Duda JE, Giasson BI, Chen Q, Gur TL, Hurtig HI, Stern MB, Gollomp SM, Ischiropoulos H, Lee VM, Trojanowski JQ. Widespread nitration of pathological inclusions in neurodegenerative synucleinopathies. *Am J Pathol.* 2000; 157(5): 1439–1445.
- Duffy PE, Tennyson VM. Phase and electron microscopic observations of Lewy bodies and melanin granules in the substantia nigra and locus coeruleus in Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1965; 24: 398–414.
- Duran R, Barrero FJ, Morales B, Luna JD, Ramirez M, Vives F. Plasma alpha-synuclein in patients with Parkinson's disease with and without treatment. *Mov Disord.* 2010; 25(4): 489–493.
- Ehringer H, Hornykiewicz O. Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wschr.* 1960; 38: 1236–1239.
- 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. Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J.* 2003; 17(13): 1945–1947.
- El-Agnaf OM, Salem SA, Paleologou KE, Curran MD, Gibson MJ, Court JA, Schlossmacher MG, Allsop D. Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J.* 2006; 20(3): 419–425.
- Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nat Clin Pract Rheumatol.* 2008; 4: 491–498.

- Fahn S, Elton RL. Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DM, Lieberman A. Recent development in Parkinson's disease. MacMillan Health Care Information, Florham Park, NJ. 1987; 153–163.
- Fauvet B, Mbefo MK, Fares MB, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N, Eliezer D, Moore DJ, Schneider B, Aebischer P, El-Agnaf OM, Masliah E, Lashuel HA.  $\alpha$ -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J Biol Chem*. 2012; 287(19): 15345–15364.
- Fetissov SO. Neuropeptide autoantibodies assay. *Methods Mol Biol*. 2011; 789: 295–302.
- Forno LS. Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Soc*. 1969; 17: 557–575.
- Foulds PG, Mitchell JD, Parker A, Turner R, Green G, Diggle P, Hasegawa M, Taylor M, Mann D, Allsop D. Phosphorylated  $\alpha$ -synuclein can be detected in blood plasma and is potentially a useful biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J*. 2011; 25(12): 4127–4137.
- Freichel C, Neumann M, Ballard T, Müller V, Woolley M, Ozmen L, Borroni E, Kretschmar HA, Haass C, Spooren W, Kahle PJ. Age-dependent cognitive decline and amygdala pathology in alpha-synuclein transgenic mice. *Neurobiol Aging*. 2007; 28(9): 1421–1435.
- Fuchs J, Tichopad A, Golub Y, Munz M, Schweitzer KJ, Wolf B, Berg D, Mueller JC, Gasser T. Genetic variability in the SNCA gene influences alpha-synuclein levels in the blood and brain. *FASEB J*. 2008; 22: 1327–1334.
- Gai WP, Yuan HX, Li XQ, Power JT, Blumbergs PC, Jensen PH. In situ and in vitro study of colocalization and segregation of alpha-synuclein, ubiquitin, and lipids in Lewy bodies. *Exp Neurol*. 2000; 166: 324–333.
- Gaig C, Martí MJ, Ezquerra M, Rey MJ, Cardozo A, Tolosa E. G2019S LRRK2 mutation causing Parkinson's disease without Lewy bodies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007; 78(6): 626–628.
- Galpern WR, Lang AE. Interface between tauopathies and synucleinopathies: a tale of two proteins. *Ann Neurol*. 2006; 59(3): 449–458.
- Gaskin F, Finley J, Fang Q, Xu S, Fu SM. Human antibodies reactive with beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *J Exp Med*. 1993; 177: 1181–1186.
- George J, Shoenfeld Y. Natural autoantibodies. In: Perer J, Shoenfeld Y (eds.). *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV. 1996: 534–539.
- George JM. The synucleins. *Genome Biol*. 2002; 3(1): REVIEWS3002.

- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM. A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem.* 2001; 276(4): 2380–2386.
- Gibb WR, Scott T, Lees AJ. Neuronal inclusions of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 1991; 6: 2–11.
- Goedert M, Spillantini MG. Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies. *Mol Psychiatry.* 1998; 3(6): 462–465.
- Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(7): 492–501.
- Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, van Hilten JJ, LaPelle N. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord.* 2008; 23(15): 2129–2170.
- Golbe LI, Di Iorio G, Bonavita V, Miller DC, Duvoisin RC. A large kindred with autosomal dominant Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 1990; 27(3): 276–282.
- Gold M, Koczulla AR, Mengel D, Koepke J, Dodel R, Dontcheva G, Habib P, Bach JP. Reduction of glutamate-induced excitotoxicity in murine primary neurons involving calpain inhibition. *J Neurol Sci.* 2015; 359(1–2): 356–362.
- Gold M, Pul R, Bach JP, Stangel M, Dodel R. Pathogenic and physiological autoantibodies in the central nervous system. *Immunological Reviews.* 2012; 248: 68–86.
- Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Sanders JL, Hyman BT. Alpha-synuclein immuno-reactivity in dementia with Lewy bodies: Morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. *Acta Neuropathol.* 2000; 99: 352–357.
- Gros-Louis F, Soucy G, Larivière R, Julien JP. Intracerebroventricular infusion of monoclonal antibody or its derived Fab fragment against misfolded forms of SOD1 mutant delays mortality in a mouse model of ALS. *J Neurochem.* 2010; 113: 1188–1199.
- Gruden MA, Sewell RD, Yanamandra K, Davidova TV, Kucheryanu VG, Bocharov EV, Bocharova OA, Polyschuk VV, Sherstnev VV, Morozova-Roche LA. Immunoprotection against toxic biomarkers is retained during Parkinson's disease progression. *J Neuroimmunol.* 2011; 233: 221–227.
- Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J. The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol.* 2008; 115: 409–415.

- Harding AJ, Halliday GM. Cortical Lewy body pathology in the diagnosis of dementia. *Acta Neuropathol.* 2001; 102: 355–363.
- Harper JD, Lieber CM, Lansbury PT Jr. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-beta protein. *Chem Biol.* 1997; 4: 951–959.
- Hassler R. Zur Pathologie der Paralysis agitans und des postenzephalitischen Parkinsonismus. *J Psychol Neurol.* 1938; 48: 387–486.
- Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression, and mortality. *Neurology.* 1967; 17: 427–442.
- Holmes C, Boche D, Wilkinson D, Yadegarfar G, Hopkins V, Bayer A, Jones RW, Bullock R, Love S, Neal JW, Zotova E, Nicoll JA. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial. *Lancet.* 2008; 372(9634): 216–223.
- Howell MJ, Schenck CH. Rapid Eye Movement Sleep Behavior Disorder and Neurodegenerative Disease. *JAMA Neurol.* 2015; 72(6): 707–712.
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1992; 55: 181–184.
- Istrin G, Bosis E, Solomon B. Intravenous immunoglobulin enhances the clearance of fibrillar amyloid-beta peptide. *J Neurosci Res.* 2006; 84: 434–443.
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron.* 1995; 14(2): 467–475.
- Jakes R, Spillantini MG, Goedert M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett.* 1994; 345(1): 27–32.
- 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. Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- $\alpha$ -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* 2018; 75(10): 1206–1214.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry.* 1993; 32: 4693–4697.
- Jellinger KA. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm.* 2004; 111(10–11): 1219–1235.

- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Schindzielorz A, Okochi M, Leimer U, van der Putten H, Probst A, Kremmer E, Kretschmar HA, Haass C. Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain. *J Neurosci.* 2000; 20(17): 6365–6373.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Jacobsen H, Spooren W, Fuss B, Mallon B, Macklin WB, Fujiwara H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Kretschmar HA, Haass C. Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes. *EMBO Rep.* 2002; 3(6): 583–588.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Müller V, Odoj S, Okamoto N, Jacobsen H, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Takahashi H, Wakabayashi K, Bogdanovic N, Riederer P, Kretschmar HA, Haass C. Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am J Pathol.* 2001; 159(6): 2215–2225.
- Kasaian MT, Casali P. Autoimmunity-prone B-1 (CD5 B) cells, natural antibodies and self recognition. *Autoimmunity.* 1993; 15: 315–329.
- Kayed R, Canto I, Breydo L, Rasool S, Lukacsovich T, Wu J, Albay R 3rd, Pensalfini A, Yeung S, Head E, Marsh JL, Glabe C. Conformation dependent monoclonal antibodies distinguish different replicating strains or conformers of prefibrillar A $\beta$  oligomers. *Mol Neurodegener.* 2010; 5: 57.
- Kayed R, Head E, Thompson JL, McIntire TM, Milton SC, Cotman CW, Glabe C. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science.* 2003; 300(5618): 486–489.
- Kempster PA, Hurwitz B, Lees AJ. A new look at James Parkinson's Essay on the Shaking Palsy. *Neurology.* 2007; 69: 482–485.
- Kim S, Kwon SH, Kam TI, Panicker N, Karuppagounder SS, Lee S, Lee JH, Kim WR, Kook M, Foss CA, Shen C, Lee H, Kulkarni S, Pasricha PJ, Lee G, Pomper MG, Dawson VL, Dawson TM, Ko HS. Transneuronal Propagation of Pathologic  $\alpha$ -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. *Neuron.* 2019; 103(4): 627–641.
- Kofler J, Lopresti B, Janssen C, Trichel AM, Masliah E, Finn OJ, Salter RD, Murdoch GH, Mathis CA, Wiley CA. Preventive immunization of aged and juvenile non-human primates to  $\beta$ -amyloid. *J Neuroinflammation.* 2012; 9: 84.
- Kosaka K. Lewy bodies in cerebral cortex. Report of three cases. *Acta Neuropathol.* 1978; 42: 127–134.
- Kotzbauer PT, Cairns NJ, Campbell MC, Willis AW, Racette BA, Tabbal SD, Perlmutter JS. Pathologic accumulation of alpha-synuclein and abeta in parkinson disease patients with dementia. *Arch Neurol.* 2012; 69(10): 1326–1331.

- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Eppelen JT, Schöls L, Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet.* 1998; 18: 106–108.
- Lacroix-Desmazes S, Kaveri SV, Mouthon L, Ayoub A, Malanchère E, Coutinho A, Kazatchkine MD. Self-reactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J Immunol Methods.* 1998; 216: 117–137.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227(5259): 680–685.
- Lecerf JM, Shirley TL, Zhu Q, Kazantsev A, Amersdorfer P, Housman DE, Messer A, Huston JS. Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(8): 4764–4769.
- Lee HJ, Choi C, Lee SJ. Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem.* 2002; 277(1): 671–678.
- Lee HJ, Suk JE, Patrick C, Bae EJ, Cho JH, Rho S, Hwang D, Masliah E, Lee SJ. Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. *J Biol Chem.* 2010; 285: 9262–9272.
- Leng Y, Chase TN, Bennett MC. Muscarinic receptor stimulation induces translocation of an alpha-synuclein oligomer from plasma membrane to a light vesicle fraction in cytoplasm. *J Biol Chem.* 2001; 276: 28212–28218.
- Lennox G, Lowe J, Morrell K, Landon M, Mayer RJ. Anti-ubiquitin immunocytochemistry is more sensitive than conventional techniques in the detection of diffuse Lewy body disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989; 52: 67–71.
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R, Verny C, Brice A; French Parkinson's Disease Genetics Study Group. G51D  $\alpha$ -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol.* 2013; 73(4): 459–471.
- Lewy FH. Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In: Lewandowski M, Abelsdorff G (eds.). *Handbuch der Neurologie* Vol. 3. Springer Verlag Berlin 1912; 920–933.
- Loeffler DA. Intravenous immunoglobulin and Alzheimer's disease: what now? *J Neuroinflammation.* 2013; 10: 70.
- Li QX, Mok SS, Laughton KM, McLean CA, Cappai R, Masters CL, Culvenor JG, Horne MK. Plasma alpha-synuclein is decreased in subjects with Parkinson's disease. *Exp Neurol.* 2007; 204(2): 583–588.

- Lippa CF, Fujiwara H, Mann DM, Giasson B, Baba M, Schmidt ML, Nee LE, O'Connell B, Pollen DA, St George-Hyslop P, Ghetti B, Nochlin D, Bird TD, Cairns NJ, Lee VM, Iwatsubo T, Trojanowski JQ. Lewy bodies contain altered alpha-synuclein in brains of many familial Alzheimer's disease patients with mutations in presenilin and amyloid precursor protein genes. *Am J Pathol.* 1998; 153(5): 1365–1370.
- Liu B, Fang F, Pedersen NL, Tillander A, Ludvigsson JF, Ekblom A, Svenningsson P, Chen H, Wirdefeldt K. Vagotomy and Parkinson disease: A Swedish register-based matched-cohort study. *Neurology.* 2017; 88(21): 1996–2002.
- Liu CW, Giasson BI, Lewis KA, Lee VM, DeMartino GN, Thomas PJ. A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation-implications for pathogenesis of Parkinson disease. *J Biol Chem.* 2005; 280: 22670–22678.
- Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(47): 20051–20056.
- Lutz HU, Binder CJ, Kaveri S. Naturally occurring auto-antibodies in homeostasis and disease. *Trends Immunol.* 2009; 30(1): 43–51.
- Lynch SM, Zhou C, Messer A. An scFv intrabody against the nonamyloid component of alpha-synuclein reduces intracellular aggregation and toxicity. *J Mol Biol.* 2008; 377(1): 136–147.
- Madej T, Lanczycki CJ, Zhang D, Thiessen PA, Geer RC, Marchler-Bauer A, Bryant SH. MMDB and VAST+: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(Database issue): D297–303.
- Maetzler W, Apel A, Langkamp M, Deuschle C, Dilger SS, Stirnkorb JG, Schulte C, Schleicher E, Gasser T, Berg D. Comparable Autoantibody Serum Levels against Amyloid- and Inflammation-Associated Proteins in Parkinson's Disease Patients and Controls. *PLoS One.* 2014; 9(2): e88604.
- Mandal PK, Pettegrew JW. Alzheimer's disease: NMR studies of asialo (GM1) and trisialo (GT1b) ganglioside interactions with A beta(1–40) peptide in a membrane mimic environment. *Neurochem Res.* 2004; 29: 447–453.
- 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. Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. *Acta Neuropathol.* 2014; 127(6): 861–879.

- Marchalonis JJ, Adelman MK, Schluter SF, Ramsland PA. The antibody repertoire in evolution: chance, selection, and continuity. *Dev Comp Immunol.* 2006; 30(1–2): 223–247.
- Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH. Synuclein – A Neuron-Specific Protein Localized to the Nucleus and Presynaptic Nerve-Terminal. *J Neurosci.* 1988; 8: 2804–2815.
- Marsden CD. Parkinson's disease. *Lancet.* 1990; 335: 948–952.
- Masliah E, Rockenstein E, Adame A, Alford M, Crews L, Hashimoto M, Seubert P, Lee M, Goldstein J, Chilcote T, Games D, Schenk D. Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. *Neuron.* 2005; 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. Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. *PLoS One.* 2011; 6(4): e19338.
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Sagara Y, Mallory M, Hashimoto M, Mucke L. Beta-amyloid peptides enhance alpha-synuclein accumulation and neuronal deficits in a transgenic mouse model linking Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98(21): 12245–12250.
- Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82: 4245–4249.
- Mata IF, Shi M, Agarwal P, Chung KA, Edwards KL, Factor SA, Galasko DR, Ghingina C, Griffith A, Higgins DS, Kay DM, Kim H, Leverenz JB, Quinn JF, Roberts JW, Samii A, Snapinn KW, Tsuang DW, Yearout D, Zhang J, Payami H, Zabetian CP. SNCA variant associated with Parkinson disease and plasma alpha-synuclein level. *Arch Neurol.* 2010; 67: 1350–1356.
- McFarthing K, Simuni T. Clinical Trial Highlights: Targetting Alpha-Synuclein. *J Parkinsons Dis.* 2019; 9(1):5–16.
- McKeith IG, Burn DJ, Ballard CG, Collerton D, Jaros E, Morris CM, McLaren A, Perry EK, Perry R, Piggott MA, O'Brien JT. Dementia with Lewy bodies. *Semin Clin Neuropsychiatry.* 2003; 8: 46–57.
- McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK, Aarsland D, Arai H, Ballard CG, Boeve B, Burn DJ, Costa D, Del Ser T, Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I,



- Londos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M. Consortium on DLB. Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology*. 2005; 65(12): 1863–1872.
- Mengel D, Röskam S, Neff F, Balakrishnan K, Deuster O, Gold M, Oertel WH, Bacher M, Bach JP, Dodel R. Naturally occurring autoantibodies interfere with  $\beta$ -amyloid metabolism and improve cognition in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease 24 h after single treatment. *Transl Psychiatry*. 2013; 3: e236.
- Merbl Y, Zucker-Toledano M, Quintana FJ, Cohen IR. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest*. 2007; 117(3): 712–718.
- Mollenhauer B, El-Agnaf OM, Marcus K, Trenkwalder C, Schlossmacher MG. Quantification of  $\alpha$ -synuclein in cerebrospinal fluid as a biomarker candidate: review of the literature and considerations for future studies. *Biomark Med*. 2010; 4(5): 683–699.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal Biochem*. 1989; 177(2): 244–249.
- Narhi L, Wood SJ, Steavenson S, Jiang Y, Wu GM, Anafi D, Kaufman SA, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis JC, Wypych J, Biere AL, Citron M. Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. *J Biol Chem*. 1999; 274(14): 9843–9846.
- Näsström T, Gonçalves S, Sahlin C, Nordström E, Screpanti Sundquist V, Lannfelt L, Bergström J, Outeiro TF, Ingelsson M. Antibodies against alpha-synuclein reduce oligomerization in living cells. *PLoS One*. 2011; 6(10): e27230.
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH. Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron*. 2010; 65(1): 66–79.
- Neumann M, Müller V, Görner K, Kretzschmar HA, Haass C, Kahle PJ. Pathological properties of the Parkinson's disease-associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta Neuropathol*. 2004; 107(6): 489–496.
- Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM, McCluskey LF, Miller BL, Masliah E, Mackenzie IR, Feldman H, Feiden W, Kretzschmar HA,

- Trojanowski JQ, Lee VM. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*. 2006; 314(5796): 130–133.
- Noguchi-Shinohara M, Tokuda T, Yoshita M, Kasai T, Ono K, Nakagawa M, El-Agnaf OM, Yamada M. CSF alpha-synuclein levels in dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease. *Brain Res*. 2009; 1251: 1–6.
- Notkins AL. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol*. 2004; 25: 174–179.
- Oertel W, Schulz JB. Current and experimental treatments of Parkinson disease: A guide for neuroscientists. *J Neurochem*. 2016; 139(Suppl 1): 325–337.
- Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, Jouanny P, Dubois B, Eisner L, Flitman S, Michel BF, Boada M, Frank A, Hock C. Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. *Neurology*. 2003; 61(1): 46–54.
- Outeiro TF, Putcha P, Tetzlaff JE, Spoelgen R, Koker M, Carvalho F, Hyman BT, McLean PJ. Formation of toxic oligomeric alpha-synuclein species in living cells. *PLoS One*. 2008; 3: e1867.
- Paik SR, Shin HJ, Lee JH, Chang CS, Kim J. Copper(II)-induced self oligomerisation of alpha-synuclein. *Biochem J*. 1999; 340: 821–828.
- Pakkenberg B, Moller A, Gundersen HJ, Mouritzen DA, Pakkenberg H. The absolute number of nerve cells in substantia nigra in normal subjects and in patients with Parkinson's disease estimated with an unbiased stereological method. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991; 54: 30–33.
- Paleologou KE, Kragh CL, Mann DM, Salem SA, Al-Shami R, Allsop D, Hassan AH, Jensen PH, El-Agnaf OM. Detection of elevated levels of soluble alpha-synuclein oligomers in post-mortem brain extracts from patients with dementia with Lewy bodies. *Brain*. 2009; 132: 1093–1101.
- Pankiewicz J, Prelli F, Sy MS, Kascsak RJ, Kascsak RB, Spinner DS, Carp RI, Meeker HC, Sadowski M, Wisniewski T. Clearance and prevention of prion infection in cell culture by anti-PrP antibodies. *Eur J Neurosci*. 2006; 23(10): 2635–2647.
- Papachroni KK, Ninkina N, Papapanagiotou A, Hadjigeorgiou GM, Xiromerisiou G, Papadimitriou A, Kalofoutis A, Buchman VL. Autoantibodies to alpha-synuclein in inherited Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2007; 101(3): 749–756.
- Parkinson J. *An Essay on the Shaking Palsy*. In: Sherwood, Neely & Jones, London, 1817.

- Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I. Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol*. 2005; 57: 82–91.
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, Tienari PJ, Pöyhönen M, Paetau A. Novel  $\alpha$ -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging*. 2014; 35(9): 2180. e1-5.
- Patrias LM, Klaver AC, Coffey MP, Loeffler DA. Specific antibodies to soluble alpha-synuclein conformations in intravenous immunoglobulin preparations. *Clin Exp Immunol*. 2010; 161(3): 527–535.
- Periquet M, Fulga T, Myllykangas L, Schlossmacher MG, Feany MB. Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. *J Neurosci*. 2007; 27(12): 3338–3346.
- Polymeropoulos MH, Higgins JJ, Golbe LI, Johnson WG, Ide SE, Di Iorio G, Sanges G, Stenroos ES, Pho LT, Schaffer AA, Lazzarini AM, Nussbaum RL, Duvoisin RC. Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. *Science*. 1996; 274(5290): 1197–1199.
- 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 W, Lazzarini AM, Duvoisin R, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 1997; 276(5321): 2045–2047.
- Pramstaller PP, Schlossmacher MG, Jacques TS, Scaravilli F, Eskelson C, Pepivani I, Hedrich K, Adel S, Gonzales-McNeal M, Hilker R, Kramer PL, Klein C. Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkinson mutation carriers. *Ann Neurol*. 2005; 58: 411–422.
- Ramaker C, Marinus J, Stiggelbout AM, van Hilten BJ. Systematic evaluation of rating scales for impairment and disability in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 2002; 17: 867–876.
- Relkin NR, Szabo P, Adamiak B, Burgut T, Monthe C, Lent RW, Younkin S, Younkin L, Schiff R, Weksler ME. 18-Month study of intravenous immunoglobulin for treatment of mild Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*. 2009; 30: 1728–1736.
- Reynolds AD, Stone DK, Hutter JA, Benner EJ, Mosley RL, Gendelman HE. Regulatory T cells attenuate Th17 cell-mediated nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *J Immunol*. 2010; 184: 2261–2271.

- Rodriguez JA, Ivanova MI, Sawaya MR, Cascio D, Reyes FE, Shi D, Sangwan S, Guenther EL, Johnson LM, Zhang M, Jiang L, Arbing MA, Nannenga BL, Hattne J, Whitelegge J, Brewster AS, Messerschmidt M, Boutet S, Sauter NK, Gonen T, Eisenberg DS. Structure of the toxic core of  $\alpha$ -synuclein from invisible crystals. *Nature*. 2015; 525(7570): 486–490.
- Roettger Y, Du Y, Bacher M, Zerr I, Dodel R, Bach JP. Immunotherapy in prion disease. *Nat Rev Neurol*. 2013; 9(2): 98–105.
- Ross CA, Tabrizi SJ. Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*. 2011; 10(1): 83–98.
- Rutherford NJ, Moore BD, Golde TE, Giasson BI. Divergent effects of the H50Q and G51D SNCA mutations on the aggregation of  $\alpha$ -synuclein. *J Neurochem*. 2014; 131(6): 859–867.
- Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, Arai T, Nagura H, Yamanouchi H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Murayama S. Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62(6): 644–654.
- Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004; 63: 742–749.
- Sampson TR, Debelius JW, Thron T, Janssen S, Shastri GG, Ilhan ZE, Challis C, Schretter CE, Rocha S, Gradinaru V, Chesselet M, Keshavarzian A, Shannon KM, Krajmalnik-Brown R, Wittung-Stafshede P, Knight R, Mazmanian SK. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. *Cell*. 2016; 167(6): 1469–1480.
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K, Kholodenko D, Lee M, Liao Z, Lieberburg I, Motter R, Mutter L, Soriano F, Shopp G, Vasquez N, Vandeventer C, Walker S, Wogulis M, Yednock T, Games D, Seubert P. Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*. 1999; 400(6740): 173–177.
- Schneeberger A, Mandler M, Mattner F, Schmidt W. Vaccination for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*. 2012; 18(Suppl. 1): 11–13.
- Schneeberger A, Tierney L, Mandler M. Active immunization therapies for Parkinson's disease and multiple system atrophy. *Mov Disord*. 2016; 31: 214–224.
- Selkoe DJ. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature*. 1999; 399: A23–A31.
- Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, Dunstan R, Salloway S, Chen T, Ling Y, O'Gorman J, Qian F, Arastu M, Li M,

- Chollate S, Brennan MS, Quintero-Monzon O, Scannevin RH, Arnold HM, Engber T, Rhodes K, Ferrero J, Hang Y, Mikulskis A, Grimm J, Hock C, Nitsch RM, Sandrock A. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016; 537(7618): 50–56.
- Shao HY, Jao SC, Ma K, Zagorski MG. Solution structures of micelle-bound amyloid beta-(1–40) and beta-(1–42) peptides of Alzheimer's disease. *J Mol Biol*. 1999; 285: 755–773.
- Sharon R, Bar-Joseph I, Frosch MP, Walsh DM, Hamilton JA, Selkoe DJ. The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease. *Neuron* 2003; 37: 583–595.
- Shibayama-Imazu T, Okahashi I, Omata K, Nakajo S, Ochiai H, Nakai Y, Hama T, Nakamura Y; Nakaya K. Cell and tissue distribution and developmental change of neuron specific 14 kDa protein (phosphoneuroprotein 14). *Brain Res*. 1993; 622: 17–25.
- Shoenfeld Y, Gershwin ME, Meroni PL. *Autoantibodies*. New York: Elsevier Science & Technology. 2006.
- Sigurdsson EM. Immunotherapy targeting pathological tau protein in Alzheimer's disease and related tauopathies. *J Alzheimers Dis*. 2008; 15: 157–168.
- 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, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K. alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science*. 2003; 302(5646): 841.
- Skovronsky DM, Lee VM, Trojanowski JQ. Neurodegenerative diseases: new concepts of pathogenesis and their therapeutic implications. *Annu Rev Pathol*. 2006; 1: 151–170.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson B, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985; 150: 76–85.
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M. Alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95(11): 6469–6473.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M. Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. 1997; 388(6645): 839–840.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol*. 1990; 182: 50–68.
- Szabo P, Mujalli DM, Rotondi ML, Sharma R, Weber A, Schwarz HP, Weksler ME, Relkin N. Measurement of anti-beta amyloid antibodies in human blood. *J Neuroimmunol*. 2010; 227(1–2): 167–174.

- Takahashi H, Wakabayashi K. The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology*. 2001; 21(4): 315–322.
- Tetzlaff JE, Putcha P, Outeiro TF, Ivanov A, Berezovska O, Hyman BT, McLean PJ. CHIP targets toxic alphasynuclein oligomers for degradation. *J Biol Chem*. 2008; 283: 17962–17968.
- Tobe T, Nakajo S, Tanaka A, Mitoya A, Omata K, Nakaya K, Tomita M, Nakamura Y. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel brain-specific 14-kDa protein. *J Neurochem*. 1992; 59(5): 1624–1629.
- Tofaris GK, Spillantini MG. Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. *Mov Disord*. 2005; 20(Suppl 12): 37–44.
- Tofaris GK, Spillantini MG. Physiological and pathological properties of alpha-synuclein. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 2194–2201.
- Tokuda T, Qureshi MM, Ardah MT, Varghese S, Shehab SA, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf OM. Detection of elevated levels of alpha-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2010; 20: 1766–1772.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(9): 4350–4354.
- Townsend M, Shankar GM, Mehta T, Walsh DM, Selkoe DJ. Effects of secreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers. *J Physiol*. 2006; 572(Pt 2): 477–492.
- Tretiakoff C. Contribution à l'étude de l'anatomie pathologique du locus niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. Thesis, Univ. Paris 1919.
- Trexler AJ, Rhoades E. N-Terminal acetylation is critical for forming  $\alpha$ -helical oligomer of  $\alpha$ -synuclein. *Protein Sci*. 2012; 21(5): 601–605.
- Tu PH, Galvin JE, Baba M, Giasson B, Tomita T, Leight S, Nakajo S, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Lee VM. Glial cytoplasmic inclusions in white matter oligodendrocytes of multiple system atrophy brains contain insoluble alpha-synuclein. *Ann Neurol*. 1998; 44(3): 415–422.
- Tyedmiers J, Mogk A, Bukau B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010; 11: 777–788.
- Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T. Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(23): 11282–11286.

- Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL. Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem.* 2005; 280: 9595–9603. Protein-darstellung über iCn3D der Molecular Modeling Database (MMDB) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) mit Darstellung von *1XQ8, human micelle-bound alpha-synuclein.*  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/pdb/1XQ8> (Stand: 06.01.2021).
- Uversky VN, Li J, Fink AL. Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem.* 2001; 276(14): 10737–10744.
- Uversky VN, Li J, Souillac P, Millett IS, Doniach S, Jakes R, Goedert M, Fink AL. Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins. *J Biol Chem.* 2002; 277(14): 11970–11978.
- Valera E, Masliah E. Immunotherapy for neurodegenerative diseases: focus on  $\alpha$ -synucleinopathies. *Pharmacol Ther.* 2013; 138(3): 311–322.
- Vamvaca K, Lansbury PT Jr, Stefanis L. N-terminal deletion does not affect  $\alpha$ -synuclein membrane binding, self-association and toxicity in human neuroblastoma cells, unlike yeast. *J Neurochem.* 2011; 119(2): 389–397.
- Van de Warrenburg BP, Lammens M, Lücking CB, Denèfle P, Wesseling P, Booij J, Praamstra P, Quinn N, Brice A, Horstink MW. Clinical and pathologic abnormalities in a family with parkinsonism and parkin gene mutations. *Neurology.* 2001; 56: 555–557.
- Von Campenhausen S, Bornschein B, Wick R, Bötzel K, Sampaio C, Poewe W, Oertel W, Siebert U, Berger K, Dodel R. Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. *European Neuropsychopharmacology.* 2005; 15: 473–490.
- Wakabayashi K, Hayashi S, Kakita A, Yamada M, Toyoshima Y, Yoshimoto M, Takahashi H. Accumulation of  $\alpha$ -synuclein/NACP is a cytopathological feature common to Lewy body disease and multiple system atrophy. *Acta Neuropathol.* 1998; 96: 445–452.
- Wang W, Perovic I, Chittuluru J, Kaganovich A, Nguyen LT, Liao J, Auclair JR, Johnson D, Landeru A, Simorellis AK, Ju S, Cookson MR, Asturias FJ, Agar JN, Webb BN, Kang C, Ringe D, Petsko GA, Pochapsky TC, Hoang QQ. A soluble  $\alpha$ -synuclein construct forms a dynamic tetramer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108(43): 17797–17802.
- Weihofen A, Liu Y, Arndt JW, Huy C, Quan C, Smith BA, Baeriswyl JL, Cavegn N, Senn L, Su L, Marsh G, Auluck PK, Montrasio F, Nitsch RM, Hirst WD, Cedarbaum JM, Pepinsky RB, Grimm J, Weinreb PH. Development of an aggregate-selective, human-derived alpha-synuclein antibody B1B054 that

- ameliorates disease phenotypes in Parkinson's disease models. *Neurobiology of Disease*. 2019; 124: 276–288.
- Weintraub D, Comella CL, Horn S. Parkinson's disease – Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care*. 2008; 14(2 Suppl): 40–48.
- Weksler ME, Relkin N, Turkenich R, LaRusse S, Zhou L, Szabo P. Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol*. 2002; 37: 943–948.
- White AR, Enever P, Tayebi M, Mushens R, Linehan J, Brandner S, Anstee D, Collinge J, Hawke S. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature*. 2003; 422(6927): 80–83.
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, Tzitzilonis C, Soragni A, Jessberger S, Mira H, Consiglio A, Pham E, Masliah E, Gage FH, Riek R. In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011; 108(10): 4194–4199.
- Wisniewski T, Konietzko U. Amyloid-beta immunisation for Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2008; 7: 805–811.
- Wolfgang WJ, Miller TW, Webster JM, Huston JS, Thompson LM, Marsh JL, Messer A. Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102(32): 11563–11568.
- Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis JC, Citron M, Biere AL. Alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Biol Chem*. 1999; 274(28): 19509–19012.
- Yamazaki M, Arai Y, Baba M, Iwatsubo T, Mori O, Katayama Y, Oyanagi K. Alpha-synuclein inclusions in amygdala in the brains of patients with the parkinsonism-dementia complex of Guam. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000; 59(7): 585–591.
- Yanamandra K, Gruden MA, Casaite V, Meskys R, Forsgren L, Morozova-Roche LA. Alpha-synuclein reactive antibodies as diagnostic biomarkers in blood sera of Parkinson's disease patients. *PLoS One*. 2011; 6(4): e18513.
- Yokota O, Terada S, Ishizu H, Ujike H, Ishihara T, Nakashima H, Yasuda M, Kitamura Y, Ueda K, Checler F, Kuroda S. NACP/alpha-synuclein, NAC and beta-amyloid pathology of familial Alzheimer's disease with the E184D presenilin-1 mutation: a clinicopathological study of two autopsy cases. *Acta Neuropathol*. 2002; 104: 637–648.



- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz DG, de Yébenes JG. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol.* 2004; 55(2): 164–173.
- Zhang W, Wang T, Pei Z, Miller DS, Wu X, Block ML, Wilson B, Zhang W, Zhou Y, Hong JS, Zhang J. Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. *FASEB J.* 2005; 19: 533–542.
- Zhou C, Emadi S, Sierks MR, Messer A. A human single-chain Fv intrabody blocks aberrant cellular effects of overexpressed alpha-synuclein. *Mol Ther.* 2004; 10(6): 1023–1031.

**8. ANHANG****8.1 TABELLENVERZEICHNIS**

	<i>Seite</i>
Tab. 1: Liste der verwendeten Geräte und Anlagen .....	16
Tab. 2: Aufstellung über die verwendeten Materialien .....	17
Tab. 3: Aufstellung über die in der Arbeit verwendeten Kits .....	19
Tab. 4: Aufstellung über die in der Arbeit verwendeten Antikörper und Proteine .....	19
Tab. 5: Übersicht über die verwendeten Zellen .....	21
Tab. 6: Verwendete Zellkulturmaterialien .....	21
Tab. 7: In dieser Arbeit verwendetes humanes Probenmaterial .....	30
Tab. 8: Die histopathologischen Ergebnisse im Überblick .....	45
Tab. 9: Die Ergebnisse im Immunoblot im Überblick .....	59
Tab. 10: Die histopathologischen Eigenschaften von AD, DLK und PS im Überblick .....	63

**8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

	<i>Seite</i>
Abb. 1: Die Braak-Stadien beim IPS .....	7
Abb. 2: Humanes alpha-Synuclein .....	9
Abb. 3: Schematische Darstellung der Synucleinpeptide .....	37
Abb. 4: Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S in der Zellkultur an der humanen Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y .....	39
Abb. 5: Histologische Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz bzw. Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S in murinen Hirnproben des transgenen $\alpha$ S Tiermodells (Thy1)-h[A30P] .....	41
Abb. 6: Histologische Untersuchungen mittels Immunhistochemie gegen humanes $\alpha$ S in humanen Hirngewebebeobungen .....	43, 44
Abb. 7: Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen $\alpha$ S, $\beta$ S und $\gamma$ S .....	47
Abb. 8: Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen $\alpha$ S und die $\alpha$ S-Punktmutationen $\alpha$ S A30P, $\alpha$ S E46K sowie $\alpha$ S A53T .....	49
Abb. 9: Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. MAK- $\alpha$ S im Immunoblot gegen $\alpha$ S und die $\alpha$ S-Peptidabschnitte $\alpha$ S <sub>1-60</sub> , $\alpha$ S <sub>1-95</sub> , $\alpha$ S <sub>61-140</sub> , $\alpha$ S <sub>96-140</sub> .....	51
Abb. 10: Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S im Immunoblot gegen höher aggregierte Strukturen / Oligomere / Fibrillen von $\alpha$ S, $\beta$ S, $\gamma$ S, der $\alpha$ S Peptidabschnitte $\alpha$ S <sub>1-60</sub> , $\alpha$ S <sub>1-95</sub> , $\alpha$ S <sub>61-140</sub> , $\alpha$ S <sub>96-140</sub> sowie der $\alpha$ S-Punktmutationen $\alpha$ S A30P, $\alpha$ S E46K und $\alpha$ S A53T .....	54
Abb. 11: Darstellung der Antigen-Antikörper-Interaktion mittels nAbs- $\alpha$ S bzw. nAbs-A $\beta$ im Immunoblot gegen $\alpha$ S, $\beta$ S, $\gamma$ S und A $\beta$ .....	57

## 8.3 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

$\alpha$ S	$\alpha$ -Synuclein = alpha-Synuclein
$\alpha$ -Syn	$\alpha$ -Synuclein = alpha-Synuclein
$\beta$ S	$\beta$ -Synuclein = beta-Synuclein = Phosphoneuroprotein 14
$\gamma$ S	$\gamma$ -Synuclein = gamma-Synuclein = <i>breast cancer-specific gene 1</i>
a.e.	am ehesten
A30P	Alanin-30-Prolin-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
A53E	Alanin-53-Glutaminsäure-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
A53T	Alanin-53-Threonin-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
Abb.	Abbildung
ABC	<i>avidin-biotinylated-enzyme complex</i>
Abs- $\alpha$ S	Antikörper gegen humanes alpha-Synuclein
AD	Demenz vom Alzheimer Typ, Alzheimer Demenz
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AS	Aminosäure(n)
A $\beta$	Amyloid $\beta$ = Amyloid-beta
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
ca.	circa
CJD	<i>Creutzfeld-Jacob disease</i>
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i>
D	Dimer(e)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DLK	Demenz mit Lewykörpern
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
E46K	Glutaminsäure-46-Lysin-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
engl.	englisch
evtl.	eventuell

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

---

F	Fibrille(n)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
G51D	Glycin-51-Asparaginsäure-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
H50Q	Histidin-50-Glutamin-Punktmutation im alpha-Synuclein Gen
h	<i>hour</i>
HD	<i>Huntington disease</i>
hD	<i>healthy donor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
i.d.R.	in der Regel
i.S.	im Sinne
i.v.	intravenös
IB	Immunoblot
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin(e)
IHC	Immunhistochemie
insb.	insbesondere
IPS	Idiopathisches Parkinson Syndrom
IVIG	intravenöse Immunglobuline
kDa	Kilodalton
lat.	lateinisch
LB	<i>lewy bodies</i>
LB-li	<i>lewy body like inclusions</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LN	Lewy-Neuriten
M	Monomer(e)
M.O.M.	<i>mouse on mouse</i>
mA	Milliampere
MAK	monoklonaler Antikörper
MAK-αS	monoklonaler Antikörper gegen humanes alpha-Synuclein
max.	maximal
MDS	<i>Movement Disorder Society</i>
mg	Milligramm

### 8.3 Abkürzungsverzeichnis

---

MilliQ	Reinstwasser Typ I = deionisiertes Wasser
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	millimolar
MMDB	<i>Molecular Modeling Database</i>
MSA	<i>Multiple system atrophy</i>
MW	<i>molecular weight</i>
n.g.	nicht gezeigt
n.u.	nicht untersucht
nAbs	natürlich vorkommende Autoantikörper
nAbs-A $\beta$	natürlich vorkommende Autoantikörper gegen humanes Amyloid beta
nAbs- $\alpha$ S	natürlich vorkommende Autoantikörper gegen humanes alpha-Synuclein
NAC	<i>non-amyloid <math>\beta</math> component of Alzheimer diseases amyloid</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCT	<i>Number of a clinical trial</i> = studienspezifische, eindeutige NCT Nummer aus dem Register für klinische Studien von <i>ClinicalTrials.gov</i>
nm	Nanometer
O	Oligomer(e)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS + Tween
PD	<i>Parkinson disease</i>
PDL	Poly-D-Lysin
PEN-STREP	Penicillin-Streptomycin-Mischung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PNS	Peripheres Nervensystem
PrP	Prion-Protein
PS	Parkinson Syndrom
PSP	<i>Progressive supranuclear palsy</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBD	<i>REM-sleep movement behaviour disorder</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
S.	Seite
scFV	<i>single chain Fv</i> Antikörper
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
sek	Sekunde(n)

SN	Substantia nigra
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNCA	alpha-Synuclein Gen
SOD	Superoxid-Dismutase
sog.	sogenannt(e)
spez.	spezifisch(e)
Tab.	Tabelle
tg	transgen(e)
Thy1	<i>thymocyte differentiation antigen 1 (CD90)</i>
u.a.	unter anderem(n)
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8.4 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg die Damen und Herren:

Adamkiewicz	Höffkes	Mueller
Aumüller	Hofmann	Müller
Barth	Höglinger	Mutters
Bartsch	Hoyer	Neubauer
Basler	Jaques	Oertel
Baum	Jaspersen	Pagenstecher
Behr	Jungclas	Plant
Bien	Kann	Renz
Czubayko	Kaufmann	Richter
Daut	Klenk	Röhm
Dettmeyer	Klose	Röper
Dodel	Klotz	Rosenow
Eilers	Knake	Rothmund
Engenhardt-Cabillic	Köhler	Schäfer
Feuser	Koolman	Schofer
Fuchs-Winkelmann	Krieg	Schrader
Gerdes	Kroll	Steiniger
Görg	Lang	Suske
Greim	Lenz	Tackenberg
Gress	Lill	Tibesku
Grimm	Liss	Vogelmeier
Grundmann	Löffler	Wagner
Grzeschik	Lohoff	Weihe
Hamer	Maier	Welter
Hermann-Lingen	Maisch	Werner
Hertl	Mandrek	Westermann
Hessmann	Martin	Wulf
Hilt	Moll	
Höffken	Moosdorf	



### 8.5 DANKSAGUNG

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang H. Oertel sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Richard Dodel, die mir in ihrer Klinik hervorragende Arbeitsbedingungen bereitgestellt und diese Dissertation somit erst ermöglicht haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Richard Dodel, dessen Arbeitsgruppe mich ab dem ersten Tag in herausragender Weise herzlich aufgenommen hat und insbesondere er mir mit seiner langjährigen wissenschaftlichen und ärztlichen Erfahrung sowie großer Herzlichkeit fortwährend mit Rat und Tat zur Seite stand.

Großen Dank möchte ich meinem Laborpartner Herrn Christian Binder aussprechen, der mich vom ersten bis zum letzten Labortag dieser Arbeit begleitet und mit mir gemeinsam das wissenschaftliche Denken und Arbeiten gelernt und umgesetzt hat. Herr Binder hat mit viel Vertrauensvorsprung und Hilfsbereitschaft, unzähligen Arbeitsstunden und zahlreichen konstruktiven Hinweisen im Laufe der Arbeit einen wichtigen Anteil an der Fertigstellung dieser Abfassung geleistet. In diesem Sinne vielen Dank für deinen Geduld, deine Freundschaft, deine offene und ehrliche Art, die nie Freundlichkeit und Fairness vermissen ließ.

Darüber hinaus gilt mein besonderer Dank dem gesamten Team der Arbeitsgruppe, die mir sowohl die Methodik eines Labors erklärt als auch bei der Erhebung der Daten entscheidend geholfen haben. Stellvertretend für alle beteiligten Personen, Berufsgruppen und Wegbereiter möchte ich mich vor allem bei Frau PD Dr. med. Frauke Neff für ihre Expertise und all die geleistete Arbeit bedanken. Es bleibt zu betonen, dass diese Arbeit ohne das konstruktive, empathische Miteinander aller Arbeitsgruppenmitglieder um Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Richard Dodel so nicht möglich gewesen wäre.

Frau Anne Bouchée und Herrn Dr. med. Jan-Philipp Bach bin ich zu größtem Dank verpflichtet. Danke für euer Verständnis, für eure Geduld und eure unerschütterliche Zuversicht.

Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Eltern und Geschwister. Sie waren es, die mir das Studium der Medizin und diese Dissertation erst ermöglichten. Sie waren immer für mich da, haben mich stets ermutigt und immer ohne jegliche Einschränkung oder Bedingung mit all ihnen zur Verfügung stehenden Möglichkeiten unterstützt.

Jedem Einzelnen gilt mein aufrichtiger Dank.