

Entwicklung eines Vakzins für die Parkinson-Krankheit

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Verena Pesch
aus Bad Honnef

Düsseldorf, Oktober 2023

aus dem Institut für Physikalische Biologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Prof. Dr. Gültekin Tamgüney

2. Prof. Dr. Dieter Willbold

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.2023

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner erkläre ich, dass ich in keinem anderen Dissertationsverfahren mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation einzureichen.

Düsseldorf, 31. Oktober 2023

Verena Pesch

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	iv
Danksagung	v
Zusammenfassung	vi
Abkürzungsverzeichnis	vii
1. Einleitung	1
1.1. Synucleinopathien und Morbus Parkinson	1
1.2. α -Syn	2
1.2.1. Posttranslationale Modifikationen	3
1.2.1.1. Acetylierung	4
1.2.1.2. Nitrierung und Oxidierung	4
1.2.1.3. Phosphorylierung	4
1.2.1.4. Ubiquitinierung und SUMOylierung	5
1.2.1.5. O-GlcNAcylierung	6
1.2.1.6. Trunkierung	6
1.2.2. Aggregation von α -Syn	7
1.2.3. Toxizität von α -Syn	8
1.2.3.1 Mitochondriale Dysfunktion	8
1.2.3.2 Störung endoplasmatisches Retikulum	8
1.2.3.3 Proteasom-Fehlfunktion	9
1.2.3.4 Entzündungsreaktionen durch Mikrogliose und Astrogliose	9
1.2.3.5 Membranbeschädigungen	10
1.2.3.6 Synapsen-Dysfunktion	10
1.2.3.7. Prionen-artige Vermehrung	10
1.2.4. Übertragung von α -Syn	11
1.2.4.1 Interzelluläre Übertragung	11
1.2.4.2 Übertragung über die Darm-Hirn-Achse	12
1.3. Morbus Parkinson in Mausmodellen	13
1.3.1. PD im Mausmodell durch die Injektion von Neurotoxinen	13
1.3.2. Genetische Mausmodelle	14
1.4. Immunisierung gegen Morbus Parkinson	14
1.4.1. Passive Immunisierung gegen Morbus Parkinson	14
1.4.2. Aktive Immunisierung gegen Morbus Parkinson	15

1.5. Ziel der Arbeit	15
2. Materialien und Methoden	19
2.1. Materialien	19
2.1.1. Puffer	19
2.1.2. Primärantikörper	19
2.1.3. Sekundärantikörper	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Tiere	21
2.2.2. Genotypisierung.....	21
2.2.3. Vakzinierung und Blutentnahme.....	22
2.2.4. Herstellung von α -Syn-Fibrillen.....	23
2.2.5. Inokulierung der α -Syn Fibrillen	24
2.2.5.1. Intraperitoneale Injektion	24
2.2.5.2. Intrazerebrale Injektion	24
2.2.5.3. Intragastrierte Injektion.....	25
2.2.6. Verhaltensversuche.....	25
2.2.6.1. Griffkraft-Test	26
2.2.6.2. Pole-Test	26
2.2.6.3. RotaRod-Test.....	26
2.2.7. Gewebepräparation	27
2.2.8. Histologische Untersuchungen der Gewebe.....	27
2.2.8.1. Nachweis der Pathologie durch DAB-Färbung.....	27
2.2.8.2. Doppelfärbungen durch Immunfluoreszenz	28
2.2.9. Biochemische Untersuchungen der Gewebe	28
2.2.9.1. Homogenisierung	29
2.2.9.2. Sarkosylpräzipitation der α -Syn-Aggregate	29
2.2.9.3. Western Blot.....	29
2.2.10. Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (engl.: <i>Enzyme-linked Immunosorbent</i> , ELISA)	30
2.2.10.1. Indirekter ELISA	30
2.2.10.2. Kompetetiver ELISA.....	30
3. Ergebnisse	33
3.1. Vakzinierete Mäuse behalten länger ihre kognitiven Fähigkeiten und verlieren erst später Gewicht.....	33

3.2. Vakzinierte Mäuse leben länger.....	34
3.4. Die Vakzinierung induziert Antikörper gegen die Vakzine und auch gegen α -Syn-Fibrillen	37
3.3. Pathologie, Astrogliose und Mikrogliose sind in vakzinierten und nicht-vakzinierten Tieren vorhanden	39
4. Diskussion.....	43
4.1. Vakzinierte Tiere verlieren erst später Gewicht, zeigen später motorische Defizite und leben länger als nicht-vakzinierte Tiere	43
4.2. Pathologie zeigt sich bei nicht-vakzinierten und vakzinierten Tieren.....	44
4.3. Der Impfstoff induziert eine robuste Immunität gegen α -Syn-Fibrillen.....	44
5. Schlussfolgerung und Ausblick	45
6. Arbeitsbeteiligung	46
7. Literaturverzeichnis.....	46
8. Anhang.....	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von α -Syn mit Mutationen und posttranslationale Modifikationen.	3
Abbildung 2: Monomeres α -Syn kann verschiedene Konformationen einnehmen.	7
Abbildung 3: Übertragungsweg von α -Syn zwischen Neuronen..	12
Abbildung 4: Die vier Impfstoffkandidaten, welche verschiedene Epitope von α -Syn enthalten.	17
Abbildung 5: Die vier Impfstoffkandidaten sind fähig Fibrillen zu bilden.	18
Abbildung 6: Vakzinierungsschema.	23
Abbildung 7: Prinzip kompetitiver ELISA.	32
Abbildung 8 Vakzinierter TgM83 ^{+/-} -Mäuse nehmen länger an Gewicht zu und zeigen länger eine gute Leistung.	34
Abbildung 9: Vakzinierter Mäuse überleben länger als nicht-vakzinierter Mäuse.	36
Abbildung 10: Vakzinierter Tiere bilden Antikörpern gegen pathologisches α -Syn.	38
Abbildung 11: Plasmen von vakzinierten Mäusen erkennen α -Syn in erkrankten Mäusen.	39
Abbildung 12: Die α -Syn-Pathologie zeigt sich sowohl bei nicht-vakzinierten als auch bei vakzinierten Tieren.	41

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen.	19
Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper mit Hersteller, Spezies und Verdünnung.	19
Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper mit Hersteller, Spezies und Verdünnung.	20
Tabelle 4: Master-Mix für Real-Time PCR.	21
Tabelle 5: Einstellungen PCR-Cycler.	22

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Erdem Tamgüney bedanken, dass er mich bei meinen Experimenten und auch bei der Erstellung meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Er hat mir fachlich mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mir geholfen, eine bessere Wissenschaftlerin zu werden. Zusätzlich zum Fachlichen hat er, wenn es mal nötig war, auch persönlich Unterstützung geleistet und bei persönlichen Krisen Hilfe angeboten und Verständnis gezeigt.

Auch möchte ich mich bei Prof. Dr. Dieter Willbold bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, mein Mentor zu sein und, dass ich in seinem Institut meine Doktorarbeit machen durfte.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen Sara Reithofer und Liang Ma bedanken, die mich immer bei diesem Projekt unterstützt haben und auch mal ausgeholfen haben, wenn etwas zeitlich knapp war. Zusätzlich bedanke ich mich bei dem Tierhausteam bestehend aus den Tierpflegern und Frau Kornadt-Beck. Die Tierpfleger haben sich immer, ob am Wochenende oder an Feiertagen, um meine Versuchstiere gekümmert. Frau Kornadt-Beck stand immer als Ansprechpartnerin bereit, wenn ein akuter Notfall bei den Tieren bestand.

Zusätzlich möchte ich mich bei Frau Dr. Stephanie Lohmann bedanken, von der ich einige Techniken lernen konnte und die auch immer erreichbar war, wenn ich Fragen zu verschiedenen Protokollen oder Methoden hatte.

Ich bedanke mich außerdem bei meinen anderen Kolleginnen und Kollegen aus dem IBI-7 und dem INM-2, die mir auch gerne geholfen haben, wenn ich Fragen hatte. Dazu will ich im Besonderen Pelin Özdüzenciler, Sara Reithofer, Nina Becker und Lara Blömeke hervorheben, die nicht nur Kollegen, sondern auch gute Freunde für mich geworden sind. Dazu gab es allerdings noch viele mehr, mit denen ich gerne fachlich, aber auch privat bei Weihnachtsmarktbesuchen oder verschiedenen Festivitäten, Zeit verbracht habe.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meinen Brüdern bedanken, die mir in der Zeit des Schreibens den Rücken weitestgehend freigehalten haben und mich immer motiviert und unterstützt haben. Danke für alles!

Zusammenfassung

Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen. Da das Alter ein wichtiger Faktor bei der Erkrankung ist und es bisher keine Heilung oder Prävention gibt, ist diese Erkrankung bei einer alternden Bevölkerung ein zentrales Thema. Die Krankheit wird durch die Oligomerisierung und die Fibrillierung des Proteins α -Synuclein charakterisiert. Diese geformten Oligomere rekrutieren dann weitere Monomere und führen durch unterschiedliche toxische Effekte zum Zelltod von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra.

Da aktuell nur eine symptomatische Behandlung verfügbar ist, wäre eine Prävention oder Behandlung in Form eines Impfstoffs von hoher Bedeutung. Dazu gibt es bereits einige Immunisierungsversuche sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien. Immunisierungsversuche gegen das native α -Synuclein konnte auch bereits eine gute Wirksamkeit in Mausmodellen zeigen. Allerdings konnten diese Impfstoffe nicht in die klinische Phase übertragen werden, da die Gefahr von Autoimmunreaktionen zu groß ist. Später ist man dazu übergegangen kürzere Epitope von α -Synuclein zu verwenden, sodass keine Autoimmunreaktion durch T-Helferzellen entsteht.

Einen ähnlichen Ansatz wurde auch in dieser Arbeit verfolgt. Dafür wurde das fibrillenbildende Pilzprion HET-s so verändert, dass die Außenseite der Fibrillen vier verschiedenen Epitopen auf Basis von synthetischen α -Synuclein Fibrillen ähneln. Diese wurden dann zu einem quadrivalenten Impfstoff kombiniert. Die Wirksamkeit wurde dann in dem TgM83-Mausmodell getestet. Die geimpften Mäuse nahmen hier länger an Gewicht zu, hatten eine signifikant längere Lebensspanne und zeigten bei motorischen Verhaltenstests eine bessere Leistung als die ungeimpften Tiere. Daraus lässt sich schließen, dass die Impfung den Beginn der Erkrankung hinauszögert. Später erkrankten auch die geimpften Tiere und zeigen dann die gleiche Pathologie und Entzündungsreaktionen wie die ungeimpften Tiere. Letztendlich zeigt diese Arbeit auch, dass die gebildeten Antikörper in den Mausseren sehr gut die Vakzine, α -Synuclein Fibrillen und auch Gehirn-Homogenate von Patienten verschiedener Synucleinopathien erkennen. Gerade das letztgenannte gibt starke Hinweise darauf, dass dieser Impfstoff auch in klinischen Studien eine gute Wirksamkeit zeigen kann, da offensichtlich die Antikörper humanes pathogenes α -Synuclein erkennen.

Abkürzungsverzeichnis

ALP – autophagisch-lysosomaler Abbauweg

α -Syn – α -Synuclein

ATP – Adenosintriphosphat

BSA – Bovines Serumalbumin

BSE – Bovine spongiforme Enzephalopathie

CHIP – Carboxylterminus des Hsp70-interagierendes Protein (engl.: *Carboxyl Terminus of Hsp70-interacting Protein*)

DAB – 3-3'-Diaminobenzidin

DAPI – 4',6-Diamidino-2-phenylindol

DLB – Demenz mit Lewy-Körpern (engl.: *Dementia with Lewy-Bodies*)

DMX – Dorsaler Motornukleus des Vagusnervs

DNA – Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)

E. coli – Escherichia coli

ELISA – Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

ER – Endoplasmatisches Retikulum

GFAP – Saures Gliafaserprotein (engl.: *glial fibrillary acidic protein*)

HRP – Meerrettichperoxidase (engl.: *horseradish peroxidase*)

Iba1 – ionisiertes, kalziumbindendes Adaptormolekül 1

ICAM-1 – Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: *intercellular adhesion molecule 1*)

IG – Intragastrische Injektion

IL – Interleukin

IP – Intraperitoneale Injektion

IPTG – Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranosid

iRBD – Idiopathische REM-Schlaf-Verhaltensstörung (engl.: *idiopathic rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder*)

IZ – Intrazerebrale Injektion

kDa – Kilodalton

LB – Lysogeny Broth

MPTP – 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin

MSA – Multisystematrophie

NAC – Nicht-Amyloid- β -Komponente (engl.: *Non-amyloid- β component*)

NGS – Normales Ziegen Serum (engl.: *Normal goat serum*)

NMDA – N-Methyl-D-Aspartat

NMR – Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*)

O-GlcNAc – O-gebundenes β -N-Acetylglucosamin

PBS – Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: *phosphate-buffered saline*)

PD – Morbus Parkinson (engl.: *Parkinson's disease*)

PDGF – plättchenbasierter Wachstumsfaktor (engl.: *platelet-derived growth factor*)

PFA – Paraformaldehyd

PrP – Prionprotein

PrP^C – Zelluläres Prionprotein (engl.: *cellular prion protein*)

PrP^{Sc} – Pathogenes Prionprotein (engl.: *prion protein scrapie*)

PTM – Posttranslationale Modifikationen

PTIP51 – Protein-Tyrosin-Phosphatase interagierendes Protein 51

rpm – Umdrehungen pro Minute (engl.: *Revolutions per minute*)

SDS – Natriumdodecylsulfat

Siah-1 – Sieben in Abwesenheit Homolog-1 (engl.: *Seven in absentia homologue-1*)

SUMO – Kleine Ubiquitin-ähnliche Modifizierer (engl.: *Small ubiquitin-like modifiers*)

TBS – TRIS-gepufferte Salzlösung (engl.: *TRIS-buffered saline*)

Tg – Transgen

Thy1 – Thymuszellantigen 1

TLR – Toll-like Rezeptoren

TNF – Tumornekrosefaktor

TOM – Translokase der äußeren Membran (engl.: *translocase of the outer membrane*)

TRIS – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

UPS – Ubiquitin-Proteasom-System

VAPB – VAMP (Vesikel-assoziiertes Membranprotein)-assoziiertes Protein B

wt – Wildtyp

6-OHDA – 6-Hydroxy-dopamin

1. Einleitung

1.1. Synucleinopathien und Morbus Parkinson

Synucleinopathien sind ein Überbegriff von neurodegenerativen Erkrankungen, die von einer Aggregation des Proteins α -Synuclein (α -Syn) verursacht werden. Zu den Synucleinopathien zählen außer Morbus Parkinson (engl.: *Parkinson's disease*, PD) z.B. noch die Demenz mit Lewy-Körpern (engl: *Dementia with Lewy-Bodies*, DLB) und die Multisystematrophie (MSA). Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sich α -Syn-Aggregate im Perikaryon (Lewy-Körper), welche zusätzlich auch noch andere Bestandteile enthalten, und in den Neuriten (Lewy-Neurite) befinden. Allerdings finden sich bei MSA-Patienten auch gliale zytoplasmatische Einschlüsse in Oligodendrozyten (Fujiwara et al. 2002; Koga et al. 2021; Tamgüney und Korczyn 2018; Spillantini et al. 1997; Spillantini und Goedert 2000). Diese α -Syn-Aggregate führen zu einem Absterben von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra und somit zu einem Dopamindefizit (Gómez-Benito et al. 2020; Taschenberger et al. 2012). PD ist neben Morbus Alzheimer eine der am häufigsten auftretenden neurodegenerativen Erkrankung, deren Häufigkeit im Alter zunimmt. Die Häufigkeit steigt von 1 % bei 60-Jährigen auf 3 % bei 80-Jährigen. Im Alter von 70 – 80 Jahren erreicht die Inzidenz einen Höhepunkt. Des Weiteren sind Männer häufiger betroffen als Frauen (Pringsheim et al. 2014; Lee und Gilbert 2016). Die meisten PD-Fälle sind sporadisch. Allerdings sind 10 – 15 % der Fälle durch verschiedene Missense-Mutationen im *SNCA*-Gen, welches auf dem humanen Chromosom 4q21–q23 liegt, das für α -Syn kodiert, genetisch veranlagt (Abb.1). Zusätzlich werden auch bestimmte Umweltbedingungen wie Luftverschmutzung, Pestizide oder Hirntraumata als Risikofaktoren angesehen (Tolosa et al. 2021; Dickson 2018; Koeglsperger et al. 2023; Polymeropoulos et al. 1996).

Die Entwicklung und das Fortschreiten von PD wurde erstmals 2003 von Braak und Kollegen beschrieben und in sechs Stufen eingeteilt (Braak et al. 2003b). Sie postulierten, dass die Pathologie in Phase 1 im Riechkolben, im vorderen olfaktorischen Nucleus und im dorsalen Motornucleus des Vagusnervs (DMX) in der Medulla oblongata startet. In der Phase 2 kommen Läsionen in dem kaudalen Raphe-Kern, im gigantozellulären retikulären Kern und dem Coeruleus-Subcoeruleus-Komplex hinzu. In Phase 3 lässt sich die Pathologie im Mittelhirn in der Substantia nigra pars compacta finden. Danach breitet sich in Phase 4 die Pathologie in den temporalen Mesocortex und in den Allocortex aus. In Phase 5 finden sich Läsionen im Neokortex in sensorischen Assoziationsbereichen

höherer Ordnung und im präfrontalen Neokortex. Zuletzt breitet sich die Pathologie dann in Phase 6 in die sensorischen Assoziationsbereiche erster Ordnung des Neokortex und prämotorische Bereiche aus (Braak et al. 2003a; Rietdijk et al. 2017; Visanji et al. 2013).

Die häufigsten motorischen Symptome für PD sind Bradykinesie, Ruhetremor und Steifheit sowie Veränderungen der Körperhaltung und des Gangs. Allerdings kommen einige Symptome hinzu wie Schlafstörungen, Anosmie, Schwierigkeiten beim Schlucken und Verdauungsprobleme wie Konstipation (Tolosa et al. 2021; Jankovic 2008; Chung und Pfeiffer 2021; Ali et al. 1996). Zum aktuellen Zeitpunkt ist es nur möglich die motorischen Symptome zu behandeln, eine Heilung oder Vorbeugung ist allerdings nicht möglich. Die symptomatische Behandlung erfolgt aktuell hauptsächlich durch die Gabe von Levodopa, welches eine Vorstufe von Dopamin ist und das fehlende Dopamin ersetzen soll (Katzenschlager und Lees 2002; Schapira et al. 2009). Die Levodopa-Behandlung kann durch Monoaminoxidase-Inhibitoren, wie Selegilin und Rasagilin, erweitert werden. Diese beeinflussen den Dopamin-Abbau und stärken die motorischen Fähigkeiten (Young et al. 1997; Alborghetti und Nicoletti 2019). Zusätzlich zu Medikamenten gibt es noch eine weitere Behandlungsmöglichkeit, die tiefe Hirnstimulation. Dafür werden Elektroden in einer Operation an bestimmte Stellen im Gehirn gebracht. Mit hohen Frequenzen werden diese dann stimuliert. Bei der Behandlung von PD wird der subthalamische Nucleus und Globus pallidus internus stimuliert. Wie bei der medikamentösen Behandlung werden bei der tiefen Hirnstimulation auch nur die Symptome behandelt. Das Fortschreiten der Erkrankung wird aber nicht gestoppt (Benabid 2003; Kalia et al. 2013).

1.2. α -Syn

Das humane Protein α -Syn besteht aus 140 Aminosäuren und gehört neben β - und γ -Synuclein zur Synuclein-Familie. α -Syn tritt unter physiologischen Bedingungen als Monomer als auch als stabiles Tetramer auf. Es ist sowohl im Zytosol als auch membrangebunden in Neuronen vorhanden (Tong et al. 2010; George 2002; Jakes et al. 1994; Bartels et al. 2011). Diese 140 Aminosäuren können in drei Regionen unterteilt werden. Die N-terminale Domäne (Aminosäure 1–60) enthält die meisten Missense-Mutationen, welche mit familiärem Parkinson in Verbindung gebracht werden. Dies sind die Mutationen A18T, A29S, A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E and A53T (Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998; Conway et al. 1998; Zarranz et al. 2004; Proukakis et al. 2013; Kiely et al. 2013; Pasanen et al. 2014). Daran anschließend befindet sich die Nicht-Amyloid- β -Komponente (engl.: *non-amyloid- β component*, NAC) Domäne (Aminosäure 61–95), welche stark an der Bildung von β -Faltblättern und somit der Aggregation beteiligt

ist. In diesem Abschnitt wurde kürzlich eine weitere familiäre Mutation, E83Q, gefunden. Dies ist die erste familiäre Mutation, die außerhalb der N-terminalen Domäne gefunden wurde (Kumar et al. 2022). Schließlich befindet sich am Ende die saure C-terminale Domäne (Aminosäure 96–140), wo einige Trunkierungen in dem α -Syn vorkommen. Hier finden sich auch eine der wichtigsten posttranslationalen Modifikationen. Das Serin129 ist in vielen α -Syn-Spezies phosphoryliert. Zusätzlich befindet sich hier eine Calcium-Bindungsstelle (Uéda et al. 1993; Crowther et al. 1998; Li et al. 2002; Nielsen et al. 2001). Die genaue Funktion von α -Syn ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings wird durch die präsynaptische Lokalisation vermutet, dass es eine Rolle beim Vesikelrecycling spielt. Außerdem bindet es an Phospholipide und Synaptobrevin-2 und ist daher an dem Aufbau des SNARE-Komplexes beteiligt (Burré et al. 2010; Nakajo et al. 1993). Als erstes wurde α -Syn in dem elektrischen Torpedorochen von (Maroteaux et al. 1988) beschrieben.

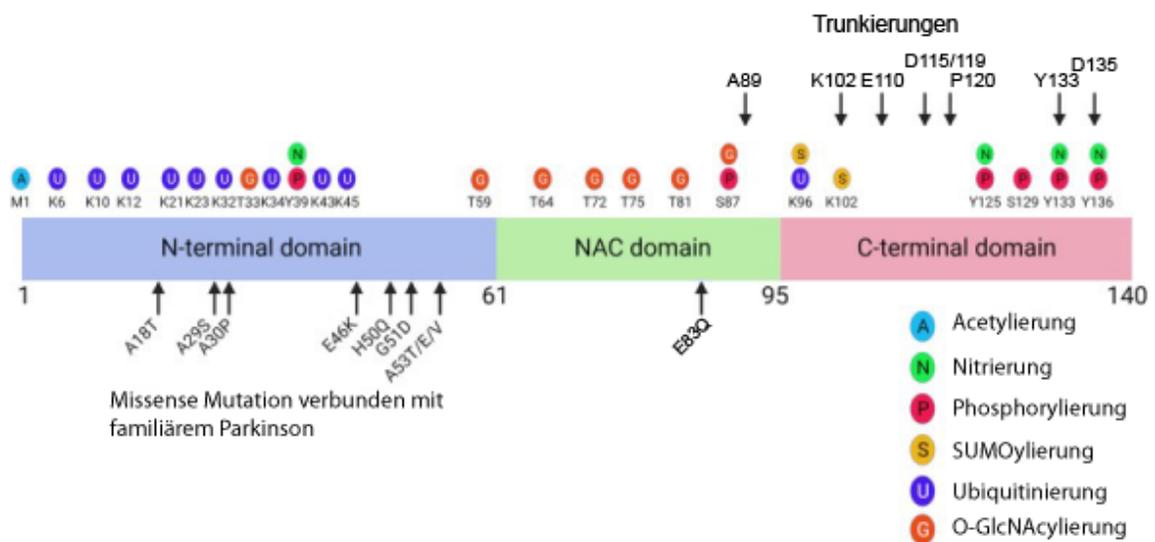


Abbildung 1: Struktur von α -Syn mit Mutationen und posttranslationale Modifikationen. Das native α -Syn lässt sich in drei Domänen aufteilen: N-terminale Domäne, NAC-Domäne und C-terminale Domäne. In der N-terminalen Domäne finden sich einige Missense-Mutationen, die mit familiärem Parkinson verbunden sind. Außerdem gibt es posttranslationale Modifikationen an verschiedenen Aminosäuren des Proteins. Abbildung adaptiert von Koga et al. 2021. Die kürzlich entdeckte Mutation in der NAC Domäne (Kumar et al. 2022) und die Trunkierungen (Anderson et al. 2006; Murray et al. 2003) wurden nachträglich zu der Abbildung hinzugefügt.

1.2.1. Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTM) können dazu führen, dass sich bestimmte Eigenschaften von Proteinen verändern. Sie können Auswirkungen auf die Ladung, die

Größe, die Konfirmation oder Struktur haben. Dies kann Einfluss auf das Aggregationsverhalten von α -Syn haben. Zu den wichtigsten PTM gehören Acetylierung, Nitrierung, Phosphorylierung, SUMOylierung, Ubiquitinierung, O-GlcNAcylierung und Trunkierung (Abb.1) (Beyer 2006; Clark et al. 2005).

1.2.1.1. Acetylierung

Acetylierung ist eine der häufigsten PTM in Eukaryoten. Hierbei wird die Acetylgruppe von Acetyl-CoA auf die Aminogruppe der N-terminalen Proteinreste übertragen (Arnesen et al. 2009). Natives α -Syn enthält viel Lysin, welches von Sirtuin 2 in der N-terminalen Domäne acetyliert werden kann. Allerdings ist umstritten, in welcher Weise die N-terminale Acetylierung die Aggregation von α -Syn beeinflusst. Einige Studien zeigen eine verringerte Aggregation, was bedeuten würde, dass Acetylierung der Oligomerisierung von α -Syn vorbeugt und verlangsamt, indem es die Bildung von Wasserstoff-Brücken verhindert, womit es ein wichtiger protektiver Mechanismus wäre (Bu et al. 2017; Oliveira et al. 2017; Kang et al. 2012; Bartels et al. 2014; Kang et al. 2013). Andere Studien zeigen eher, dass die Acetylierung gar keine Auswirkung auf die Aggregation hat (Fauvet et al. 2012; Maltsev et al. 2012). Da das α -Syn-Monomer zu einem großen Anteil physiologisch N-terminal acetyliert ist, ist es wichtig mehr Studien in diesem Bereich zu betreiben.

1.2.1.2. Nitrierung und Oxidierung

Eine weitere übliche PTM von α -Syn sind Nitrierungen und Oxidierungen an allen vorhandenen Tyrosinresten (Y39, Y125, Y133 und Y136) (Burai et al. 2015; Sevcsik et al. 2011). Durch oxidativen Stress wird hier das Wasserstoffatom an der 3'-Position des Tyrosin-Phenolrings durch eine Nitrogruppe ersetzt und bildet so 3-Nitrotyrosin (Chavarría und Souza 2013; Giasson et al. 2000). Es wurde gezeigt, dass nitriertes α -Syn toxischer auf verschiedene Zelllinien wirkt als das wildtyp (wt) α -Syn (Liu et al. 2011). Außerdem wurde auch in Ratten gezeigt, dass das nitrierte α -Syn den Verlust von dopaminergen Neuronen noch verstärkt (Yu et al. 2010). Es wurde zusätzlich noch gezeigt, dass Nitrierung der Tyrosinreste durch oxidativen Stress zu einer erhöhten Aggregation und Fibrillenbildung führt (Danielson et al. 2009; Hodara et al. 2004).

1.2.1.3. Phosphorylierung

Die Phosphorylierung von Serin- und Tyrosin ist die am meisten erforschte PTM von α -Syn. Dabei wird das γ -Phosphat von Adenosintriphosphat (ATP) durch die Kasein- Kinase I und II, die G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen und die Polo-like Kinase 2 auf Serin oder Tyrosin übertragen (Pratt et al. 2015; Inglis et al. 2009; Okochi et al. 2000; Pronin et

al. 2000). Die Phosphorylierung von Serin129 ist die häufigste posttranslationale Modifikation von α -Syn und eins der wichtigsten Anzeichen für PD. Die Fibrillenbildung wird durch die Phosphorylierung am Serin129 verstärkt (Anderson et al. 2006; Iwatsubo 2003). Allerdings gibt es daneben noch die Phosphorylierung von Serin87, welche zu einer verringerten Fibrillierung führt. Allerdings wird dann auch die Bindungsmöglichkeit an Membranen durch das α -Syn verringert (Paleologou et al. 2010). Weitere bekannte Phosphorylierungen befinden sich bei Tyrosin 39, 125, 133 und 136 (Ellis et al. 2001; Negro et al. 2002; Mahul-Mellier et al. 2014). Für Tyrosin125 ist bekannt, dass eine Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Aggregation hat. Für Tyrosin133 und 136 ist dies immer noch unbekannt (Hejjaoui et al. 2012). Für Tyrosin39 gibt es widersprüchliche Ergebnisse. In einem Aggregations-Assay zeigte sich eine verringerte Aggregation im Vergleich zu wt α -Syn (Dikiy et al. 2016). Während sich in HEK-Zellen verstärkte Aggregation messen ließ (Brahmachari et al. 2016). Außerdem verändert eine Phosphorylierung an Tyrosin39 die Struktur der Fibrillen (Zhao et al. 2020).

1.2.1.4. Ubiquitinierung und SUMOylierung

Ubiquitin besteht aus 76 Aminosäuren und kann als Modifikation an Lysinreste angehängt werden (Welchman et al. 2005). Ubiquitinierungen scheinen eine wichtige Rolle bei PD zu spielen, da sich Ubiquitin in Lewy-Körperchen nachweisen lässt (Gómez-Tortosa et al. 2000; Kuzuhara et al. 1988). Zusätzlich scheint es so, dass im Fall von α -Syn die Ubiquitinierung eher einen pathologischen Grund hat obwohl die Proteasom-Maschinerie nicht beeinflusst wird (Tofaris et al. 2003). Die neun Lysine 6, 10, 12, 21, 23, 32, 34, 43 und 96 können ubiquitiniert werden (Nonaka et al. 2005; Anderson et al. 2006). Das α -Syn wird größtenteils einfach, aber auch teilweise zweifach oder dreifach durch die Ubiquitin-Protein-Ligase Sieben in Abwesenheit Homolog-1 (engl.: *Seven in absentia homologue-1*, Siah-1) ubiquitiniert. Es wurde allerdings auch entdeckt, dass die Ubiquitinierung durch Siah-1 zu einer verstärkten Aggregation von α -Syn in dopaminergen Zellen führt. (Lee et al. 2008b; Rott et al. 2008; Hasegawa et al. 2002; Sampathu et al. 2003). Allerdings wurde später von Hejjaoui et al. gezeigt, dass Ubiquitinierung an K6 zu einer Verringerung der Aggregation führt (Hejjaoui et al. 2011). Dies wurde auch nochmal für K6 bestätigt und zusätzlich für K23 und K96 gezeigt. Hinzu kommt, dass die Fibrillen, welche aus α -Syn mit ubiquitiniertem K96 gebildet wurden, eine andere Struktur aufweisen (Moon et al. 2020). Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Regulation von α -Syn ist das Carboxylterminus von Hsp70-interagierende Protein (engl.: *Carboxyl Terminus of Hsp70-interacting Protein*, CHIP), welches wie eine Protein-Ligase fungieren kann. Es konnte gezeigt werden, dass

CHIP mit α -Syn kolokalisiert und eine Überexpression von CHIP zu einem stärkeren Abbau von α -Syn und somit zu einer verringerten Aggregation führt. Dieser Abbau von α -Syn kann sowohl über den proteosomalen als auch über den lysosomalen Pfad geschehen (Shin et al. 2005). Allerdings unterstützt CHIP nicht nur den Abbau von monomerischem α -Syn. Es wurde auch gezeigt, dass CHIP toxische α -Syn Oligomere abbauen kann und so ein weiterer protektiver Faktor ist (Tetzlaff et al. 2008).

Kleine Ubiquitin-ähnliche Modifizierer (engl.: *small ubiquitin-like modifiers*, SUMO) sind dem ähnlich und können wie Ubiquitin an die Seitenkette von Lysin angehängt werden (Schwartz und Hochstrasser 2003). Es sind SUMO1, 2 und 3 bekannt. Allerdings interagiert hauptsächlich SUMO1 mit α -Syn (Dorval und Fraser 2006). Durch Anhängen von SUMOs an α -Syn wird der Ubiquitin-gesteuerte Abbauweg deaktiviert und so der Abbau vom α -Syn verhindert. Dadurch wird die Aggregation verstärkt (Rott et al. 2017; Kim et al. 2011).

1.2.1.5. O-GlcNAcylierung

Die O-GlcNAcylierung ist eine Form der Glykosylierung, wo O-gebundenes β -N-Acetylglucosamin (O-GlcNAc) durch eine O-GlcNAc Transferase an Serin und Threonin gebunden wird (Hart et al. 2007). Dies ist wieder eine protektive PTM. Eine O-GlcNAcylierung an Threonin72 und Serin84 führt zu einer verminderten Aggregation, ohne dabei die Bindungsfähigkeit an Membranen zu beeinträchtigen. Die Inhibierung der Aggregation ist bei Threonin72 allerdings stärker als bei Serin84 (Marotta et al. 2015; Lewis et al. 2017). Dies lässt sich nicht nur für α -Syn nachweisen. Studien konnten auch einen protektiven Effekt in vitro und in vivo für das Tau-Protein zeigen. Durch eine O-GlcNAcylierung konnten hier die Hyperphosphorylierung in Tau reduziert werden (Yuzwa et al. 2012; Yuzwa et al. 2008). O-GlcNAcylierung scheint auch ein protektiver Mechanismus gegen die Aufnahme von vorgeformten α -Syn Fibrillen zu sein, da bei einer erhöhten Menge O-GlcNAc in der Zelle, die Aufnahme von vorgeformten α -Syn Fibrillen in der Zellkultur verringert ist (Tavassoly et al. 2021).

1.2.1.6. Trunkierung

Neben dem α -Syn in voller Länge liegen in Lewy-Körperchen auch C-terminal trunkierte α -Syn Arten vor, deren Größe von 10–15 kDa reicht (Baba et al. 1998; Crowther et al. 1998; Campbell et al. 2001). Ungefähr 15 % des vorhandenen α -Syns ist trunkiert. Diese verkürzten α -Syn Formen zeigen einen verstärkten Hang zur Bildung von pathologischen Zelleinschlüssen und beschleunigter Fibrillenbildung. Zusätzlich unterstützt es die

Aggregation von α -Syn mit normaler Länge (Liu et al. 2005; Tofaris et al. 2006; Murray et al. 2003; Hoyer et al. 2004).

1.2.2. Aggregation von α -Syn

Das Protein α -Syn kann unter verschiedenen Bedingungen unterschiedliche Konformationen annehmen (Abb. 2). Wie bereits zuvor beschrieben liegt α -Syn physiologisch als ungefaltetes Monomer entweder frei oder membrangebunden vor oder aber auch als Tetramer. Diese Tetramere haben eine ungefähre Größe von 58 kDa und sind resistent gegen Aggregation (Bartels et al. 2011; Wang et al. 2011). Allerdings können die Monomere unter pathologischen Bedingungen auch Oligomere bilden. Hier gibt es dann zwei mögliche Pfade. Es können Oligomere entstehen, welche nicht fähig sind, Protofibrillen und amyloide Fibrillen zu bilden. Diese nennen sich Off-Pathway Oligomere (Bengoa-Vergniory et al. 2017; Miraglia et al. 2018). Allerdings werden auch Oligomere gebildet, die immer mehr Monomere rekrutieren und dadurch als Keim für Protofibrillen agieren. Diese Protofibrillen bilden dann lange amyloide Fibrillen, welche sich dann größtenteils in Lewy-Körperchen ablagern. Diese Fibrillen sind unlöslich und reich an β -Faltblättern. Zusätzlich ist das fibrilläre α -Syn resistent gegen den Abbau durch Proteinase K (Spillantini et al. 1998; Neumann et al. 2004). Das ausgeglichene Verhältnis zwischen Tetrameren und Monomeren scheint sehr wichtig zu sein, um die Aggregation zu verhindern. Es wurde gezeigt, dass sich vermehrt Oligomere bilden, wenn das Tetramer zu Monomer Verhältnis gestört wird (Dettmer et al. 2015).

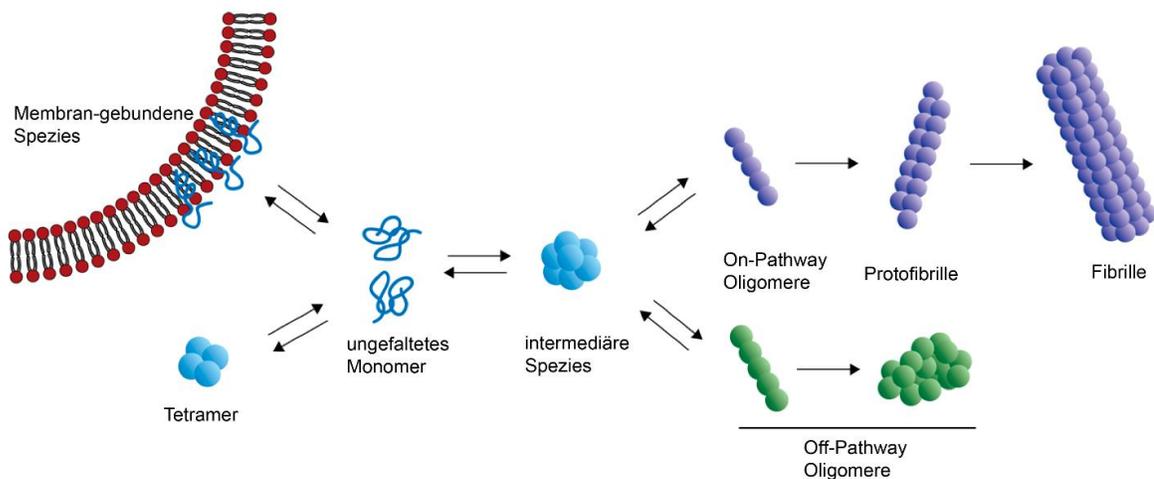


Abbildung 2: Monomeres α -Syn kann verschiedene Konformationen einnehmen. Für gewöhnlich liegt α -Syn als ungefaltetes Monomer vor, welches membrangebunden ist, oder es bildet ein gefaltetes Tetramer, welches nicht aggregiert. Allerdings kann es unter pathologischen

Bedingungen Oligomere bilden, die dann entweder die Fähigkeit haben, Protofibrillen und amyloide Fibrillen zu bilden (On-Pathway Oligomere) oder aber auch keine Fibrillen formen können (Off-Pathway Oligomere). Abbildung adaptiert von Du et al. 2020.

1.2.3. Toxizität von α -Syn

Es ist bekannt, dass nicht nur α -Syn Fibrillen toxisch sind (Peelaerts et al. 2015). Auch α -Syn-Oligomere zeigen eine gewisse Toxizität (Winner et al. 2011). Zu den verursachten Schäden gehören unter anderem mitochondriale Dysfunktion, Störung des endoplasmatischen Retikulums, Fehlfunktion des Proteasoms, Entzündungsreaktion durch Mikrogliose und Astrogliose, Membranschädigungen und Synapsen-Dysfunktion.

1.2.3.1 Mitochondriale Dysfunktion

Durch die α -Syn-Oligomere werden die Mitochondrien auf unterschiedliche Weise geschädigt. Zum einen oxidieren sie die ATP-Synthase, was eine Öffnung der Permeabilitäts-Transitions-Pore und dadurch die Schwellung der Mitochondrien zur Folge hat, was letztendlich zum Zelltod führt (Ludtmann et al. 2018). Zusätzlich verursachen die Oligomere eine Veränderung des Membranpotentials, eine gestörte Ionen-Homöostase, eine verstärkte Freisetzung von Zytocrom C und eine mitochondriale Fragmentierung (Luth et al. 2014; Plotegher et al. 2014). Außerdem können sowohl die Oligomere als auch die Monomere von α -Syn an die Translokase der äußeren Membran (engl.: translocase of the outer membrane, TOM) 20 Rezeptoren binden und so den Proteinimport verhindern (Di Maio et al. 2016).

Letztendlich beeinflussen α -Syn-Oligomere nicht nur den Mitochondrien der dopaminergen Neuronen, sondern auch die der Astrozyten. Sowohl α -Syn-Monomere als auch -Oligomere und -Fibrillen verursachen eine Aktivierung von Astrozyten. Allerdings verursachen nur die Oligomere eine Fehlfunktion in den Mitochondrien, was sich an einer verstärkten Abgabe von Wasserstoff-Peroxid durch die Zelle erkennen lässt (Chavarría et al. 2018).

1.2.3.2 Störung endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist für die Synthese, Faltung, Modifikation und den Transport zum Einsatzort von Proteinen notwendig. Somit ist das ER essenziell wichtig für die Zelle. Es hat sich gezeigt, dass sich toxische α -Syn Oligomere bereits vor Beginn der Symptome in dem ER anreichern und so es somit stark belasten (Colla et al. 2012). Des Weiteren stören die Oligomere die Bindung zwischen dem ER und den Mitochondrien, da sie an das VAMP (Vesikel-assoziiertes Membranprotein)-assoziierte Protein B (VAPB) des ERs binden, welches normalerweise eine Verbindung zu dem mitochondrialen Protein-

Tyrosin-Phosphatase interagierende Protein 51 (PTPIP51) bildet. Dies führt zu ER-Stress durch eine gestörte Ca^{2+} - Homöostase zwischen den Mitochondrien und dem ER. Letztendlich gibt es zusätzliche Hinweise, dass erhöhter ER-Stress die Aggregation von wildtyp α -Syn verstärkt (Jiang et al. 2010).

1.2.3.3 Proteasom-Fehlfunktion

Pathologisches α -Syn wird größtenteils über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) entfernt, welches auch für viele andere Proteine zuständig ist. Wenn dieser Mechanismus bei einer Überexpression von α -Syn überlastet oder blockiert wird, kann der Abbau von α -Syn durch den autophagisch-lysosomalen Abbauweg (ALP) vonstattengehen (Ebrahimi-Fakhari et al. 2011; Tanaka und Chiba 1998). Allerdings können α -Syn Oligomere die Proteasom-Maschinerie inhibieren und somit den Abbau von pathogenem α -Syn blockieren (McNaught und Jenner 2001). Es hat sich gezeigt, dass Oligomere und Fibrillen an die S20 und S26 Proteasome binden und diese somit hemmen (Lindersson et al. 2004; Emmanouilidou et al. 2010b).

1.2.3.4 Entzündungsreaktionen durch Mikrogliose und Astrogliose

Bei einem weiteren wichtigen Punkt zur Toxizität von α -Syn-Oligomeren spielen die Mikroglia und Astrozyten eine wichtige Rolle. Diese werden durch die α -Syn Oligomere aktiviert und treiben so die Neurodegeneration voran (Hirsch und Hunot 2009; Wu et al. 2002; Lee et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung von Mikroglia eine wichtige Rolle in der Pathologie von PD aber auch von MSA spielt und zu dem Zelltod von dopaminergen Neuronen führt (Stefanova et al. 2007; Ouchi et al. 2005). Die α -Syn Oligomere aktivieren Mikroglia über die Toll-like Rezeptoren (TLR). Dies geschieht sowohl bei Bindung an den TLR4 (Hughes et al. 2019) als auch bei der Bindung an TLR1 und TLR2 (Daniele et al. 2015). Aktivierte Mikroglia führen zu einer erhöhten Menge an Sauerstoffradikalen, welche dann die dopaminergen Neuronen schädigen und zum Zelltod führen. Dies zeigt sich daran, dass bei einer Blockade der Mikroglia-Aktivierung durch die Inhibierung der MAPK/NF- κ B Wege, auch ein verringerter Zelltod zu erkennen ist (Wilms et al. 2009; Zhang et al. 2005; Shavali et al. 2006). Zusätzlich zu den freien Sauerstoffradikalen, lassen sich proinflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1- α , IL-1- β , IL-6, Tumornekrosefaktor (TNF)- α und das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (engl.: *intercellular adhesion molecule 1*, ICAM-1) nachweisen (Mitra et al. 2011; Theodore et al. 2008). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die inflammatorische Wirkung von α -Syn Oligomeren von ihrer Größe abhängt. So wurde gezeigt, dass kleinere α -Syn Oligomere eine größere inflammatorische Wirkung haben als größere (Emin et al. 2022).

1.2.3.5 Membranbeschädigungen

Eine intakte Membran ist für Zellen überlebenswichtig, um sie vor äußeren Einflüssen zu schützen und um ihre natürliche Funktion zu erfüllen. Die Zellintegrität kann allerdings durch α -Syn Oligomere gestört werden. Diese können die Eigenschaften in einer Weise verändern, dass die Erregungsfähigkeit bei Pyramidenzellen sinkt (Kaufmann et al. 2016). Die Membranen haben auch die Aufgabe die Calcium-Homöostase aufrecht zu erhalten. Dies wird dadurch allerdings gestört, dass α -Syn Oligomere bereits vorhandene Membrandefekte stabilisieren und zusätzlich porenartige Strukturen in den Membranen bilden. Dadurch wird die Membranintegrität gestört und es kommt zu einem toxischen Calciuminflux (Chaudhary et al. 2016; Danzer et al. 2007; Angelova et al. 2016).

1.2.3.6 Synapsen-Dysfunktion

Wie bereits beschrieben, ist das monomerische α -Syn bei der Bildung des SNARE Komplexes involviert. Allerdings binden große α -Syn Oligomere häufig an die N-terminale Domäne von Synaptobrevin-2 und verhindern somit die Bildung des SNARE Komplexes und die Ausschüttung von Dopamin (Choi et al. 2013). Außerdem stören α -Syn Oligomere die Zusammenarbeit von Mikrotubuli und Kinesin, was zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli und einem verringerten axonalen Transport führt. Zusätzlich verhindern sie die Polymerisierung von Tubulin, was letztendlich zum Zelltod führt (Chen et al. 2007; Prots et al. 2013). Es gibt außerdem Hinweise darauf, dass extrazelluläre α -Syn Oligomere N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren aktivieren, so einen starken Calcium-Ionen Einstrom verursachen und somit auch die Langzeitpotenzierung stören, da die Synapse gesättigt ist. Dies lässt sich allerdings nicht bei α -Syn Monomeren oder Fibrillen erkennen (Diógenes et al. 2012).

1.2.3.7. Prionen-artige Vermehrung

Die pathogene Form des Prionproteins (engl.: *prion protein scrapie*, PrP^{Sc}) hat eine stark ausgeprägte fibrilläre β -Faltblattstruktur und rekrutiert zelluläres, physiologisches Prionprotein (engl.: *cellular prion protein*, PrP^C), wandelt dessen α -Helix-Struktur auch zu β -Faltblättern um, verursacht eine Aggregation des PrP und führt dann zu einer Neurodegeneration (Pan et al. 1993; Colby und Prusiner 2011; Kraus et al. 2021). Dadurch bilden sich die Krankheitsbilder der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung im Menschen, der bovinen spongiformen Enzephalopathie in Rindern, der Scrapie-Erkrankung in Schafen und der chronisch zehrenden Krankheit in Elchen und Hirschen aus (Prusiner 1991; Tamgüney et al. 2006). Diese Mechanismen lassen sich auch für α -Syn Oligomere dadurch erkennen, dass diese auch monomerisches physiologisches α -Syn rekrutieren,

eine ausgeprägte β -Faltblattstruktur bilden. Dadurch vermehren sie sich durch sich selbst und zeigen somit eine prionartige Vermehrung (Luk et al. 2009; Luk et al. 2012a; Masuda-Suzukake et al. 2013).

1.2.4. Übertragung von α -Syn

Die α -Syn-Oligomere können über verschiedene Wege über kurze Distanzen von Zelle zu Zelle, aber auch über weite Strecken in ganz andere Körperareale übertragen werden und so kann α -Syn-Pathologie zusätzlich zum zentralen Nervensystem auch in der Peripherie im enterischen Nervensystem nachgewiesen werden (Annerino et al. 2012; Recasens und Dehay 2014).

1.2.4.1 Interzelluläre Übertragung

Die Frage um eine interzelluläre Übertragung von α -Syn Oligomeren wurde schon früh angestoßen. Bei Postmortem-Studien an PD-Patienten, welche 11–16 Jahre zuvor Transplantate aus fötalem Hirngewebe erhalten hatten, war aufgefallen, dass dieses transplantierte Gewebe auch α -Syn-Pathologie zeigte. Daraus ließ sich schließen, dass bei pathologischem α -Syn eine Zell-zu-Zell Übertragung stattfindet (Li et al. 2008; Kordower et al. 2008). Ein weiterer Hinweis auf eine Zell-zu-Zell-Übertragung ist, dass wenn in Mausversuchen α -Syn Aggregate intrazerebral injiziert werden, sich auch in anderen Hirnarealen α -Syn-Pathologie finden lässt (Luk et al. 2012b). Für diese Zell-zu-Zell-Übertragung gibt es verschiedene Möglichkeiten (Abb.3). Extrazelluläres α -Syn könnte entweder durch Endozytose (Abb.3a, 2) (Sung et al. 2001) oder aber auch über eine rezeptorvermittelten Aufnahme (Abb.3a, 3) (Lee et al. 2008a; Mao et al. 2016) in eine benachbarte Zelle übertragen werden. Eine weitere Möglichkeit der Übertragung wurde für α -Syn in Zellkulturen bereits über eine Calcium-abhängige Exozytose (Abb.3b, 4) (Emmanouilidou et al. 2010a; Danzer et al. 2012) gezeigt. Als weitere Übertragungsmöglichkeit sieht man Nanotunnel (Abb.3, 5) (Abounit et al. 2016), welche sich von einem Neuron zum nächsten Neuron spannen. Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie bei Polyglutaminerkrankungen wurde gezeigt, dass die geformten Fibrillen auch durch die direkte Penetration durch die Membran (Abb.3a, 1) in die Empfängerzelle gelangen können (Ren et al. 2009). Dieser Mechanismus konnte allerdings bisher nur für monomerisches α -Syn gezeigt werden (Ahn et al. 2006; Grozdanov und Danzer 2018).

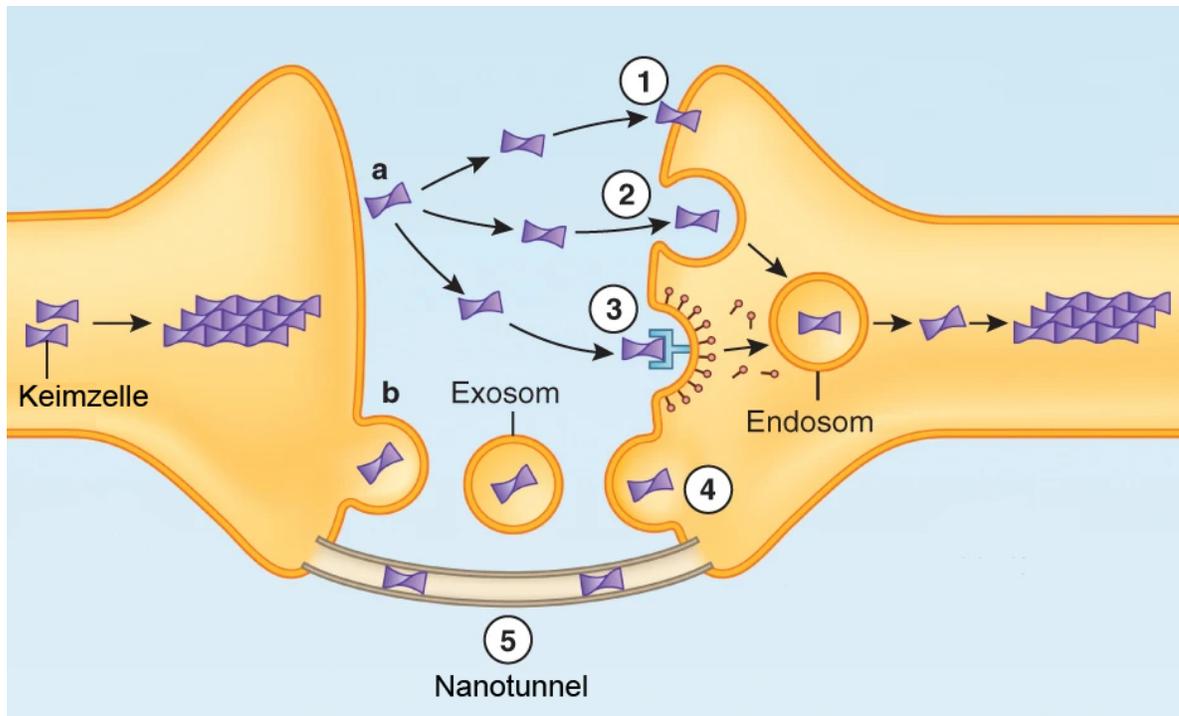


Abbildung 3: Übertragungsweg von α -Syn zwischen Neuronen. In oligomerischer Form kann α -Syn sich von einem Neuron auf ein anderes Neuron verbreiten und dort als Keimzelle Fibrillen sähen. Dies geschieht über die fünf möglichen Wege von Diffusion oder Penetration der Membran (1), Endozytose (2), rezeptorvermittelte Aufnahme (3), Exozytose (4) oder über Nanotunnel (5), die sich von einem Neuron zum nächsten Neuron spannen. Abbildung adaptiert von Guo und Lee 2014.

1.2.4.2 Übertragung über die Darm-Hirn-Achse

Dadurch, dass α -Syn von Zelle zu Zelle übertragen werden kann, hat es die Möglichkeit zu unterschiedlichen Arealen zu gelangen, wenn diese neuronal verbunden sind. So kann monomerisches und oligomerisches α -Syn durch die Neuronen in dem Bulbus olfactorius aufgenommen und in verschiedene Hirnregionen transportiert werden (Rey et al. 2013). Zusätzlich ist es allerdings auch möglich, dass PD-Pathologie im Darmtrakt entsteht und aus dem enterischen Nervensystem über den DMX in das zentrale Nervensystem übergehen und sich dann in verschiedenen Hirnarealen ausbreiten kann. So findet sich PD-Pathologie bereits im Frühstadium von PD und auch bei Patienten mit idiopathischer REM-Schlaf-Verhaltensstörung (engl.: *idiopathic rapid eye movement (REM) sleep behavior disorder*, iRBD) im Magen-Darm-Bereich. Ungefähr 80% der iRBD-Patienten entwickeln später PD, weshalb es als Vorstufe von PD gesehen werden kann (Braak et al. 2006; Sprenger et al. 2015). Die Übertragung über die Darm-Hirn-Achse wurde auch durch verschiedene Injektionsversuche von α -Syn Fibrillen in Maus und Ratten gezeigt, beispielsweise durch die intraperitoneale, intragastrische, intramuskuläre und intravenöse Injektion von α -Syn Fibrillen in Mäusen (Lohmann et al. 2019; Uemura et al. 2018; Kim et

al. 2019; Sacino et al. 2014). Diese Übertragung durch den Vagusnerv funktioniert allerdings auch in die andere Richtung und überträgt α -Syn vom Gehirn zum Magen-Darm-Trakt (van den Berge et al. 2019).

1.3. Morbus Parkinson in Mausmodellen

Das klinische Bild von PD kann in Mausmodellen entweder durch die Verabreichung von Neurotoxinen, aber auch durch die genetische Veränderung der Mäuse hervorgerufen werden.

1.3.1. PD im Mausmodell durch die Injektion von Neurotoxinen

Die Injektion von 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) führt bei Mäusen zum Tod von dopaminergen Neuronen. Nach der systemischen Injektion kann MPTP die Blut-Hirn-Schranke passieren. Danach wird es durch Astrozyten in 1-methyl-4-phenylpyridinium umgewandelt, welches dann in dopaminergen Neuronen aufgenommen wird und den Komplex 1 der Mitochondrien und dadurch die Atmungskette stört. Dies führt zu einem Anstieg von Sauerstoffradikalen und letztendlich zum Zelltod (Di Monte et al. 1992; Javitch et al. 1985; Przedborski und Vila 2003).

Ein weiteres toxin-induziertes Modell ist das 6-hydroxy-dopamin (6-OHDA) Modell. Da 6-OHDA nicht die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, muss es intrazerebral injiziert werden und führt auch zum Tod von dopaminergen Neuronen (Duty und Jenner 2011; Perese et al. 1989). Es wird allerdings nicht selektiv nur durch Dopamin-Transporter aufgenommen, sondern auch durch Noradrenalin-Transporter. Um selektiv dopaminerge Neurone zu zerstören, müssen die Noradrenalin-Transporter inhibiert werden (Luthman et al. 1989). Ähnlich wie bei dem MPTP-Modell wird hier auch wieder die Atmungskette der Mitochondrien gestört, was durch oxidativen Stress und Fehlen von ATP zum Zelltod führt (Mazzio et al. 2004).

Zusätzlich führt die Behandlung mit dem Pestizid Rotenon auch zu einer Komplex 1-Inhibierung in Mitochondrien, was einen ähnlichen Effekt zu den bereits genannten Modellen hat.

Letztendlich lässt sich sagen, dass Toxin-induzierte Tiermodelle zwar die motorische Symptomatik von PD gut modelliert. Die Verbreitung von α -Syn-Aggregaten lässt sich dadurch allerdings nicht erforschen.

1.3.2. Genetische Mausmodelle

Durch genetische Mausmodelle lassen sich einige Charakteristika von PD besser darstellen. Hier können transgene (Tg) Mäuse humanes α -Syn als Wildtyp oder auch mit familiären Mutationen überexprimieren. Diese lassen sich dann unter anderem über den Thymuszellantigen 1 (Thy1)-Promotor, den plättchenbasierter Wachstumsfaktor (engl.: platelet-derived growth factor, PDGF)-Promotor oder den Prion-Promotor exprimieren. So lassen sich die charakteristische Pathologie und Entzündungsreaktionen wie Mikrogliose und Astrogliose modellieren (Giasson et al. 2002; Rockenstein et al. 2002). Eine weitere Möglichkeit, eine Überexpression von α -Syn in Tiermodellen zu erreichen ist die Einbringung von α -Syn über virale Vektoren. Dies führt auch zu einer Zerstörung von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra (Peelaerts et al. 2015; Theodore et al. 2008). Letztendlich gibt es noch Modelle, wo die Erkrankung durch die Injektion von vorgeformten α -Syn-Fibrillen induziert werden. Diese enthalten die Möglichkeit die Übertragung oder auch die prionartige Verbreitung bei Synucleinopathien zu studieren (Lohmann et al. 2019; Luk et al. 2012b; Okuda et al. 2022).

1.4. Immunisierung gegen Morbus Parkinson

Da es zurzeit noch keine Möglichkeit der Vorbeugung gegen PD gibt, steigt das Interesse daran, eine Prävention oder Behandlung in Form einer Immunisierung zu finden. Dazu finden sich bereits präklinische, aber auch klinische Studien für passive und aktive Immunisierung (Knecht et al. 2022). Es wurde unter anderem bereits gezeigt, dass gegen α -Syn gerichtete Antikörper nicht nur extrazelluläres, sondern auch intrazelluläres α -Syn binden können, wodurch die interzelluläre Übertragungen von pathologischem α -Syn inhibiert wird und die Oligomere zerstört werden können (Tran et al. 2014; Masliah et al. 2005; Bae et al. 2012).

1.4.1. Passive Immunisierung gegen Morbus Parkinson

Bei der passiven Immunisierung handelt es sich nicht um Prävention, sondern die Behandlung von PD. Hier werden Antikörper, welche gegen α -Syn-Oligomere oder Fibrillen gerichtet sind, injiziert, um aggregiertes α -Syn schnell zu blockieren und zu entfernen (Bergström et al. 2016). Hier gibt es bereits vielversprechende Ergebnisse in präklinischen Studien, wo die Versuchstiere eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten und eine verringerte α -Syn-Pathologie zeigten (Masliah et al. 2011; Games et al. 2014). Ein paar dieser Antikörper konnten auch bereits in klinischen Phase I-Studien getestet werden und zeigten dort eine gute Verträglichkeit und eine Verringerung von

freiem α -Syn im Serum (Jankovic et al. 2018; Brys et al. 2019). Ein großer Nachteil an passiver Immunisierung ist allerdings, dass eine regelmäßige Gabe an Antikörpern notwendig ist und diese Behandlung dadurch sehr teuer und zeitaufwendig ist (Schneeberger et al. 2016).

1.4.2. Aktive Immunisierung gegen Morbus Parkinson

Vorteilhafter im Vergleich zu der passiven Immunisierung ist hingegen die aktive Immunisierung, die nicht regelmäßig durchgeführt werden müsste. In Mausversuchen konnte gezeigt werden, dass das Prinzip von aktiver Immunisierung gegen α -Syn funktionieren kann (Masliah et al. 2005). Dies konnte allerdings nicht auf klinische Studien übertragen werden, da die Gefahr von Autoimmunreaktionen zu groß ist, wenn direkt gegen α -Syn geimpft wird. Bei einem experimentellen Impfstoff gegen β -Amyloid ist es bei klinischen Studien zu Autoimmunreaktionen in Form von Meningoenzephalitis durch T-Helferzellen gekommen (Orgogozo et al. 2003). Aus dem Grund wurden dann Vakzine nur mit einzelnen kurzen Epitopen entwickelt. Da diese Epitope nur kurz waren, sollte damit erreicht werden, dass keine Autoimmunreaktion auftritt. Damit trotzdem Antikörper gebildet werden, wurde daher ein fremdes Hilfsepitop an die α -Syn Epitope fusioniert. Dies führte zu einer starken Antikörperproduktion ohne die Gefahr von Autoimmunreaktionen durch T-Helferzellen (Ghochikyan et al. 2014). Impfstoffe, die auf diese kurzen Epitope zurückgreifen, konnten in ersten klinischen Studien auch bereits auf eine gute Verträglichkeit getestet werden (Poewe et al. 2021; Volc et al. 2020).

1.5. Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte ein Kombinationsimpfstoff gegen fibrilläres α -Syn in einem PD-Mausmodell mit TgM83^{+/-}-Mäusen getestet werden. Zu diesem Zweck wurde das HET-s Protein als Basis verwendet. HET-s ist ein Prionprotein des Pilzes *Podospira anserina*. Regulär hat das Protein 289 Aminosäuren. Allerdings war für diese Arbeit nur die Region HET-s(218-289) relevant, da diese Region amyloide Fibrillen bildet (Coustou et al. 1997; Balguerie et al. 2003). HET-s(218-289) besitzt acht β -Faltblattstrukturen, welche Fibrillen bilden, indem sich sechs β -Faltblätter übereinanderlegen und so ein β -Solenoid in Dreiecksform bilden (Wasmer et al. 2008) (Abb. 4A - C). Die vier verschiedenen Impfstoffkandidaten wurden auf Basis von der Struktur synthetischer α -Syn Fibrillen, welche mit Kryoelektronenmikroskopie (Guerrero-Ferreira et al. 2018) und Festkörper Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: *nuclear magnetic resonance*, NMR) (Tuttle et al. 2016) detektiert wurden, erstellt. Mit gezielter Mutagenese wurden so die Aminosäuren

ausgetauscht, dass sie Epitopen des fibrillären α -Syn ähneln. So ergaben sich die Impfstoffkandidaten α -SC3 (Abb. 4D), α -SC6 (Abb. 4E), α -SC8 (Abb. 4F) und α -SC9 (Abb. 4G). Daraufhin wurde noch sichergestellt, dass alle vier Impfstoffkandidaten Fibrillen bilden (Abb. 5A-D). Letztendlich wurden alle Impfstoffkandidaten zu einem quadrivalenten Impfstoff vereint.

Für die Testung der Impfstoffkandidaten im TgM83^{+/-}-Mausmodell wurden die Mäuse zunächst in drei Kohorten eingeteilt, welche später über unterschiedliche Injektionsrouten mit α -Syn-Fibrillen injiziert wurden. Diese drei Kohorten waren in jeweils zwei Untergruppen unterteilt. Eine dieser Untergruppen in jeder Kohorte wurde dann geimpft und dann im Abstand von jeweils zwei Wochen geboostert. Zwei Wochen nach der letzten Boostergabe wurde die Erkrankung durch die Injektion von vorgeformten α -Syn Fibrillen induziert werden (Lohmann et al. 2019). Um „Brain-first“ PD modellieren zu können, wurde eine Kohorte intrazerebral mit α -Syn-Fibrillen injiziert. Für „Body-first“ PD wurden zwei Kohorten verwendet. Davon wurden die Tiere aus einer Kohorte intraperitoneal und aus der letzten Kohorte intragastrisch injiziert. Danach wurden die Auswirkungen der Impfung auf das Überleben, die Gewichtszunahme und der Leistung in Verhaltenstests der Mäuse untersucht. Des Weiteren sollte die Pathologie durch histologische Färbungen und biochemische Untersuchungen verglichen werden und die Immunantwort der Mäuseren durch ELISA Tests eruiert werden.

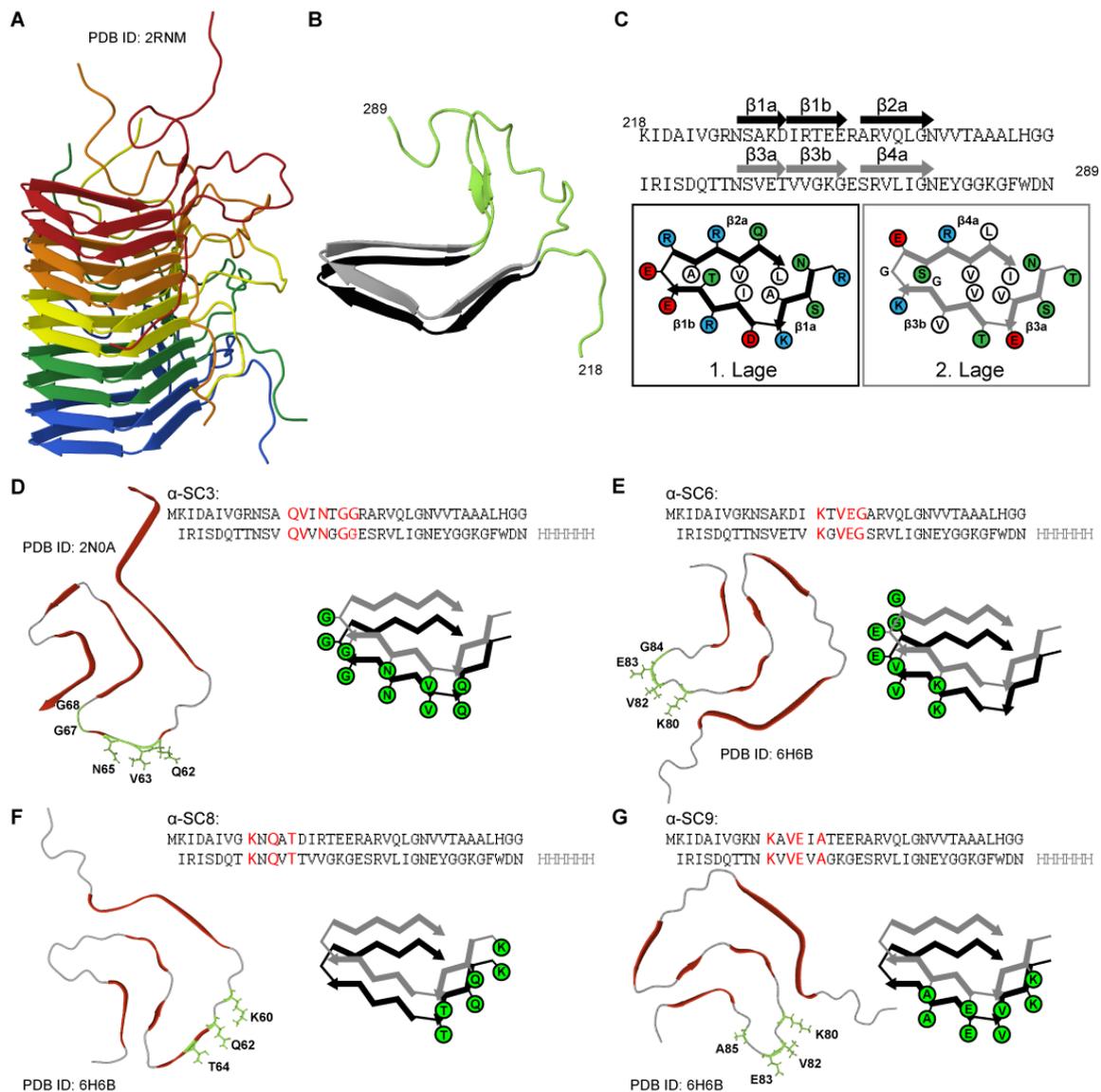


Abbildung 4: Die vier Impfstoffkandidaten, welche verschiedene Epitope von α -Syn enthalten. (A) HET-s(218-289) bildet Fibrillen einer dreieckigen β -Solenoid-Struktur. Die unterschiedlichen Farben repräsentieren jeweils ein HET-s(218-289) Monomer (Wasmer et al. 2008) (B) Ein HET-s(218-289) Monomer enthält acht β -Faltblätter, von denen sechs in zwei Lagen (schwarz und grau) übereinander in eine Dreiecksstruktur gelegt ist. Diese Dreiecksstruktur bildet einen hydrophoben Kern. (C) An der Sequenz von HET-s(218-289) sind die β -Faltblätter, die in zwei Lagen übereinander liegen, mit schwarzen und grauen Pfeilen markiert. In den zwei Abbildungen darunter sind die Strukturen der Lagen mit schwarzen und grauen Pfeilen markiert. In den zwei Abbildungen darunter sind die Strukturen der Lagen mit Aminosäuren mit ihren polaren (grün), hydrophoben (weiß), negativ geladenen (rot) und positiv geladenen (blau) Resten markiert. (D) Für die Erstellung von α -SC3 wurden die Reste K229, D230, R232, E234 und E235 in der ersten Sprosse und E265, T266, V268, K270 und G271 in der zweiten Sprosse von HET-s durch Q62, V63, N65, G67 und G68 von α -Syn ersetzt, um ein Epitop der Struktur PDB ID 2N0A (Tuttle et al. 2016) zu modellieren. (E) Für die Erstellung von α -SC6 wurden dann die Reste R232, E234, (E235) und R236 der ersten Sprosse und V268, K270, G271, E272 zweiten Sprosse von HET-s durch die Aminosäuren K80, V82, E83 und G84 von α -Syn ersetzt, um ein Epitop der Struktur PDB ID 6H6B (Guerrero-Ferreira et al. 2018) zu modellieren. (F) Für die Erstellung von α -SC8 wurden dann die

Reste R225, S227 und K229 auf der ersten Sprosse und T261, S263 und E265 in der zweiten Sprosse von HET-s durch K60, Q62 und T64 von α -Syn ersetzt, um ein Epitop der Struktur PDB ID 6H6B (Guerrero-Ferreira et al. 2018) zu modellieren. **(G)** Für die Erstellung von α -SC9 wurden die Aminosäuren S227, K229, D230 und R232 in der ersten Sprosse und S263, E265, T266 und V268 in der zweiten Sprosse des HET-s durch K80, V82, E83 und A85 von α -Syn ersetzt, um ein Epitop der Struktur PDB ID 6H6B (Guerrero-Ferreira et al. 2018) zu modellieren.

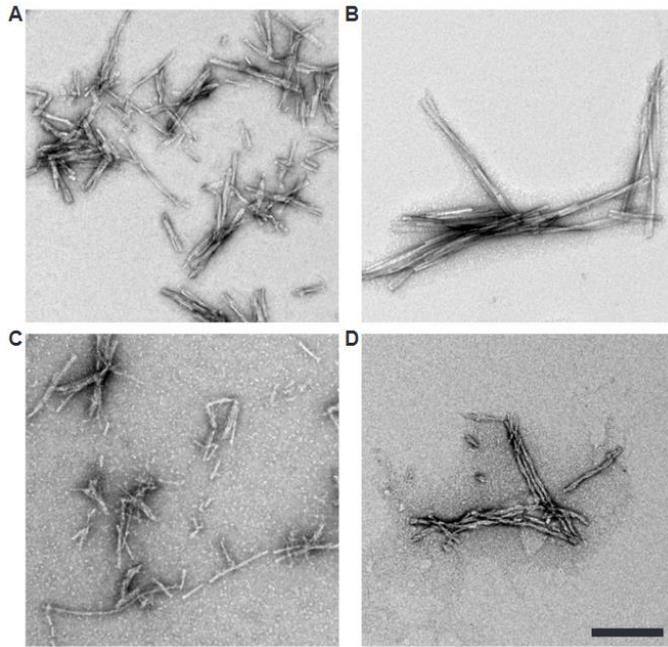


Abbildung 5: Die vier Impfstoffkandidaten sind fähig Fibrillen zu bilden. Aufnahmen mit Transmissionselektronenmikroskopie zeigte, dass alle vier Impfstoffkandidaten, α -SC3 **(A)**, α -SC6 **(B)**, α -SC8 **(C)** und α -SC9 **(D)** Fibrillen bilden. Der Maßstab **(D)** entspricht 200 nm und gilt für alle Panele.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

Die verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders angegeben, von Carl Roth oder Sigma Aldrich.

2.1.1. Puffer

Tabelle 1: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
Blocking-Puffer	20 % Normales Ziegenserum (engl.: <i>Normal goat serum</i> , NGS) + 1 % Bovines Serumalbumin (BSA) in 1x Phosphatgepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate-buffered saline</i> , PBS) + 0,5 % Triton X-100
Citratpuffer	0,01M Natrium-Citratpuffer , pH 6,0
Homogenisierungspuffer	PBS (pH 7,4), 0,1x HALT-Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific) und $\geq 0,25$ U/ μ L Benzonase (Merck)
Kupfersulfatlösung	10 mM CuSO ₄ in 50 mM Ammoniumacetat in ddH ₂ O, pH 5,0
Lysepuffer	20 mM Tris, pH 8.0; 2 cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor (Roche) für 50 mL
PBS-T (0,1 %)	0,1 % Tween-20 in 1x PBS
Sekundärantikörperpuffer	1 % NGS + 1 % BSA in 1x PBS
TBS-T (0,05 %)	0,05 % Tween-20 in 1x TRIS-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>TRIS-buffered saline</i> , TBS)
TD4215-Puffer	4 % Natriumdodecylsulfat (SDS), 2 % β -Mercaptoethanol, 192 mM Glycin, 25 mM Tris, 5 % Sukrose, 0,1x HALT-Protease und Phosphatase Inhibitor Cocktail und 250 U/mL Benzonase
Waschpuffer	1x PBS + 0,25 % Triton X-100

2.1.2. Primärantikörper

Tabelle 2: Verwendete Primärantikörper mit Hersteller, Spezies und Verdünnung

Zielantigen (alternativer Name) [Klonnummer]	Hersteller und Katalognummer	Spezies	Verdünnung (IF/IHC)	Verdünnung (WB)
Alpha-Synuclein (phospho S129) [EP1536Y]	AB51253 Abcam	Kaninchen	1:200	1:1000
Alpha-Synuclein (phospho S129) [pSyn#64]	015-25191 Wako	Maus	1:1200	–
Alpha-Synuclein (phospho S129) [pSyn#64], biotin-konjugiert	010-26481 Wako	Maus	1:1000	–
Saures Gliafaserprotein (engl.: Glial fibrillary acidic protein, GFAP)	Z0334 Dako	Kaninchen	1:1000	–
ionisiertes, kalziumbindendes Adaptormolekül 1 (Iba-1)	019-19741 Wako	Kaninchen	1:500	–

2.1.3. Sekundärantikörper

Tabelle 3: Verwendete Sekundärantikörper mit Hersteller, Spezies und Verdünnung

Sekundärantikörper	Hersteller und Katalognummer	Spezies	Verdünnung (IF/IHC)	Verdünnung (Biochemie)
AlexaFluor 488, Anti-Maus IgG	A-11001, Thermo Fisher Scientific	Ziege	1:1000	–
AlexaFluor 568, Anti-Kaninchen IgG	A-11011, Thermo Fisher Scientific	Ziege	1:1000	–
Anti-Kaninchen IgG, Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish</i>	Cay100004301, Cayman Chemicals	Ziege	–	1:10.000

peroxidase, HRP)-konjugiert				
Anti-Maus IgG, HRP- konjugiert	31430, Invitrogen	Ziege	–	1:5000

2.2. Methoden

Wenn keine Temperaturen angegeben sind, wurden diese Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.2.1. Tiere

Alle Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV) genehmigt. Die Tiere wurden in Gruppenhaltung mit einem Tag/Nachtzyklus von 12 Stunden gehalten. Futter und Wasser war ad libitum vorhanden. Für die Versuche wurden B6;C3-g(*Prnp*-SNCA*A53T)83Vle/J (TgM83) Mäuse (The Jackson Laboratory), welche das humane α -Syn mit der A53T-Mutation exprimieren (Giasson et al. 2002), mit Wildtyp C57BL/6 J Mäusen gekreuzt, um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Diese wurden auf das Vorhandensein des Transgens genotypisiert.

2.2.2. Genotypisierung

Für die Genotypisierung wurde mit dem „Blood and Tissue Kit“ (Qiagen) die Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid, DNA) extrahiert. Diese wurde dann auf 2 ng/ μ L verdünnt. Alle Primer wurden bei BioTez bestellt.

Tabelle 4: Master-Mix für Real-Time PCR

	Sequenz	Finale Konzentration	Für 1 Probe
2x KAPA Probe Fast QPCR (KK4701, Merck)		1x KAPA	7,5 μ L
ddH2O			1 μ L
40 μM oIMR1544 (IC forward)	CAC GTG GGC TCC AGC ATT	0,40 μ M	0,15 μ L
40 μM oIMR3580 (IC reverse)	TCA CCA GTC ATT TCT GCC TTT G	0,40 μ M	0,15 μ L

40 µM oIMR1770 (Tg forward)	TGA CGG GTG TGA CAG CAG TAG	0,40 µM	0,15 µL
40 µM oIMR1771 (Tg reverse)	CAG TGG CTG CTG CAA TG	0,40 µM	0,15 µL
5 µM TmoIMR0025 (Tg Probe)	6-FAM CCC TGC TCC CTC CAC TGT CTT CTG G - BHQ1	0,15 µM	0,45 µL
5 µM TmoIMR0105 (IC Probe)	Cy5- CCA ATG GTC GGG CAC TGC TCA A - BBQ	0,15 µM	0,45 µL

Dieser Master-Mix wurde mit 5 µL DNA (10 ng) gemischt und mit dem Programm in einem PCR-Cycler (BioRad) amplifiziert.

Tabelle 5: Einstellungen PCR-Cycler

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Nummer an Zyklen
1	95	3:00	1
2	95	0:05	40
3	60	0:30	
+ Platte lesen			
4	72	0:30	
+ Platte lesen			
5	72	2:00	1
6	10	∞	

Danach wurden die Proben mit den Kontrollen verglichen und so genotypisiert.

2.2.3. Vakzinierung und Blutentnahme

Die Vakzine lagen in Tris/Acetat Puffer mit Azid vor und wurden einen Tag vor der Vakzinierung in PBS-Puffer umgepuffert, sonifiziert, 1:1 mit Aluminiumhydroxid (InvivoGen) versetzt, zwei Minuten mit einem Reagenzschüttler gemischt und dann über Nacht bei 4 °C gelagert. Kurz vor Injektion wurden die Vakzine erneut zehn Minuten mit einem Reagenzschüttler gemischt. Bei jeder Dosis hat jede Maus 100 µg Antigen erhalten. Für die Vakzinierung wurden 6–8 Wochen alte TgM83^{+/-}-Mäuse in ausgeglichenem Geschlechterverhältnis verwendet. Es wurden pro Kohorte 12 Tiere geimpft. Dazu kamen noch 20 weitere Tiere pro Kohorte als ungeimpfte Kontrollen, bei denen nur die

Blutentnahme und später die Inokulierung mit α -Syn-Fibrillen durchgeführt wurde. Die Mäuse erhielten eine Primärvakzinierung und im Abstand von jeweils zwei Wochen noch zusätzlich drei Booster-Impfungen. Vor jeder Vakzinierung und zwei Wochen nach der dritten Booster-Impfung wurde eine Blutentnahme durchgeführt (Abb. 6). Für die Vakzinierung wurden die Mäuse mit Isofluran in Narkose versetzt und intraperitoneal injiziert. Für die Blutentnahme geschah unter Narkose. Die Schwanzvene wurde mit einem Skalpell angeritzt und 50 μ L Blut mit einer Pipette abgenommen. Dies wurde 1:1 mit 5 % (v/v) Natriumcitrat in ddH₂O versetzt. Die Blutproben wurden dann bei 500 x g und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand (Plasma) wurde dann in ein Schraubröhrchen übertragen und bei -80°C gelagert.

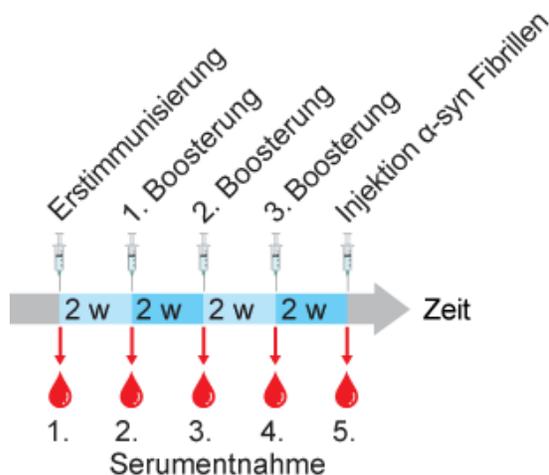


Abbildung 6: Vakzinierungsschema. Es wurden insgesamt vier Vakzinierungen im Abstand von jeweils zwei Wochen durchgeführt. Vor jeder Vakzinierung und zwei Wochen nach der letzten wurde eine Blutentnahme durchgeführt.

2.2.4. Herstellung von α -Syn-Fibrillen

N-terminal acetyliertes humanes wild-typ α -Syn wurde in *Escherichia coli* (E. coli) BL21(DE3) exprimiert, welches den pT7-Vektor für Codon-optimiertes α -Syn und den pNatB-Vektor für den N-terminalen Acetyltransferase B-Komplex aus *Schizosaccharomyces pombe* (Johnson et al. 2010) trug. Glycerolstocks dieser Bakterien wurden auf Agarplatten mit 100 μ g/mL Ampicillin and 34 μ g/mL Chloramphenicol ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur in 120 mL (500 mL Kolben mit Schikanen) in Lysogeny Broth (LB) Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C und 120 Umdrehungen pro Minute (engl.: *revolutions per minute*, rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die optische Dichte (OD) der Vorkultur gemessen und 1 L LB Medium mit Ampicillin/Chloramphenicol wird in Kolben mit Schikanen angesetzt, mit einer OD von 0,1 inokuliert und wieder bei 37 °C und 120 rpm

inkubiert. Nach Erreichen einer OD von 1,0-1,2 wurde mit 1 mM Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Die Inkubation erfolgte dann für 4,5 h bei 37 °C und 120 rpm. Die Zellernte erfolgte bei 5000 x g bei 4 °C für 20 min. Das Pellet wurde dann in 50 mL Falcons überführt und bei -20 °C gelagert.

Zur Zelllyse wurde das Pellet mit den induzierten Bakterien auf Eis aufgetaut und in ca. 25 mL Lysepuffer pro 1L Expressionsansatz resuspendiert. Die Zelllösungen wurden zum Zellaufschluss für 2 x 15 min bei 95-100 °C im Wasserbad aufgeköcht und anschließend bei 20.000 x g für 30 min und 4 °C zentrifugiert. Für die Ammoniumsulfat-Fällung wurde der Überstand bei 4 °C über 5 min mit Ammoniumsulfat-Salz versetzt (0,45 g/mL) und anschließend 30 min bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Danach wurde die Lösung bei 20.000 x g für 30 min und 4 °C zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert.

Für die Aufreinigung über das ÄKTA-Pure-Chromatographiesystem (GE Healthcare) wurde das Pellet in 50 mL 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) resuspendiert. Das α -Syn wurde dann mit der Anionenaustausch-Chromatographiesäule HiPrep QFF 16/10 und einem linearen Gradienten von 20 mM Tris-HCl-Bindepuffer (pH 8,0) zu 1 M NaCl in 20 mM Tris-HCl-Elutionspuffer (pH 8,0) aufgereinigt. Die Ammoniumsulfat Fällung wurde wiederholt, das Pellet wurde in 50 mM Tris-HCl (pH 7,2) resuspendiert und dann über eine HiLoad 16/60 Superdex 75 pg Größenausschluss-Säule (Cytiva) über 1,5 Säulenvolumina nach der Größe aufgereinigt. Um 50 mM Tris-HCl und 150 mM NaCl zu erhalten, wurde entsprechend NaCl hinzugefügt. Das Protein wurde mit einem Vivaspin-Konzentrator (Sartorius) auf 5 mg/mL konzentriert und durch Inkubation bei 37 °C und 1000 rpm auf einem Thermomixer (Eppendorf) für 7 Tage fibrilliert. Die Fibrillen wurden in vier Beschallungsschritten von je 15 s mit 2 min Pause zwischen den einzelnen Schritten mit dem Ultraschallstab Sonoplus Mini20 (Bandelin) und der MS 1,5-Mikrosonde beschallt.

2.2.5. Inokulierung der α -Syn Fibrillen

2.2.5.1. Intrapertoneale Injektion

Für die intraperitoneale Challenge (IP) wurden jeder Maus nach der Blutabnahme unter Narkose 20 μ L einer 2,5 μ g/ μ L-Suspension α -Syn-Fibrillen (50 μ g) mit 30G-Insulinspritzen (B.Braun) in den Bauchraum injiziert.

2.2.5.2. Intrazerebrale Injektion

Für die intrazerebralen Injektionen (IZ) war es notwendig, dass den Mäusen 30 min vor der Operation Carprofen (5 mg/kg) subkutan injiziert wird. Dann wurden die Mäuse mit Isofluran in Narkose versetzt. Am Zwischenzehreflex wurde überprüft, ob die notwendige

Narkosetiefe erreicht war. Als Nächstes wurde der Kopf der Maus in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und in den Ohren fixiert. Die Augen wurden mit Augen- und Nasensalbe (Bepanthen) abgedeckt, damit sie während der Operation nicht trocken werden. Danach wurde der Kopf rasiert und mit Iodlösung (Betaisodona) desinfiziert. Für die Operation wurde dann ein ca. 1 cm langer Schnitt gemacht und die Landmarken Lambda und Bregma ausgemacht. Auf die Schädeldecke wurden 1-2 Tropfen 1% Lidocain gegeben. Die Position für die Injektion war das rechte Striatum mit den Koordinaten +0,2 mm relativ zum Bregma und +2,0 mm relativ zur Mittellinie. Dieser Punkt wurde dann markiert und es wurde ein Loch durch die Schädeldecke gebohrt. Dort wurde die Nadel einer 10 µL Hamilton-Spritze 2,6 mm unter die Dura mater gestochen. Die Mäuse haben eine Dosis von 10 µg α-Syn-Fibrillen erhalten. Dafür wurden in jede Maus 4 µL Fibrillen (2,5 µg/µL) mit einer Flussrate von 1,0 µL/min injiziert. Während der Injektion wurde die Blutentnahme, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Nach Beendigung der Injektion, wurde die Nadel noch für eine Minute an der Stelle gelassen und danach über einen Zeitraum von 5 min entfernt. Danach wurde die Wunde mit Gewebekleber (3M Animal Care Products) verschlossen und die Maus wurde zum Aufwachen in einen separaten Käfig verbracht.

2.2.5.3. Intragastrische Injektion

Für die intragastrische Injektion (IG) von α-Syn-Fibrillen wurde eine aseptische Laparotomie durchgeführt. Zur Analgesie erhielten die Tiere eine subkutane Injektion von Buprenorphin (0,05 mg/kg, Bayer) und wurden anschließend mit Isofluran narkotisiert. Das Abdomen wurde rasiert, desinfiziert und mit einer Schere wurde eine kleine Inzision gemacht. Der Magen wurde freigelegt und die α-Syn-Fibrillen wurden an vier Stellen im Abstand von 0,5 cm mit einer 10 µL Mikroliterspritze (Hamilton) in die Wand des Pylorus und des Duodenums injiziert. An jeder Injektionsstelle wurden 6,25 µg (2,5 µL) α-Syn-Fibrillen injiziert. Anschließend wurde die Bauchdecke vernäht und die Haut mit Wundklammern verschlossen, welche zwei Wochen später entfernt wurden. Nach der Operation erhielten die Tiere eine einmalige subkutane Injektion von Carprofen (5 mg/kg) und über das Trinkwasser für 3 Tage eine Mischung aus Metamizol (0,5 mg/mL, WDT) und 10 % (w/v) Saccharose in ihrem Trinkwasser.

2.2.6. Verhaltensversuche

Die intrazerebral-injizierten Mäuse wurden nach 2 und 5 Monaten getestet. Die intragastrisch- und intraperitoneal-injizierten Mäuse wurden nach 3 und nach 7 Monaten getestet. Der Prozentsatz der durchschnittlichen Leistung eines Tieres in jedem Test

wurde im Verhältnis zu seiner durchschnittlichen Leistung zu einem früheren Zeitpunkt berechnet. Die Leistungen in den Tests RotaRod und Griffkraft über 75% einer früheren Messung wurden mit 1 bewertet, über 81% mit 2, über 93% wurden mit 3 und alle anderen mit 0 bewertet. Die Zeit, die eine Maus für den Abstieg im Pole-Test benötigt, nimmt bei Erkrankung zu. Daher sind spätere Zeitwerte meist größer als frühere, wenn die Tiere noch gesund sind. Später gemessene Zeiten im Pole-Test, die über 160% relativ zu einer früheren Messung lagen, wurden mit 0, solche zwischen 130-160 % mit 1, solche zwischen 110-130% mit 2, und solche unter 110% mit 3 bewertet. Die abschließende kumulative Leistungsbewertung (0-9) wurde durch die Zusammenfassung der Leistungswerte in den Tests RotaRod (0-3), Griffkraft (0-3) und Pole-Test (0-3) zusammengefasst. Die Signifikanz der Leistung von geimpften und ungeimpften Tieren wurde mit einem ungepaarten t-Test mit Welch-Korrektur für nichtparametrische Daten bestimmt.

2.2.6.1. Griffkraft-Test

Für die Griffkraft-Messung wurde das Griffkraftmessgerät (Ugo Basile) verwendet. Hierbei wurden eine Maus auf ein Gitter gesetzt, welches mit dem Griffkraftmessgerät verbunden war. An diesem Gitter hielt sich die Maus mit allen vier Pfoten fest. Dann wurde die Maus am Schwanz zurückgezogen, bis sie das Gitter losließ. Die Griffkraft jeder Maus wurde insgesamt drei Mal im Abstand von 5 min gemessen. Dann wurde der Durchschnitt der drei Messungen als Ergebnis für den jeweiligen Tag für diese Maus errechnet.

2.2.6.2. Pole-Test

Um die Motorik und das Gleichgewicht zu testen, wurde der Pole-Test verwendet. Die Tiere wurden mit dem Gesicht vom Boden weg an eine 75 cm hohe Stange platziert. Die Stange hatte einen Durchmesser von 9 mm und war mit Klebeband umwickelt. Sobald sich die Tiere umdrehten und nach unten blickten, wurde die Zeit gemessen, in der sie sich abwärts bewegten. Jede Maus wurde dreimal getestet. Der Versuch wurde abgebrochen, wenn ein Tier länger als 60 s brauchte. Zusätzlich wurden auch 60 s angesetzt, wenn die Maus die Stange heruntergerutscht ist. Der Mittelwert der drei Versuche zählte als Leistung eines Tieres an diesem Tag.

2.2.6.3. RotaRod-Test

Die Motorik und Koordination der Mäuse wurden mit dem RotaRod-Test evaluiert. Hier wurden die Mäuse in Gruppen von maximal fünf Tieren auf einem RotaRod-Gerät (Ugo Basile) platziert. Die Gruppen waren nach Geschlechtern getrennt. Das Gerät

beschleunigte die Rotation des Stabs über 300 s von 4 bis auf 40 Umdrehungen pro Minute. Die Zeit, wie lange ein Tier auf dem RotaRod laufen konnte, wurde notiert. Es gab pro Tier vier Läufe, wovon der erste immer ein Trainingslauf war und nur die späteren drei Läufe als Leistung an diesem Tag gezählt wurden. Zwischen jedem Lauf hatten die Mäuse 10 min Zeit zur Regeneration.

2.2.7. Gewebepräparation

Ein Teil der Mäuse wurde durch intrakardiale Perfusion mit PBS und 4% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung getötet. Diese Gehirne wurden nach der Perfusion über Nacht in 4% PFA-Lösung fixiert und danach wurde die Lösung durch 1% PFA-Lösung ersetzt.

Für das Einbetten des Gewebes, wurden die Gehirne zunächst für 30 min (3 x 10 min) mit PBS gespült. Danach folgte eine Alkoholreihe mit den Prozentsätzen 70%, 85% und 95%. In jeder dieser Alkohollösungen werden die Gehirne unter Rühren eine Stunde bei RT inkubiert. Danach folgen drei Schritte mit 100% Ethanol für jeweils eine Stunde. Danach wurde das Gewebe 2 x 30 min in 100% ROTI-Histol (Carl Roth) inkubiert. Dann folgte ein weiterer ROTI-Histol Schritt über Nacht. Am nächsten Tag wurde das Gewebe und frisches ROTI-Histol auf 56 °C erwärmt und dann 1:1 mit 56 °C warmem Paraffin versetzt. Dies wurde unter Rühren eine Stunde inkubiert. Danach wurde das Gewebe in frisches Paraffin transferiert und eine weitere Stunde inkubiert. Dieser Schritt wurde dann noch zweimal wiederholt. Danach wurde jedes Gehirn koronal halbiert und mit einer Einbettmaschine (Zhejiang Jinhua Kedee Instrumental Equipment Co. Ltd) eingebettet. Die Gewebeschnitte wurden an einem Mikrotom (Microm) mit 8 µm Dicke geschnitten. Diese wurden dann über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und dann bei 4 °C gelagert.

2.2.8. Histologische Untersuchungen der Gewebe

2.2.8.1. Nachweis der Pathologie durch DAB-Färbung

Um die α -Syn Pathologie zu untersuchen, wurden die Schnitte zuerst 10 min bei 60°C inkubiert. Danach folgte eine absteigende Alkoholreihe um das Gewebe zu rehydrieren. Hier gab es 3 x 5 min Bäder in ROTH-Histol. Darauf folgte die Alkoholreihe mit den Prozentsätzen 100 %, 90 %, 70 % und 50 %. In diesen Lösungen wurden die Schnitte auch jeweils für 5 min inkubiert. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation in ddH₂O. Danach wurden die Schnitte für 10 min in Citratpuffer inkubiert und für 10 min aufgeköcht. Darauf folgte ein Waschschrift mit PBS. Um endogene Peroxidasen zu deaktivieren, wurden die Schnitte für 30 min in 5 % H₂O₂ in Methanol inkubiert. Darauf folgte ein

weiterer Waschschrift mit PBS. Die Schnitte wurden dann mit Blocking-Puffer für 1 h geblockt. Danach wurde der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung im Primärantikörperpuffer auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte einmal 5 min mit Waschpuffer und 2 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde das MOM-Kit (Vectalabs) für eine Stunde angewandt und dieselben Waschschriffe wie zuvor durchgeführt. Danach wurden die Schnitte mit DAB (3-3'-diaminobenzidin) für 40 s gefärbt. Diese Reaktion wurde dann mit 3 % H₂O₂ gestoppt. Danach wurden die Schnitte 3 x 10 min mit ddH₂O gewaschen und mit Hämalaun (Carl Roth) gefärbt. Zuletzt wurden die Schnitte noch für 15 min mit Leitungswasser gewaschen und mit Aqua-Poly/Mount (Polysciences) eingedeckt. Danach wurden Bilder an einem Leica DM 6000 B und der Leica Application Suite 4.0 (Leica) aufgenommen.

2.2.8.2. Doppelfärbungen durch Immunfluoreszenz

Bei der Immunfluoreszenzfärbung wurde zunächst wie bei der DAB-Färbung vorgegangen. Die Schnitte wurden auf die gleiche Weise entparaffiniert und rehydriert. Auch das Vorgehen beim Aufkochen mit Citratpuffer war gleich. Danach wurden die Schnitte allerdings 1,5 h in Kupfersulfatlösung inkubiert, um die Autofluoreszenz zu reduzieren. Danach folgte ein Waschschrift mit PBS und das Blocken mit dem Blocking Puffer für eine Stunde. Danach wurden die Primärantikörper wieder im Primärantikörperpuffer auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 1 x 5 min mit Waschpuffer und 2 x 5 min mit 1x PBS gewaschen und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern im Sekundärantikörperpuffer für eine Stunde inkubiert. Danach folgten die vorherigen Waschschriffe erneut. Dann wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) in PBS für 5 min eingefärbt, die Schnitte zuletzt mit ddH₂O gewaschen und mit Fluoromount (Sigma) eingedeckt. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder wurde am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss) durchgeführt.

2.2.9. Biochemische Untersuchungen der Gewebe

Mäuse, die nicht zur histologischen Untersuchung verwendet wurden, wurden mit zervikaler Dislokation getötet und deren Gehirne nach Entnahme schockgefroren.

2.2.9.1. Homogenisierung

Das Gewebe wurde auf Eis aufgetaut und gewogen. Die Gehirne wurden in Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freiem Homogenisierungspuffer mit zwei 30-s-Zyklen in einem Precellys 24-Dual-Homogenisator (Peqlab) homogenisiert. Die Proben wurden entsprechend verdünnt, um eine Endkonzentration von 20 % (w/v) zu erreichen. Größere Gewebeteilchen wurden durch einen Zentrifugationsschritt bei $1000 \times g$ für 5 min bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ entfernt und die Gesamtproteinkonzentration wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

2.2.9.2. Sarkosylpräzipitation der α -Syn-Aggregate

Um die α -Syn-Aggregate aus den Homogenaten aufzureinigen, wurden sie mit Sarkosyl präzipitiert. Hierfür wurden nun 1 mg Gesamtprotein aus den Homogenaten genommen und mit 5 M NaCl versetzt, sodass die Probe 750 mM NaCl enthielt. Diese Probe wurde dann mit 20 % Sarkosyllösung versetzt, sodass die Probe am Ende 10 % Sarkosyl enthält. Diese Probe wurde dann gemixt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe vorsichtig auf eine 30 % Sukroselösung in einem Zentrifugenröhrchen gegeben und mit dem TLA-110 Rotor (Beckman-Coulter) bei $465.000 \times g$ bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ für 1 Stunde zentrifugiert worden. Das Pellet wurde dann später in TD4215-Puffer resuspendiert und bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.2.9.3. Western Blot

Für den Western Blot wurden die Proben aufgetaut, aufgeköcht und auf Novex NuPAGE Bis-Tris Mini Gele (Invitrogen) geladen. Der Lauf wurde mit 80 V für 30 min gestartet und später mit 120 V 1,5 h weitergeführt.

Danach wurden die Proben für 1 h 15 min mit einem Semi-Dry-Blot-Gerät auf eine Polyvinylidendifluoridmembran transferiert, welche dann 3 x 5 min mit 0,05 % TBS-T gewaschen, 30 min mit 0,4 % PFA fixiert und erneut mit TBS-T gewaschen wurde. Die Membran wurde dann mit 5 % Milchpulver in 0,05 % TBS-T für 1 h geblockt und danach wurde in 5 % Milchpulver in 0,05 % TBS-T der Primärantikörper (Ep1536Y) über Nacht bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x 15 min mit 0,05 % TBS-T gewaschen und mit dem HRP-Sekundärantikörper (1:10.000) in 5 % Milchpulver in 0,05 % TBS-T für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran wie vorher gewaschen und mit dem Super Signal ECL West Dura (Thermo Scientific) und einem Chemilumineszenz-Lesegerät (Gel Doc XR+ Imaging System, Bio-Rad) entwickelt.

2.2.10. Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (engl.: *Enzyme-linked Immunosorbent, ELISA*)

2.2.10.1. Indirekter ELISA

Die bindende 96-Kavitäten-Platte (Corning, Katalognummer 9018) wurde mit den verschiedenen Vakzine-Fibrillen oder auch mit α -Syn-Fibrillen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) über Nacht bei 4 °C bei leichter Bewegung beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte weiterhin unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Platte 2 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend für 1,5 h bei leichter Bewegung mit 5 % Milch in 1 x PBS geblockt. Daraufhin wurde die Platte dann 5 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen und mit verschiedenen Verdünnungen der Plasmen über Nacht bei 4 °C und leichter Bewegung inkubiert. Bei den Testungen, wo die Plasmen einer Maus von fünf verschiedenen Zeitpunkten untersucht wurden, wurde eine Verdünnung von 1:330.000 in PBS verwendet. Um Präimmunseren mit Plasmen, die 14 Tage nach dem dritten Booster von neun Mäusen entnommen wurden, zu vergleichen, wurden die Präimmunseren 1:10.000 und die nach dem letzten Booster entnommenen Seren 1:330.000 in PBS verdünnt. Am folgenden Tag wurde die Platte erneut für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert und wieder 5 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde die Platte mit dem einem Anti-Maus-Antikörper, welcher Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden hatte, in 1:5000 Verdünnung in PBS für 2 h bei leichter Bewegung inkubiert. Zuletzt wurden die vorherigen Waschschrte wiederholt und die Platte mit dem Pierce TMB Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific) inkubiert. Nach 50 min wurde die Farbreaktion mit 2 M Schwefelsäure gestoppt und anschließend die Absorption bei 450 nm mit einem CLARIOstar Mikroplattenlesegerät (BMG Labtech) gemessen.

2.2.10.2. Kompetetiver ELISA

Der kompetetive ELISA wurde durchgeführt, um zu testen, ob die in den Plasmen enthaltenen Antikörper auch pathologisches α -Syn in Hirnhomogenaten von Patienten mit Synucleinopathien erkennen. Wenn Plasmen Antikörper enthalten, die pathologisches α -Syn erkennen und mit Patientenhirnhomogenaten inkubiert werden, binden die Antikörper an die α -Syn-Fibrillen in den Homogenaten und binden deswegen weniger an die Vakzine-Fibrillen in den Platten binden (Abb. 7). Zuletzt wird dann das Verhältnis mit den gesunden Kontrollhirnhomogenaten verglichen.

Hierfür wurde eine bindende 96-Kavitäten-Platte (Corning, Katalognummer 9018) mit jeweils den einzelnen Vakzinkandidaten (5 µg/mL) bei leichter Bewegung erst eine Stunde bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4 °C inkubiert. Zur selben Zeit wurde in einer nicht-bindenden 96-Kavitäten-Platte 5 µg Hirnhomogenat von Patienten mit Mausserum in einer Konzentration 1:330.000 gemischt und erst 1 h bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden beide Platten erst für 1 h bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Dann wurden die Vakzinkandidaten aus den bindenden Platten entfernt und mit 3 % BSA für 90 min geblockt. Danach wurde 2 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde die Mischungen aus Plasma und Homogenat auf die Platten gegeben und erst 1 h bei Raumtemperatur und danach über Nacht bei 4 °C und leichter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte wie am Tag zuvor für 1 h bei Raumtemperatur und leichter Bewegung inkubiert. Die Mischungen aus Plasmen und Homogenaten wurde entfernt und die Platte 2 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Platten mit 100 µL/Kavität eines an Meerrettichperoxidase gebundenen Anti-Maus-Sekundärantikörpers in einer Verdünnung von 1:5000 in 3 % BSA für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten 4 x 5 min mit 0,1 % PBS-T und 1 x 5 min mit PBS gewaschen und mit 100 µL TMB-Substrat pro Kavität inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach 30 min mit 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einem CLARIOstar-Mikroplattenlesegerät gemessen.

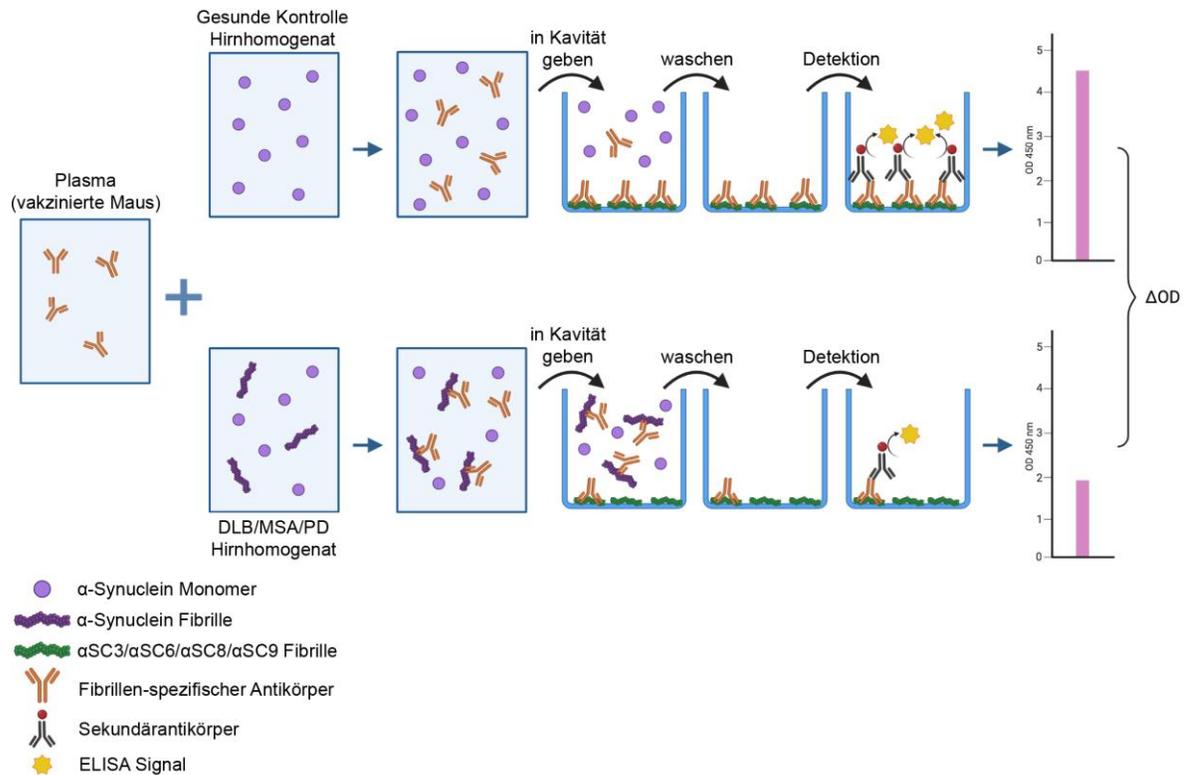


Abbildung 7: Prinzip kompetitiver ELISA. Die Abbildung zeigt das Prinzip des kompetitiven ELISAs. Die Plasmen wurden zunächst mit den Hirnhomogenaten inkubiert. Wenn in den Homogenaten keine pathologischen α Syn-Fibrillen vorhanden waren, wurden die Antikörper in den Plasmen nicht blockiert, konnten somit an die Vakzinofibrillen auf der Platte binden und somit konnte ein höheres Signal nachgewiesen werden. Wenn in den Hirnhomogenaten allerdings schon pathologische Fibrillen vorhanden waren, wurden die Antikörper in den Seren bereits blockiert, konnten nicht mehr an die Vakzinofibrillen binden und daher entstand ein geringeres Signal.

3. Ergebnisse

3.1. Vakzinierter Mäuse behalten länger ihre kognitiven Fähigkeiten und verlieren erst später Gewicht

Um früh zu erkennen, ob die TgM83^{+/-}-Mäuse erkranken, wurde dauerhaft das Gewicht der Versuchstiere kontrolliert. Des Weiteren wurden mit den Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten Verhaltensversuche durchgeführt.

Sowohl die vakzinieren als auch die nicht-vakzinieren Tiere haben zunächst nach den Injektionen mit α -Syn Fibrillen stetig bis zu einem Höchstgewicht zugenommen. Danach haben die Tiere Gewicht verloren und sichtbare neurologische Symptome entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass für alle drei Injektionsrouten, die immunisierten Tiere länger zugenommen haben als die nicht-immunisierten Tiere (Abb. 8A). Bei den intrazerebral injizierten Tieren haben zwei Monate danach noch alle Injizierten Tiere zugenommen. Dieser Wert sank nach drei Monaten auf 89,5 % bei den vakzinieren Mäusen und auf 81,8 % bei den nicht-vakzinieren Mäusen. Vier Monate nach der Injektion sanken diese Werte auf 45,5 % bei den vakzinieren Tieren und auf 36,8 % bei den nicht-vakzinieren Tieren.

Bei den intraperitoneal und intragastrisch injizierten TgM83^{+/-}-Mäuse nahmen alle Versuchstiere 5 Monate nach der Injektion noch an Gewicht zu. Bei der IP-injizierten Gruppe sank dieser Wert nach 7 Monaten bei den vakzinieren Tieren auf 90,9 % und bei nicht-vakzinieren Tieren auf 57,9 %. Nach 9 Monaten verringerte sich dieser Wert weiter auf 54,5 % bei den vakzinieren und auf 21,1 % bei den nicht-vakzinieren Tieren. Bei den IG-injizierten Mäusen gab es eine ähnliche Entwicklung. Hier nahmen nach 7 Monaten noch 100 % der vakzinieren Mäuse an Gewicht zu und nur 89,5 % der nicht-vakzinieren Mäuse. Nach 9 Monaten nahmen hier noch 80,0 % der vakzinieren Tiere und 31,6 % der nicht-vakzinieren Mäuse zu. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die Vakzinierung vor einem frühen Gewichtsverlust, was ein Zeichen der einsetzenden Krankheit ist, schützt.

Zur Untersuchung der motorischen Funktionen aller injizierten TgM83^{+/-}-Mäuse, wurden zu bestimmten Zeitpunkten der RotaRod-Test, Pole-Test und Griffkraft-Test durchgeführt und aus den Ergebnissen ein kumulativer Leistungswert der motorischen Funktion errechnet (Abb. 8B). Die Leistung der vakzinieren Tiere aus der IZ-Gruppe war höher ($2,09 \pm 2,12$) als die der nicht-vakzinieren Tieren ($1,37 \pm 1,98$). Dieses Ergebnis war allerdings nicht signifikant, da nach 5 Monaten, dem zweiten Zeitpunkt der Verhaltensversuche, bei den

intrazerebral injizierten Tieren schon zu viele Mäuse in beiden Kohorten krank waren. Bei intraperitoneal injizierten Tieren zeigten die vakzinierten Tiere 7 Monate nach Injektion von α -Syn-Fibrillen eine signifikant höhere ($P < 0,05$) kumulative Leistung ($6,45 \pm 2,50$) als nicht-vakzinierte Mäuse ($4,40 \pm 3,35$). Wie auch beim Gewicht zeigen sich bei den intragastrisch injizierten Mäusen ähnliche Tendenzen. In dieser Gruppe war die kumulative Leistung der vakzinierten Tiere ($7,70 \pm 1,25$) 7 Monate nach der Injektion von α -Syn-Fibrillen ebenfalls signifikant höher ($P < 0,001$) als die der nicht-vakzinierten Tiere ($4,74 \pm 3,11$). Alles in allem lässt sich sagen, dass die vakzinierten Tiere über längere Zeiträume nach der Injektion von α -Syn Fibrillen eine bessere Leistung zeigen und somit auch gesünder sind.

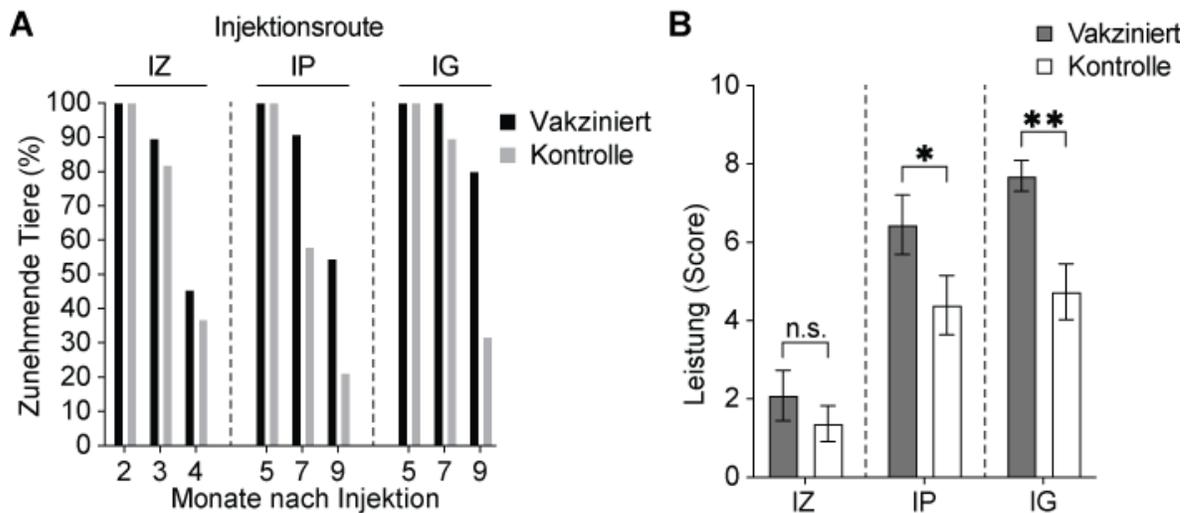


Abbildung 8 Vakzinierte TgM83^{+/-}-Mäuse nehmen länger an Gewicht zu und zeigen länger eine gute Leistung. (A) Alle Mäuse haben nach Injektion mit α -Syn-Fibrillen zunächst zugenommen. Die vakzinierten Mäuse nahmen bei allen Injektionsrouten länger zu als die nicht-vakzinierten Mäuse. Für die Tiere mit intrazerebraler (IZ) Injektion von α -Syn Fibrillen wurden die Daten für 2 – 4 Monate nach der Injektion dargestellt. Für die Tiere mit intragastrischer (IG) und intraperitonealen (IP) Injektion wurden die Monate 5, 7 und 9 nach Injektion dargestellt. (B) Die Leistung aller Tiere wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch den RotaRod-Test, Pole-Test und Griffkraft-Test untersucht. Die kumulative Leistung der vakzinierten Tiere in der IZ-Gruppe war 5 Monate nach der α -Syn Injektion höher als bei den nicht-vakzinierten Tieren. Allerdings sind diese Ergebnisse nicht signifikant. Sowohl bei der IG-Gruppe als auch bei der IP-Gruppe war die kumulative Leistung nach 7 Monaten bei den vakzinierten Tieren signifikant höher als bei den nicht-vakzinierten Tieren. Die Balken stellen den Mittelwert \pm SEM dar. Welch's t test. * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

3.2. Vakzinierte Mäuse leben länger

Ein weiterer Anhaltspunkt zur Wirksamkeit des Impfstoffs ist die Überlebensdauer der TgM83^{+/-}-Mäuse nach Injektion der α -Syn Fibrillen. Dies konnte zum einen bei dem Modell

zur „Brain-first“-Hypothese durch die intrazerebrale Injektion gezeigt werden. Zusätzlich konnte es aber auch durch die zwei Wege der intraperitonealen und der intragastrischen Injektion für die „Body-first“-Hypothese gezeigt werden.

Bei den TgM83^{+/-}-Mäuse, welche die α -Syn Fibrillen durch eine intrazerebrale Injektion erhalten haben (Abb. 9A), zeigten die vakzinierten Tiere mit 166 Tagen (n = 11) eine signifikant (P < 0,05) verlängerte Lebensspanne als die nicht-vakzinierten Tiere mit durchschnittlich 158 Tagen (n = 20), was einer Verlängerung der Lebensdauer von 5 % entspricht. Bei den Tieren, die intraperitoneal mit α -Syn Fibrillen injiziert wurden (Abb. 9B), war die Überlebensdauer bei den vakzinierten TgM83^{+/-}-Mäusen mit durchschnittlich 271 Tagen (n = 11) signifikant (P < 0,01) länger als bei den nicht-vakzinierten Tieren mit durchschnittlich 223 Tagen (n = 19). Dies ergibt eine Verlängerung der Lebensspanne von 22 % bei den vakzinierten Tieren im Vergleich zu den nicht-vakzinierten Tieren. Mäuse, die intragastrisch mit α -Syn Fibrillen injiziert wurden (Abb. 9C), zeigten ein ähnliches Verhalten wie die intraperitoneal injizierten Tiere. Hier hatten die vakzinierten Tiere (n = 10) mit einer durchschnittlichen Lebenszeit von 280 Tagen eine signifikant (P < 0,05) längere Lebensspanne als die nicht-vakzinierten Tieren (n = 20) mit durchschnittlich 231 Tagen. Dies entspricht einer Verlängerung der Lebenszeit von 20 % durch die Impfung.

Es ist zu bemerken, dass die intrazerebral injizierten Mäuse generell früher erkrankten als die intraperitoneal und die intragastrisch injizierten Tiere, da in diesem Fall die injizierten α -Syn Fibrillen sich bereits im Gehirn befinden und sich dadurch viel früher neurologische Störungen entwickeln, weswegen die Lebensspanne kürzer ist. Alles in allem zeigte die Impfung bei der Modellierung der „Body-first“ Hypothese eine bessere Wirkung als bei der Modellierung der „Brain-first“ Hypothese.

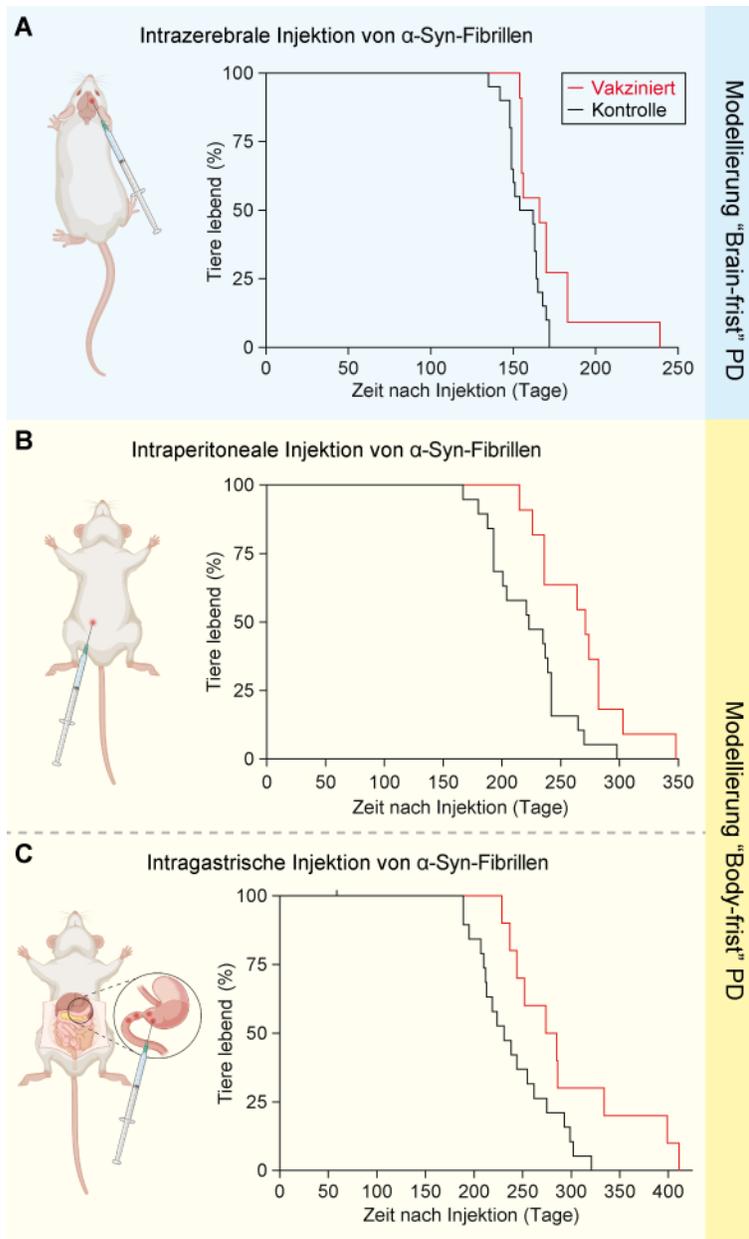


Abbildung 9: Vakziniertere Mäuse überleben länger als nicht-vakziniertere Mäuse. (A) Bei den TgM83^{+/-}-Mäusen mit intrazerebraler α -Syn-Fibrillen-Injektion zur Modellierung der „Brain-first“-Hypothese haben die vakziniertere Tiere mit durchschnittlich 166 Tagen (n = 11) signifikant (P < 0,05) länger überlebt als die nicht-vakziniertere Tiere mit durchschnittlich 158 Tagen (n = 20). (B und C) Es wurde die „Body-first“-Hypothese modelliert, indem TgM83^{+/-}-Mäuse mit α -Syn Fibrillen intraperitoneal oder intragastrisch injiziert wurden. (B) Die Überlebensdauer bei den vakziniertere TgM83^{+/-}-Mäusen, die intraperitoneal mit α -Syn Fibrillen injiziert wurden, war mit durchschnittlich 271 Tagen (n = 11) signifikant (P < 0,01) länger als bei den nicht-vakziniertere Tieren mit durchschnittlich 223 Tagen (n = 19). (C) Bei den intragastrisch injizierten Mäusen hat das Vakzin die Lebensspanne von durchschnittlich 231 Tagen bei nicht-vakziniertere Tieren (n = 20) signifikant (P < 0,05) auf durchschnittlich 280 Tage bei vakziniertere Tieren (n = 10) verlängert. Das Überleben wurde anhand von Kaplan-Meier-Kurven und dem Log-Rank-Test (Mantel-Cox) analysiert.

3.4. Die Vakzinierung induziert Antikörper gegen die Vakzine und auch gegen α -Syn-Fibrillen

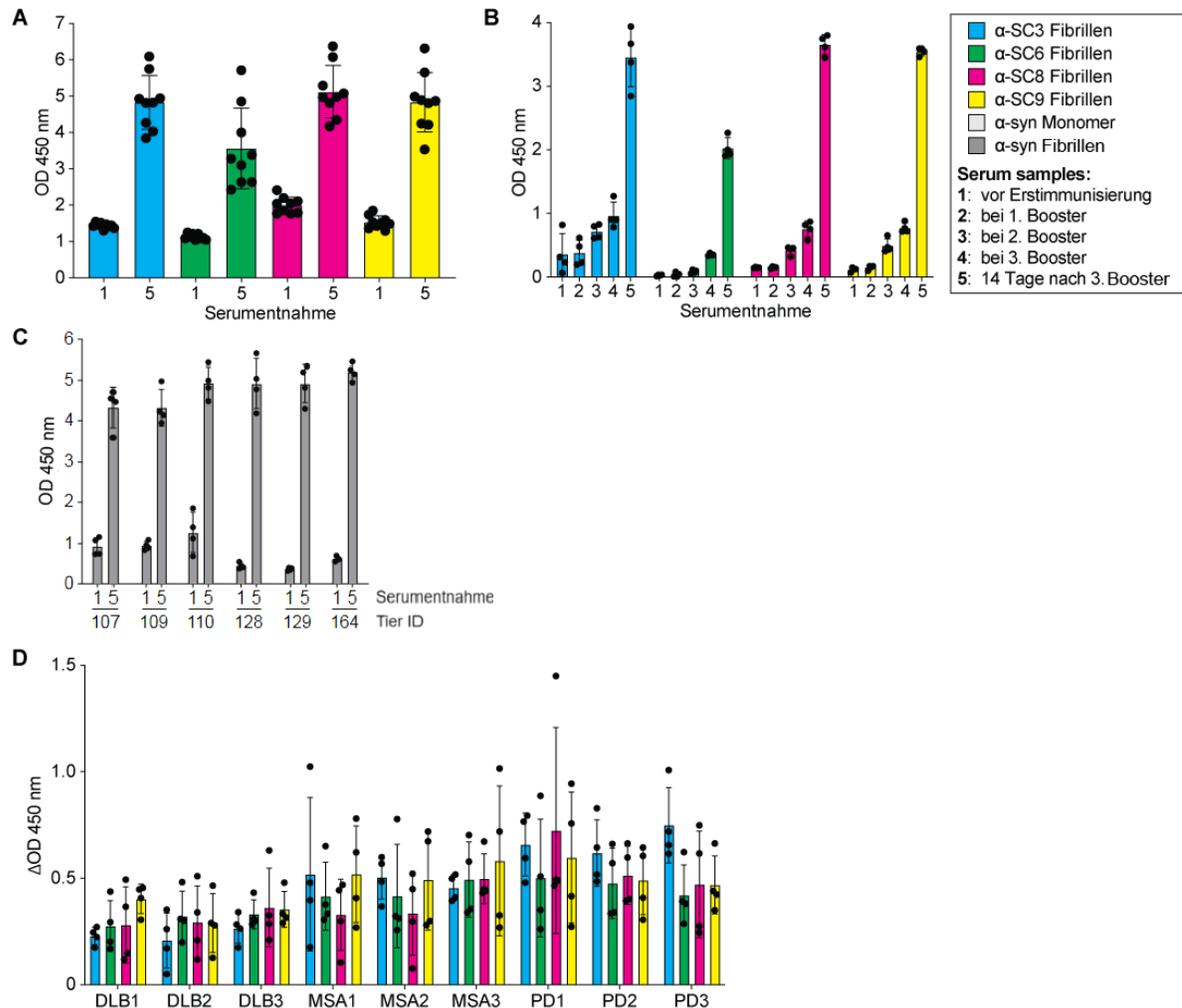
Ein weiterer wichtiger Punkt zur Beurteilung der Vakzine ist die Immunität, die durch den Impfstoff in Form von Antikörpern gegen α -Syn-Aggregate erreicht wird. Zu diesem Zweck wurden indirekte ELISAs und kompetitive ELISAs durchgeführt.

Der indirekte ELISA zeigt, dass die Vakzinierungen eine robuste Immunität in den Mäusen gegen die einzelnen im Impfstoff enthaltenen Impfstoffkandidaten induziert (Abb. 10A). Dieser Effekt wird besonders deutlich, wenn man die Plasmen vom Zeitpunkt der Blutentnahmen (vor der Erstimmunisierung, zum Zeitpunkt der Booster und 14 Tage nach dem 3. Booster) untersucht (Abb. 10B). Nach jeder Impfung bzw. Booster-Impfung stieg der Antikörpertiter stetig an. Dies lässt erkennen, dass das Vakzin generell eine Immunantwort auslöst.

Zusätzlich war es wichtig herauszufinden, ob die gebildeten Antikörper auch α -Syn-Aggregate erkennen. Hierfür wurde ein indirekter ELISA durchgeführt, wo die Plasmen gegen α -Syn-Fibrillen getestet wurden (Abb. 10C). Hier ließ sich deutlich erkennen, dass die Plasmen der vakzinieren Tiere die Fibrillen erkennen.

Letztendlich wurden die Plasmen auch noch mit einem kompetitiven ELISA gegen Hirnhomogenate von Patienten verschiedener Synucleinopathien getestet und mit gesunden Kontrollproben verglichen (Abb. 10D). Hier ließ sich erkennen, dass die getesteten Plasmen die Patientenproben besser als die der gesunden Kontrollen erkennen.

Aus den ELISA-Ergebnissen lässt sich folgern, dass die TgM83^{+/-}-Mäuse eine robuste Immunantwort gegen die einzelnen Vakzinkandidaten entwickelt haben. Schlussendlich lässt sich vermuten, dass der Impfstoff eine gewisse Wirksamkeit im Menschen haben könnte, da die Plasmen humanes pathologisches α -Syn in den Patientenproben erkennen.



Zusätzlich sollte getestet werden ob die Plasmen der TgM83^{+/-}-Mäuse α -Syn in Gewebeschnitten von erkrankten Mäusen erkennen. Hierfür wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Syn und mit den entnommenen Plasmen angefertigt. Bei diesen Färbungen ließ sich erkennen, dass es in Hirnstammschnitten von erkrankten TgM83^{+/-}-Mäusen eine Kollokalisierung des Signals von phosphoryliertem α -Syn und den Plasmen gab (Abb. 11A). Die gesunden TgM83^{+/-}-Mäuse

zeigte keine Färbung für phosphoryliertes α -Syn. Es zeigt allerdings trotzdem ein leichtes Signal durch das Plasma.

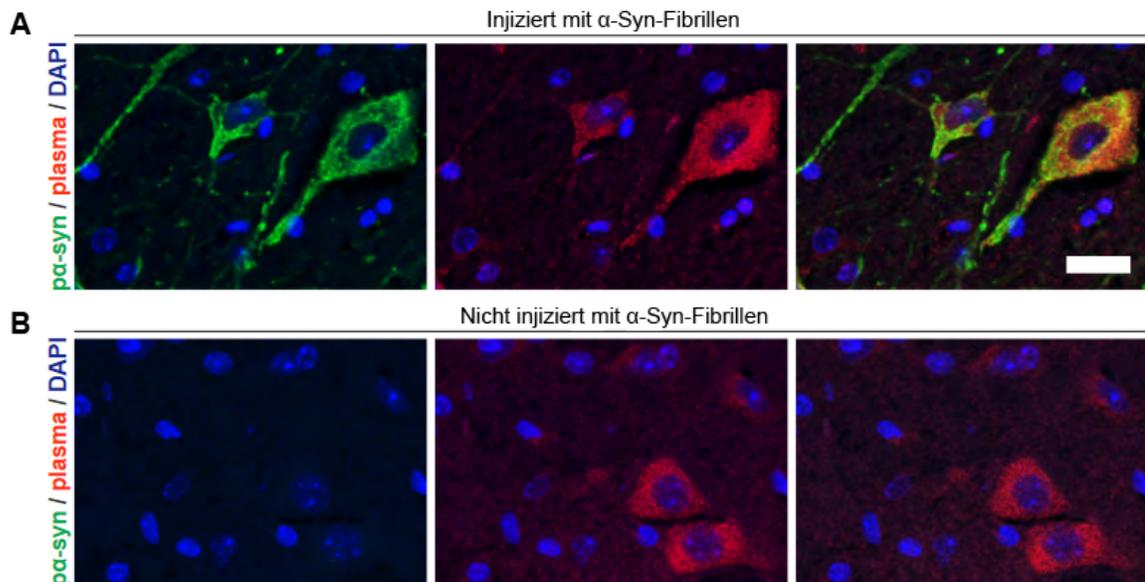


Abbildung 11: Plasmen von vakzinierten Mäusen erkennen α -Syn in erkrankten Mäusen. (A) Immunfluoreszenzfärbungen von Hirnstammschnitten erkrankter TgM83^{+/-}-Mäuse zeigen eine starke Ablagerung von pathologischem α -Syn (grün). Zusätzlich zeigt sich auf dem vereinten Bild eine Überlagerung der Plasmen von vakzinierten Mäusen (rot) und dem pathologischen α -Syn (grün). **(B)** Das gesunde Kontrolltier zeigt keine pathologische α -Syn-Färbung (grün). Eine leichte Färbung durch α -Syn-Monomere (rot) lässt sich erkennen. In **(A)** und **(B)** wurden die Zellkerne mit DAPI angefärbt und der Maßstabsbalken entspricht 20 μ m.

3.3. Pathologie, Astrogliose und Mikrogliose sind in vakzinierten und nicht-vakzinierten Tieren vorhanden

Um die Wirkung des Impfstoffs zu analysieren, stellte sich weiterhin die Frage, ob die Pathologie durch die Vakzinierung beeinflusst wurde. Hierfür wurden immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Außerdem wurden Hirnhomogenate der erkrankten TgM83^{+/-} mit Western-Blot-Analyse untersucht.

Immunhistochemische Färbungen von histologischen Schnitten im Bereich des Stammhirns zeigen, dass pathologische α -Syn-Ablagerungen mit phosphoryliertem Serin129 sowohl in den vakzinierten als auch bei den nicht-vakzinierten Tieren auftreten (Abb. 12A). Ein Unterschied in der Menge und Ausprägung zwischen vakziniert und nicht-vakziniert ist nicht zu erkennen. Die Pathologie ist auch bei den Injektionsrouten gleich. Mit zunehmender Erkrankung der Tiere tritt außerdem auch eine starke Mikrogliose und Astrogliose auf. Es lässt sich erkennen, dass sich die aktivierten Mikroglia um pathologische α -Syn-Ablagerungen herumlegen. Die Negativkontrolle von nicht-injizierten

TgM83^{+/-}-Mäusen zeigt keine α -Syn-Pathologie. Hier sind auch nur ramifizierte, inaktive Mikroglia vorhanden (Abb. 12B). Zusätzlich ist bei den erkrankten Tieren eine starke Astrogliose zu erkennen. Hier bilden die Astrozyten ein dichtes Netz um die Neurone, welche pathologisches α -Syn enthalten. Auch hier zeigte die Negativkontrolle keine α -Syn-Pathologie und auch keine pathologische Anreicherung von Astrozyten (Abb. 12C). Auch zeigte die Western-Blot-Analyse keinen Unterschied zwischen nicht-vakzinierten (Abb. 12D) und vakzinierten Tieren (Abb. 12E). In beiden Fällen sind mehrere Spezies von pathologischem α -Syn mit phosphoryliertem Serin129 zu erkennen. Das sind zum einen phosphorylierte Monomere, Oligomere und Aggregate mit höheren Molekulargewichten. Dies zeigt, dass eine Aggregation und auch die Ausbreitung des pathologischen α -Syn durch die Impfung nicht komplett verhindert werden konnte, da diese Oligomere und Aggregate auch bei den vakzinierten Tieren vorhanden sind.

Generell lässt sich sagen, dass sich die Erkrankung der Mäuse durch die Impfung zwar hinausschieben lässt und somit eine längere Lebensspanne erreicht wird. Allerdings zeigt sich auch, dass nach einer gewissen Zeit die Mäuse trotzdem erkranken und dann das gleiche pathologische Bild zeigen wie die nicht-vakzinierten Tiere.

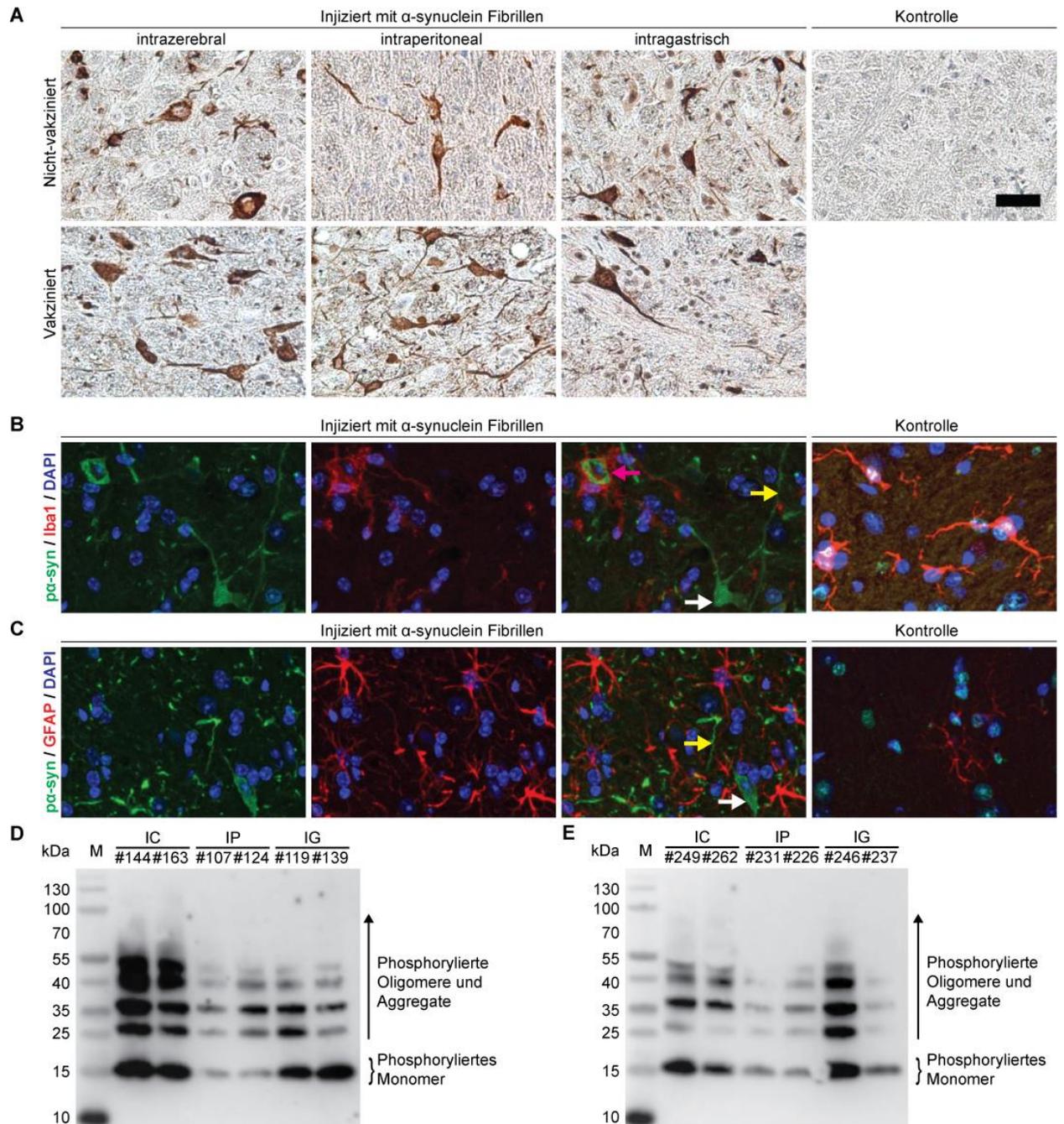


Abbildung 12: Die α -Syn-Pathologie zeigt sich sowohl bei nicht-vakzinierten als auch bei vakzinierten Tieren. (A) Histologische Schnitte aus dem Stammhirn erkrankter TgM83^{+/-}-Mäuse zeigen Ablagerungen von pathologischem α -Syn mit phosphoryliertem Serin129. Dies trifft auf vakzinierte und nicht-vakzinierte Tiere gleichermaßen zu. Die Negativkontrolle (nicht-injizierte TgM83^{+/-}-Maus im gleichen Alter) zeigt keine pathologischen Ablagerungen. Der Maßstabsbalken gilt für alle sieben Bilder und entspricht 50 μ m. (B) Immunfluoreszenzfärbungen von Stammhirnschnitten mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Serin129 von α -Syn zeigen Ablagerungen von pathologischem α -Syn (grün) und mit Antikörpern gegen das ionisierte, kalziumbindenden Adaptormolekül 1 (Iba1, rot) aktivierte Mikroglia bei den erkrankten Tieren. Es lassen sich pathologische α -Syn-Einschlüsse sowohl im neuronalen Zellkörper (weißer Pfeil) als auch in den Dendriten (gelber Pfeil) erkennen, welche von aktivierten, amöboiden Mikroglia

eingeschlossen sind (magentafarbener Pfeil). Die Färbungen der Negativkontrolle zeigen dagegen nur inaktive Mikroglia und kein pathologisches α -Syn. Die Zellkerne wurden mit DAPI in blau angefärbt. **(C)** Immunfluoreszenzfärbungen von Stammhirnschnitten bei erkrankten TgM83^{+/-}-Mäuse von pathologischem α -Syn mit phosphoryliertem Serin129 (grün) und saurem Gliafaserprotein (GFAP, rot) bei erkrankten Tieren. Es sind auch wieder pathologische α -Syn Einschlüsse sowohl im neuronalen Zellkörper (weißer Pfeil) als auch in den Dendriten (gelber Pfeil) zu erkennen. Die Kontrollfärbung zeigt keine Pathologie und nur vereinzelte Astrozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI in blau angefärbt. **(D und E)** In einer Western-Blot-Analyse zeigen sich verschiedene pathologische α -Syn-Spezies, die von Monomeren bis hin zu Oligomeren größeren Aggregaten mit verschiedenem Molekulargewicht reicht. Bei allen ist das Serin129 phosphoryliert. Dies zeigt sich sowohl bei den nicht-vakzinierten Tieren **(D)** als auch bei den vakzinierten Tieren **(E)**. Das Molekulargewicht ist in kDa angegeben.

4. Diskussion

Die kombinierten Impfstoffkandidaten zeigten in dem TgM83^{+/-}-Mausmodell eine gute Wirkung. Anders als die ersten entwickelten Impfstoffkandidaten (Masliah et al. 2005) wurde nicht das α -Syn in voller Länge als Impfstoff eingesetzt, sondern nur kleine Epitope, ähnlich wie bei anderen späteren Impfstoffen (Ghochikyan et al. 2014), wodurch die Gefahr von Autoimmunreaktionen, die sich bereits bei anderen Impfstofftests gegen neurodegenerative Erkrankungen gezeigt haben, reduziert werden soll (Orgogozo et al. 2003). Aus diesem Grund wäre der hier entwickelte Impfstoff voraussichtlich auch für den Einsatz am Menschen sicher, was in zukünftigen klinischen Studien untersucht werden muss. Ein wichtiges Merkmal der hier verwendeten Impfstoffkandidaten ist, dass sie Epitope enthalten, die sich in der NAC-Region des α -Syns befinden. Diese Region ist an der Aggregation von α -Syn beteiligt. Dadurch könnten die Antikörper die NAC-Region blockieren und so auch eine Aggregation verhindern (Chatterjee et al. 2018).

4.1. Vakzinierte Tiere verlieren erst später Gewicht, zeigen später motorische Defizite und leben länger als nicht-vakzinierte Tiere

Diese Studie zeigt klar, dass der hier entwickelte Impfstoff einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensdauer der Versuchstiere hatte. Mit 158 Tagen bei den ungeimpften intraperitoneal injizierten Tieren und 223 Tagen bei den ungeimpften intraperitoneal mit α -Syn-Fibrillen injizierten Tieren (Abb. 9A und B) ähnelt deren Lebensdauer dem von Kontrolltieren, die zuvor von der Arbeitsgruppe über die gleichen Wege mit α -Syn-Fibrillen injiziert wurden (Lohmann et al. 2019). Im Verhältnis dazu zeigten die geimpften Tiere, welche „Brain-first“-PD modellieren eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne von 5 %. Bei den Tieren, die „Body-first“-PD modellieren war die Lebensspanne sogar um 20–21% verlängert. Der Unterschied in der Prozentzahl ist vermutlich damit zu erklären, dass die Antikörper gegen α -Syn im Körper gebildet werden, aber nur wenige durch die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn übergehen können. Für Antikörper gegen β -Amyloid konnte bereits gezeigt werden, dass die Antikörper aus dem Blut in das Hirn gelangen können. Dies passiert aber nur zu einem geringen Anteil von circa 0,1 % (Banks et al. 2002; Pardridge 2007). Geimpfte Tiere, denen α -Syn-Fibrillen intraperitoneal und intragastrisch injiziert wurden, lebten deutlich länger, was darauf zurückzuführen ist, dass die gebildeten Antikörper die α -Syn-Aggregate vermutlich besser erreichen können. Das gleiche lässt sich auch an den Ergebnissen zu der Gewichtszunahme und den Verhaltenstests (Abb. 8) erkennen. Aus diesen Ergebnissen

lässt sich mutmaßen, dass der Impfstoff eine höhere Wirksamkeit bei Patienten mit „Body-first“ PD zeigen könnte, indem es die Aggregation stoppen und auch die prionartige Vermehrung der α -Syn-Oligomere schon in der Peripherie unterbinden würde (Bae et al. 2012).

4.2. Pathologie zeigt sich bei nicht-vakzinierten und vakzinierten Tieren

Die histologischen Färbungen und die Western-Blot-Untersuchungen zeigen starke α -Syn-Pathologie, Mikrogliose und Astrogliose gleichermaßen. Daraus lässt sich schließen, dass die Vakzinierungen zwar die Erkrankung der Tiere herauszögern kann, aber nicht komplett verhindert (Abb. 12). Andere Impfstoffstudien zeigen hingegen eine Verringerung sowohl der Pathologie als auch der Neuroinflammation (Nimmo et al. 2022; Mandler et al. 2014). Dies lässt sich aber auf den Umstand zurückführen, dass die Studie in dieser Arbeit eine Überlebensstudie war, um festzustellen wie viel länger die geimpften Tiere im Vergleich zu den ungeimpften Tieren überleben (Abb. 9). In den anderen Impfstoffstudien wurden allerdings die geimpften und die ungeimpften Tiere gleichzeitig nach einer bestimmten Versuchszeit getötet. Ein direkter Vergleich zwischen dieser Studie und früheren gestaltet sich schwierig, da oftmals andere Tiermodelle verwendet wurden und es sich bei diesen nicht um Überlebensstudien gehandelt hat (Mandler et al. 2015; Sanchez-Guajardo et al. 2013; Ghochikyan et al. 2014).

4.3. Der Impfstoff induziert eine robuste Immunität gegen α -Syn-Fibrillen

Die ELISAs zeigten, dass die geimpften Tiere Antikörper sowohl gegen die Vakzinkandidaten als auch gegen synthetische α -Syn-Fibrillen gebildet hatten (Abb. 10 A-C). Daraus lässt sich schließen, dass die ausgewählten Epitope der α -Syn-Fibrillen gut geeignet waren, um einen wirksamen Impfstoff zu entwickeln, obwohl sie auf synthetischen α -Syn-Fibrillen basieren (Guerrero-Ferreira et al. 2018; Tuttle et al. 2016). Diese Vermutung wird dadurch verstärkt, dass die Antikörper in den Plasmen der Mäuse nicht nur synthetische α -Syn-Fibrillen erkannten, sondern auch Hirnhomogenate von Patienten mit verschiedenen Synucleinopathien (Abb. 10D). Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit anderen Vakzinkandidaten gemacht werden, deren Epitope allerdings dem C-terminalen Bereich von α -Syn entsprachen (Mandler et al. 2015). Zusätzlich konnten auch Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die Antikörper in den Plasmen der vakzinierten Mäuse in erkrankten Tieren eine Kolokalisation mit pathologischem α -Syn zeigen (Abb. 11A). Daraus lässt sich schließen, dass die generierten Antikörper auch α -Syn im Gewebe erkennt. Es hat sich aber zusätzlich auch gezeigt, dass die Plasmen in

gesunden Tieren auch α -Syn binden (Abb. 11B), wodurch sich vermuten lässt, dass die gebildeten Antikörper auch monomerisches α -Syn erkennen können. Eine Limitierung bei den hier entwickelten Impfstoffkandidaten zeigt sich allerdings darin, dass für die Auswahl der Epitope nur synthetische α -Syn-Fibrillen genutzt wurden, da bis vor kurzem die Struktur von ex-vivo α -Syn-Fibrillen aus Patienten mit Synucleinopathien noch nicht bekannt waren. Impfstoffe, die der ex-vivo Struktur nachempfunden ist, könnten möglicherweise eine höhere Wirksamkeit zeigen.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Schlussendlich lässt sich sagen, dass der Vakzinierungsversuch mit dem quadrivalenten Impfstoff bestehend aus α -SC3, α -SC6, α -SC8 und α -SC9 eine gute Wirksamkeit in den TgM83^{+/}-Mäuse zeigen. Die geimpften Tiere haben erst später an Gewicht verloren. Die geimpften Tiere, welche „Body-first“-PD modellieren, zeigten bei den Verhaltenstests signifikant verbesserte Leistungen im Vergleich zu den ungeimpften Tieren. Bei den „Brain-first“-Tieren war ein positiver Trend zu erkennen. Die Lebensdauer von geimpften Tieren konnte sogar in allen drei Modellen signifikant verlängert werden. Des Weiteren ließ sich erkennen, dass sowohl die geimpften als auch die ungeimpften Tiere α -Syn-Pathologie in histologischen Schnitten und auch in der biochemischen Analyse aufwiesen. Zusätzlich zeigten sie auch gleichermaßen Astrogliose und Mikrogliose. Dies lässt sich allerdings darauf zurückführen, dass die Krankheit bei den geimpften Tieren erst später einsetzt. Aber letztendlich erkranken auch die geimpften Tiere. Hinzuzufügen ist, dass die Tiere Antikörper gegen die Vakzine, rekombinante α -Syn-Fibrillen und auch gegen Hirnhomogenate verschiedener PD-, MSA- und DLB-Patienten entwickeln konnten. Dass Patientenhirnhomogenate von den Antikörpern erkannt wurden, gibt einen Hinweis darauf, dass diese Vakzine auch in klinischen Studien eine Wirksamkeit zeigen könnte.

Als nächstes sollten die vier Impfstoffkandidaten einzeln in dem gleichen Mausmodell getestet werden. Möglicherweise ist die Wirksamkeit der einzelnen Epitope unterschiedlich und so wäre es dann möglich die wirksameren Kandidaten in einem Impfstoff zu vereinen, um einen wirkungsvolleren Impfstoff zu erhalten. Schlussendlich muss auch bedacht werden, dass diese Epitope von synthetischen α -Syn-Fibrillen stammen. Diese könnten auch eine andere Struktur besitzen als α -Syn-Aggregate, die sich in Patienten bilden. Zum Zeitpunkt der Entwicklung der Impfstoffe war allerdings noch keine ex-vivo Struktur bekannt. Ein Impfstoff, der auf ex-vivo Fibrillenstrukturen, basiert, könnte möglicherweise die Patientenhirnhomogenate noch besser erkennen.

Alles in allem lässt sich sagen, dass dieser quadrivalente Impfstoff eine gute Immunantwort in den Mäusen induziert hat und sie schützen konnte. Dadurch, dass die Plasmen auch Patientenproben erkennen, besteht Potential für eine gute Wirksamkeit in klinischen Studien.

6. Arbeitsbeteiligung

Die verwendeten Impfstoffkandidaten wurden von Dr. José Miguel Flores-Fernandez im Labor von Prof. Dr. Holger Wille an der University of Alberta hergestellt. Die intragastrischen Injektionen und die Griffkrafttests wurden von Liang Ma durchgeführt. Die ELISA-Tests wurden gemeinschaftlich mit Sara Reithofer ausgeführt.

7. Literaturverzeichnis

- Aboutit, Saïda; Bousset, Luc; Loria, Frida; Zhu, Seng; Chaumont, Fabrice de; Pieri, Laura et al. (2016): Tunneling nanotubes spread fibrillar α -synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. In: *The EMBO journal* 35 (19), S. 2120–2138. DOI: 10.15252/embj.201593411.
- Ahn, Keun Jae; Paik, Seung R.; Chung, Kwang Chul; Kim, Jongsun (2006): Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. In: *Journal of neurochemistry* 97 (1), S. 265–279. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03731.x.
- Alborghetti, Marika; Nicoletti, Ferdinando (2019): Different Generations of Type-B Monoamine Oxidase Inhibitors in Parkinson's Disease: From Bench to Bedside. In: *Current neuropharmacology* 17 (9), S. 861–873. DOI: 10.2174/1570159X16666180830100754.
- Ali, G. N.; Wallace, K. L.; Schwartz, R.; DeCarle, D. J.; Zagami, A. S.; Cook, I. J. (1996): Mechanisms of oral-pharyngeal dysphagia in patients with Parkinson's disease. In: *Gastroenterology* 110 (2), S. 383–392. DOI: 10.1053/gast.1996.v110.pm8566584.
- Anderson, John P.; Walker, Donald E.; Goldstein, Jason M.; Laat, Rian de; Banducci, Kelly; Caccavello, Russell J. et al. (2006): Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (40), S. 29739–29752. DOI: 10.1074/jbc.M600933200.
- Angelova, Plamena R.; Ludtmann, Marthe H. R.; Horrocks, Mathew H.; Negoda, Alexander; Cremades, Nunilo; Klenerman, David et al. (2016): Ca^{2+} is a key factor in α -synuclein-induced neurotoxicity. In: *Journal of Cell Science* 129 (9), S. 1792–1801. DOI: 10.1242/jcs.180737.
- Annerino, Dana M.; Arshad, Shawn; Taylor, Georgia M.; Adler, Charles H.; Beach, Thomas G.; Greene, James G. (2012): Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. In: *Acta Neuropathol* 124 (5), S. 665–680. DOI: 10.1007/s00401-012-1040-2.

- Arnesen, Thomas; van Damme, Petra; Plevoda, Bogdan; Helsens, Kenny; Evjenth, Rune; Colaert, Niklaas et al. (2009): Proteomics analyses reveal the evolutionary conservation and divergence of N-terminal acetyltransferases from yeast and humans. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (20), S. 8157–8162. DOI: 10.1073/pnas.0901931106.
- Baba, M.; Nakajo, S.; Tu, P. H.; Tomita, T.; Nakaya, K.; Lee, V. M. et al. (1998): Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. In: *The American Journal of Pathology* 152 (4), S. 879–884.
- Bae, Eun-Jin; Lee, He-Jin; Rockenstein, Edward; Ho, Dong-Hwan; Park, Eun-Bi; Yang, Na-Young et al. (2012): Antibody-aided clearance of extracellular α -synuclein prevents cell-to-cell aggregate transmission. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (39), S. 13454–13469. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1292-12.2012.
- Balguerie, Axelle; Dos Reis, Suzana; Ritter, Christiane; Chaignepain, Stéphane; Couly-Salin, Bénédicte; Forge, Vincent et al. (2003): Domain organization and structure-function relationship of the HET-s prion protein of *Podospora anserina*. In: *The EMBO journal* 22 (9), S. 2071–2081. DOI: 10.1093/emboj/cdg213.
- Banks, William A.; Terrell, Brie; Farr, Susan A.; Robinson, Sandra M.; Nonaka, Naoko; Morley, John E. (2002): Passage of amyloid beta protein antibody across the blood-brain barrier in a mouse model of Alzheimer's disease. In: *Peptides* 23 (12), S. 2223–2226. DOI: 10.1016/S0196-9781(02)00261-9.
- Bartels, Tim; Choi, Joanna G.; Selkoe, Dennis J. (2011): α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. In: *Nature* 477 (7362), S. 107–110. DOI: 10.1038/nature10324.
- Bartels, Tim; Kim, Nora C.; Luth, Eric S.; Selkoe, Dennis J. (2014): N-alpha-acetylation of α -synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. In: *PLOS ONE* 9 (7), e103727. DOI: 10.1371/journal.pone.0103727.
- Benabid, Alim Louis (2003): Deep brain stimulation for Parkinson's disease. In: *Current Opinion in Neurobiology* 13 (6), S. 696–706. DOI: 10.1016/j.conb.2003.11.001.
- Bengoa-Vergniory, Nora; Roberts, Rosalind F.; Wade-Martins, Richard; Alegre-Abarrategui, Javier (2017): Alpha-synuclein oligomers: a new hope. In: *Acta Neuropathol* 134 (6), S. 819–838. DOI: 10.1007/s00401-017-1755-1.
- Bergström, Ann-Louise; Kallunki, Pekka; Fog, Karina (2016): Development of Passive Immunotherapies for Synucleinopathies. In: *Movement Disorders* 31 (2), S. 203–213. DOI: 10.1002/mds.26481.
- Beyer, Katrin (2006): Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers. In: *Acta Neuropathol* 112 (3), S. 237–251. DOI: 10.1007/s00401-006-0104-6.
- Braak, H.; Rüb, U.; Gai, W. P.; Del Tredici, K. (2003a): Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. In: *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)* 110 (5), S. 517–536. DOI: 10.1007/s00702-002-0808-2.

- Braak, Heiko; Del Tredici, Kelly; Rüb, Udo; Vos, Rob A. I. de; Jansen Steur, Ernst N. H.; Braak, Eva (2003b): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. In: *Neurobiology of aging* 24 (2), S. 197–211. DOI: 10.1016/s0197-4580(02)00065-9.
- Braak, Heiko; Vos, Rob A. I. de; Bohl, Jürgen; Del Tredici, Kelly (2006): Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. In: *Neuroscience Letters* 396 (1), S. 67–72. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.11.012.
- Brahmachari, Saurav; Ge, Preston; Lee, Su Hyun; Kim, Donghoon; Karuppagounder, Senthilkumar S.; Kumar, Manoj et al. (2016): Activation of tyrosine kinase c-Abl contributes to α -synuclein-induced neurodegeneration. In: *J Clin Invest* 126 (8), S. 2970–2988. DOI: 10.1172/JCI85456.
- Brys, Mirosław; Fanning, Laura; Hung, Serena; Ellenbogen, Aaron; Penner, Natalia; Yang, Minhua et al. (2019): Randomized phase I clinical trial of anti- α -synuclein antibody BILB054. In: *Movement Disorders* 34 (8), S. 1154–1163. DOI: 10.1002/mds.27738.
- Bu, Bing; Tong, Xin; Li, Dechang; Hu, Yachong; He, Wangxiao; Zhao, Chunyu et al. (2017): N-Terminal Acetylation Preserves α -Synuclein from Oligomerization by Blocking Intermolecular Hydrogen Bonds. In: *ACS chemical neuroscience* 8 (10), S. 2145–2151. DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00250.
- Burai, Ritwik; Ait-Bouziad, Nadine; Chiki, Anass; Lashuel, Hilal A. (2015): Elucidating the Role of Site-Specific Nitration of α -Synuclein in the Pathogenesis of Parkinson's Disease via Protein Semisynthesis and Mutagenesis. In: *Journal of the American Chemical Society* 137 (15), S. 5041–5052. DOI: 10.1021/ja5131726.
- Burré, Jacqueline; Sharma, Manu; Tsetsenis, Theodoros; Buchman, Vladimir; Etherton, Mark R.; Südhof, Thomas C. (2010): Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. In: *Science (New York, N.Y.)* 329 (5999), S. 1663–1667. DOI: 10.1126/science.1195227.
- Campbell, B. C.; McLean, C. A.; Culvenor, J. G.; Gai, W. P.; Blumbergs, P. C.; Jäkälä, P. et al. (2001): The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. In: *Journal of neurochemistry* 76 (1), S. 87–96. DOI: 10.1046/j.1471-4159.2001.00021.x.
- Chatterjee, Diptaman; Bhatt, Mansi; Butler, David; Genst, Erwin de; Dobson, Christopher M.; Messer, Anne; Kordower, Jeffrey H. (2018): Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α -synuclein-based Parkinson's disease model. In: *npj Parkinson's Disease* 4 (1), S. 25. DOI: 10.1038/s41531-018-0062-4.
- Chaudhary, Himanshu; Iyer, Aditya; Subramaniam, Vinod; Claessens, Mireille M. A. E. (2016): α -Synuclein Oligomers Stabilize Pre-Existing Defects in Supported Bilayers and Propagate Membrane Damage in a Fractal-Like Pattern. In: *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 32 (45), S. 11827–11836. DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b02572.
- Chavarría, Cecilia; Rodríguez-Bottero, Sebastián; Quijano, Celia; Cassina, Patricia; Souza, José M. (2018): Impact of monomeric, oligomeric and fibrillar alpha-synuclein on astrocyte reactivity and toxicity to neurons. In: *The Biochemical journal* 475 (19), S. 3153–3169. DOI: 10.1042/BCJ20180297.

- Chavarría, Cecilia; Souza, José M. (2013): Oxidation and nitration of α -synuclein and their implications in neurodegenerative diseases. In: *Archives of biochemistry and biophysics* 533 (1-2), S. 25–32. DOI: 10.1016/j.abb.2013.02.009.
- Chen, Leo; Jin, Jinghua; Davis, Jeanne; Zhou, Yong; Wang, Yan; Liu, Jun et al. (2007): Oligomeric alpha-synuclein inhibits tubulin polymerization. In: *Biochemical and biophysical research communications* 356 (3), S. 548–553. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.02.163.
- Choi, Bong-Kyu; Choi, Mal-Gi; Kim, Jae-Yeol; Yang, Yoosoo; Lai, Ying; Kweon, Dae-Hyuk et al. (2013): Large α -synuclein oligomers inhibit neuronal SNARE-mediated vesicle docking. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (10), S. 4087–4092. DOI: 10.1073/pnas.1218424110.
- Chung, Kathryn A.; Pfeiffer, Ronald F. (2021): Gastrointestinal dysfunction in the synucleinopathies. In: *Clin Auton Res* 31 (1), S. 77–99. DOI: 10.1007/s10286-020-00745-7.
- Clark, Robert S. B.; Bayir, Hülya; Jenkins, Larry W. (2005): Posttranslational protein modifications. In: *Critical care medicine* 33 (12 Suppl), S407-9. DOI: 10.1097/01.ccm.0000191712.96336.51.
- Colby, David W.; Prusiner, Stanley B. (2011): Prions. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (1), a006833. DOI: 10.1101/cshperspect.a006833.
- Colla, Emanuela; Jensen, Poul H.; Pletnikova, Olga; Troncoso, Juan C.; Glabe, Charles; Lee, Michael K. (2012): Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (10), S. 3301–3305. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5368-11.2012.
- Conway, K. A.; Harper, J. D.; Lansbury, P. T. (1998): Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. In: *Nature medicine* 4 (11), S. 1318–1320. DOI: 10.1038/3311.
- Coustou, V.; Deleu, C.; Saupe, S.; Begueret, J. (1997): The protein product of the het-s heterokaryon incompatibility gene of the fungus *Podospira anserina* behaves as a prion analog. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (18), S. 9773–9778. DOI: 10.1073/pnas.94.18.9773.
- Crowther, R. A.; Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. (1998): Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. In: *FEBS letters* 436 (3), S. 309–312. DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01146-6.
- Daniele, Stefano G.; Béraud, Dawn; Davenport, Connor; Cheng, Kui; Yin, Hang; Maguire-Zeiss, Kathleen A. (2015): Activation of MyD88-dependent TLR1/2 signaling by misfolded α -synuclein, a protein linked to neurodegenerative disorders. In: *Science signaling* 8 (376), ra45. DOI: 10.1126/scisignal.2005965.
- Danielson, Steven R.; Held, Jason M.; Schilling, Birgit; Oo, May; Gibson, Bradford W.; Andersen, Julie K. (2009): Preferentially increased nitration of alpha-synuclein at tyrosine-39 in a cellular oxidative model of Parkinson's disease. In: *Analytical chemistry* 81 (18), S. 7823–7828. DOI: 10.1021/ac901176t.
- Danzer, Karin M.; Haasen, Dorothea; Karow, Anne R.; Moussaud, Simon; Habeck, Matthias; Giese, Armin et al. (2007): Different species of alpha-synuclein oligomers induce

calcium influx and seeding. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (34), S. 9220–9232. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2617-07.2007.

Danzer, Karin M.; Kranich, Lisa R.; Ruf, Wolfgang P.; Cagsal-Getkin, Ozge; Winslow, Ashley R.; Zhu, Liya et al. (2012): Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. In: *Mol Neurodegeneration* 7, S. 42. DOI: 10.1186/1750-1326-7-42.

Dettmer, Ulf; Newman, Andrew J.; Soldner, Frank; Luth, Eric S.; Kim, Nora C.; Saucken, Victoria E. von et al. (2015): Parkinson-causing α -synuclein missense mutations shift native tetramers to monomers as a mechanism for disease initiation. In: *Nat Commun* 6, S. 7314. DOI: 10.1038/ncomms8314.

Di Maio, Roberto; Barrett, Paul J.; Hoffman, Eric K.; Barrett, Caitlyn W.; Zharikov, Alevtina; Borah, Anupom et al. (2016): α -Synuclein binds to TOM20 and inhibits mitochondrial protein import in Parkinson's disease. In: *Science translational medicine* 8 (342), 342ra78. DOI: 10.1126/scitranslmed.aaf3634.

Di Monte, D. A.; Wu, E. Y.; Irwin, I.; Delanney, L. E.; Langston, J. W. (1992): Production and disposition of 1-methyl-4-phenylpyridinium in primary cultures of mouse astrocytes. In: *Glia* 5 (1), S. 48–55. DOI: 10.1002/glia.440050108.

Dickson, Dennis W. (2018): Neuropathology of Parkinson disease. In: *Parkinsonism & Related Disorders* 46 Suppl 1 (Suppl 1), S30-S33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.

Dikiy, Igor; Fauvet, Bruno; Jovičić, Ana; Mahul-Mellier, Anne-Laure; Desobry, Carole; El-Turk, Farah et al. (2016): Semisynthetic and in Vitro Phosphorylation of Alpha-Synuclein at Y39 Promotes Functional Partly Helical Membrane-Bound States Resembling Those Induced by PD Mutations. In: *ACS chemical biology* 11 (9), S. 2428–2437. DOI: 10.1021/acscchembio.6b00539.

Diógenes, Maria José; Dias, Raquel B.; Rombo, Diogo M.; Vicente Miranda, Hugo; Maiolino, Francesca; Guerreiro, Patrícia et al. (2012): Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32 (34), S. 11750–11762. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0234-12.2012.

Dorval, Véronique; Fraser, Paul E. (2006): Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 281 (15), S. 9919–9924. DOI: 10.1074/jbc.M510127200.

Du, Xiao-yu; Xie, Xi-xiu; Liu, Rui-tian (2020): The Role of α -Synuclein Oligomers in Parkinson's Disease. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22), S. 8645. DOI: 10.3390/ijms21228645.

Duty, Susan; Jenner, Peter (2011): Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. In: *British journal of pharmacology* 164 (4), S. 1357–1391. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x.

Ebrahimi-Fakhari, Darius; Cantuti-Castelvetri, Ippolita; Fan, Zhanyun; Rockenstein, Edward; Masliah, Eliezer; Hyman, Bradley T. et al. (2011): Distinct roles in vivo for the ubiquitin-proteasome system and the autophagy-lysosomal pathway in the degradation of α -synuclein. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (41), S. 14508–14520. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1560-11.2011.

Ellis, C. E.; Schwartzberg, P. L.; Grider, T. L.; Fink, D. W.; Nussbaum, R. L. (2001): alpha-synuclein is phosphorylated by members of the Src family of protein-tyrosine kinases. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (6), S. 3879–3884. DOI: 10.1074/jbc.M010316200.

Emin, Derya; Zhang, Yu P.; Lobanova, Evgeniia; Miller, Alyssa; Li, Xuecong; Xia, Zengjie et al. (2022): Small soluble α -synuclein aggregates are the toxic species in Parkinson's disease. In: *Nat Commun* 13 (1), S. 5512. DOI: 10.1038/s41467-022-33252-6.

Emmanouilidou, Evangelia; Melachroinou, Katerina; Roumeliotis, Theodoros; Garbis, Spiros D.; Ntzouni, Maria; Margaritis, Lukas H. et al. (2010a): Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (20), S. 6838–6851. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.

Emmanouilidou, Evangelia; Stefanis, Leonidas; Vekrellis, Kostas (2010b): Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. In: *Neurobiology of aging* 31 (6), S. 953–968. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2008.07.008.

Fauvet, Bruno; Fares, Mohamed-Bilal; Samuel, Filsy; Dikiy, Igor; Tandon, Anurag; Eliezer, David; Lashuel, Hilal A. (2012): Characterization of semisynthetic and naturally N α -acetylated α -synuclein in vitro and in intact cells: implications for aggregation and cellular properties of α -synuclein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 287 (34), S. 28243–28262. DOI: 10.1074/jbc.M112.383711.

Fujiwara, Hideo; Hasegawa, Masato; Dohmae, Naoshi; Kawashima, Akiko; Masliah, Eliezer; Goldberg, Matthew S. et al. (2002): alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. In: *Nat Cell Biol* 4 (2), S. 160–164. DOI: 10.1038/ncb748.

Games, Dora; Valera, Elvira; Spencer, Brian; Rockenstein, Edward; Mante, Michael; Adame, Anthony et al. (2014): Reducing C-terminal-truncated alpha-synuclein by immunotherapy attenuates neurodegeneration and propagation in Parkinson's disease-like models. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (28), S. 9441–9454. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5314-13.2014.

George, Julia M. (2002): The synucleins. In: *Genome Biology* 3 (1), REVIEWS3002. DOI: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002.

Ghochikyan, Anahit; Petrushina, Irina; Davtyan, Hayk; Hovakimyan, Armine; Saing, Tommy; Davtyan, Arpine et al. (2014): Immunogenicity of epitope vaccines targeting different B cell antigenic determinants of human α -synuclein: feasibility study. In: *Neuroscience Letters* 560, S. 86–91. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.12.028.

Giasson, B. I.; Duda, J. E.; Murray, I. V.; Chen, Q.; Souza, J. M.; Hurtig, H. I. et al. (2000): Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. In: *Science (New York, N.Y.)* 290 (5493), S. 985–989. DOI: 10.1126/science.290.5493.985.

Giasson, Benoit I.; Duda, John E.; Quinn, Shawn M.; Zhang, Bin; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M-Y (2002): Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. In: *Neuron* 34 (4), S. 521–533. DOI: 10.1016/S0896-6273(02)00682-7.

- Gómez-Benito, Mónica; Granado, Noelia; García-Sanz, Patricia; Michel, Anne; Dumoulin, Mireille; Moratalla, Rosario (2020): Modeling Parkinson's Disease With the Alpha-Synuclein Protein. In: *Frontiers in Pharmacology* 11, S. 356. DOI: 10.3389/fphar.2020.00356.
- Gómez-Tortosa, E.; Newell, K.; Irizarry, M. C.; Sanders, J. L.; Hyman, B. T. (2000): α -Synuclein immunoreactivity in dementia with Lewy bodies: morphological staging and comparison with ubiquitin immunostaining. In: *Acta Neuropathol* 99 (4), S. 352–357. DOI: 10.1007/s004010051135.
- Grozdanov, Veselin; Danzer, Karin M. (2018): Release and uptake of pathologic alpha-synuclein. In: *Cell Tissue Res* 373 (1), S. 175–182. DOI: 10.1007/s00441-017-2775-9.
- Guerrero-Ferreira, Ricardo; Taylor, Nicholas Mi; Mona, Daniel; Ringler, Philippe; Lauer, Matthias E.; Riek, Roland et al. (2018): Cryo-EM structure of alpha-synuclein fibrils. In: *eLife* 7. DOI: 10.7554/eLife.36402.
- Guo, Jing L.; Lee, Virginia M. Y. (2014): Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. In: *Nat Med* 20 (2), S. 130–138. DOI: 10.1038/nm.3457.
- Hart, Gerald W.; Housley, Michael P.; Slawson, Chad (2007): Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. In: *Nature* 446 (7139), S. 1017–1022. DOI: 10.1038/nature05815.
- Hasegawa, Masato; Fujiwara, Hideo; Nonaka, Takashi; Wakabayashi, Koichi; Takahashi, Hitoshi; Lee, Virginia M-Y et al. (2002): Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (50), S. 49071–49076. DOI: 10.1074/jbc.M208046200.
- Hejjaoui, Mirva; Butterfield, Sara; Fauvet, Bruno; Vercruyse, Filip; Cui, Jia; Dikiy, Igor et al. (2012): Elucidating the role of C-terminal post-translational modifications using protein semisynthesis strategies: α -synuclein phosphorylation at tyrosine 125. In: *Journal of the American Chemical Society* 134 (11), S. 5196–5210. DOI: 10.1021/ja210866j.
- Hejjaoui, Mirva; Haj-Yahya, Mahmood; Kumar, K. S. Ajish; Brik, Ashraf; Lashuel, Hilal A. (2011): Towards elucidation of the role of ubiquitination in the pathogenesis of Parkinson's disease with semisynthetic ubiquitinated α -synuclein. In: *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 50 (2), S. 405–409. DOI: 10.1002/anie.201005546.
- Hirsch, Etienne C.; Hunot, Stéphane (2009): Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? In: *The Lancet Neurology* 8 (4), S. 382–397. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70062-6.
- Hodara, Roberto; Norris, Erin H.; Giasson, Benoit I.; Mishizen-Eberz, Amanda J.; Lynch, David R.; Lee, Virginia M-Y; Ischiropoulos, Harry (2004): Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration: diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (46), S. 47746–47753. DOI: 10.1074/jbc.M408906200.
- Hoyer, Wolfgang; Cherny, Dmitry; Subramaniam, Vinod; Jovin, Thomas M. (2004): Impact of the acidic C-terminal region comprising amino acids 109-140 on alpha-synuclein aggregation in vitro. In: *Biochemistry* 43 (51), S. 16233–16242. DOI: 10.1021/bi048453u.
- Hughes, Craig D.; Choi, Minee L.; Ryten, Mina; Hopkins, Lee; Drews, Anna; Botía, Juan A. et al. (2019): Picomolar concentrations of oligomeric alpha-synuclein sensitizes TLR4 to

play an initiating role in Parkinson's disease pathogenesis. In: *Acta Neuropathol* 137 (1), S. 103–120. DOI: 10.1007/s00401-018-1907-y.

Inglis, Kelly J.; Chereau, David; Brigham, Elizabeth F.; Chiou, San-San; Schöbel, Susanne; Frigon, Normand L. et al. (2009): Polo-like kinase 2 (PLK2) phosphorylates alpha-synuclein at serine 129 in central nervous system. In: *The Journal of Biological Chemistry* 284 (5), S. 2598–2602. DOI: 10.1074/jbc.C800206200.

Iwatsubo, Takeshi (2003): Aggregation of alpha-synuclein in the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Journal of neurology* 250 Suppl 3, III11–4. DOI: 10.1007/s00415-003-1303-x.

Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. (1994): Identification of two distinct synucleins from human brain. In: *FEBS letters* 345 (1), S. 27–32. DOI: 10.1016/0014-5793(94)00395-5.

Jankovic, J. (2008): Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. In: *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79 (4), S. 368–376. DOI: 10.1136/jnnp.2007.131045.

Jankovic, Joseph; Goodman, Ira; Safirstein, Beth; Marmon, Tonya K.; Schenk, Dale B.; Koller, Martin et al. (2018): Safety and Tolerability of Multiple Ascending Doses of PRX002/RG7935, an Anti- α -Synuclein Monoclonal Antibody, in Patients With Parkinson Disease: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA neurology* 75 (10), S. 1206–1214. DOI: 10.1001/jamaneurol.2018.1487.

Javitch, J. A.; D'Amato, R. J.; Strittmatter, S. M.; Snyder, S. H. (1985): Parkinsonism-inducing neurotoxin, N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 -tetrahydropyridine: uptake of the metabolite N-methyl-4-phenylpyridine by dopamine neurons explains selective toxicity. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (7), S. 2173–2177. DOI: 10.1073/pnas.82.7.2173.

Jiang, Peizhou; Gan, Ming; Ebrahim, Abdul Shukkur; Lin, Wen-Lang; Melrose, Heather L.; Yen, Shu-Hui C. (2010): ER stress response plays an important role in aggregation of α -synuclein. In: *Mol Neurodegeneration* 5 (1), S. 56. DOI: 10.1186/1750-1326-5-56.

Johnson, Matthew; Coulton, Arthur T.; Geeves, Michael A.; Mulvihill, Daniel P. (2010): Targeted amino-terminal acetylation of recombinant proteins in *E. coli*. In: *PLOS ONE* 5 (12), e15801. DOI: 10.1371/journal.pone.0015801.

Kalia, Suneil K.; Sankar, Tejas; Lozano, Andres M. (2013): Deep brain stimulation for Parkinson's disease and other movement disorders. In: *Current opinion in neurology* 26 (4), S. 374–380. DOI: 10.1097/WCO.0b013e3283632d08.

Kang, Lijuan; Janowska, Maria K.; Moriarty, Gina M.; Baum, Jean (2013): Mechanistic insight into the relationship between N-terminal acetylation of α -synuclein and fibril formation rates by NMR and fluorescence. In: *PLOS ONE* 8 (9), e75018. DOI: 10.1371/journal.pone.0075018.

Kang, Lijuan; Moriarty, Gina M.; Woods, Lucy A.; Ashcroft, Alison E.; Radford, Sheena E.; Baum, Jean (2012): N-terminal acetylation of α -synuclein induces increased transient helical propensity and decreased aggregation rates in the intrinsically disordered monomer. In: *Protein science : a publication of the Protein Society* 21 (7), S. 911–917. DOI: 10.1002/pro.2088.

- Katzenschlager, Regina; Lees, Andrew J. (2002): Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. In: *J Neurol* 249 Suppl 2 (2), 119-24. DOI: 10.1007/s00415-002-1204-4.
- Kaufmann, Timothy J.; Harrison, Paul M.; Richardson, Magnus J. E.; Pinheiro, Teresa J. T.; Wall, Mark J. (2016): Intracellular soluble α -synuclein oligomers reduce pyramidal cell excitability. In: *The Journal of physiology* 594 (10), S. 2751–2772. DOI: 10.1113/JP271968.
- Kiely, Aoife P.; Asi, Yasmine T.; Kara, Eleanna; Limousin, Patricia; Ling, Helen; Lewis, Patrick et al. (2013): α -Synucleinopathy associated with G51D SNCA mutation: a link between Parkinson's disease and multiple system atrophy? In: *Acta Neuropathol* 125 (5), S. 753–769. DOI: 10.1007/s00401-013-1096-7.
- Kim, Sangjune; Kwon, Seung-Hwan; Kam, Tae-In; Panicker, Nikhil; Karuppagounder, Senthilkumar S.; Lee, Saebom et al. (2019): Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. In: *Neuron* 103 (4), 627-641.e7. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.05.035.
- Kim, Yong Man; Jang, Won Hee; Quezado, Martha M.; Oh, Yohan; Chung, Kwang Chul; Junn, Eunsung; Mouradian, M. Maral (2011): Proteasome inhibition induces α -synuclein SUMOylation and aggregate formation. In: *Journal of the neurological sciences* 307 (1-2), S. 157–161. DOI: 10.1016/j.jns.2011.04.015.
- Knecht, Luisa; Folke, Jonas; Dodel, Richard; Ross, J. Alexander; Albus, Alexandra (2022): Alpha-synuclein Immunization Strategies for Synucleinopathies in Clinical Studies: A Biological Perspective. In: *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 19 (5), S. 1489–1502. DOI: 10.1007/s13311-022-01288-7.
- Koeglsperger, Thomas; Rumpf, Svenja-Lotta; Schließer, Patricia; Struebing, Felix L.; Brendel, Matthias; Levin, Johannes et al. (2023): Neuropathology of incidental Lewy body & prodromal Parkinson's disease. In: *Molecular Neurodegeneration* 18 (1), S. 32. DOI: 10.1186/s13024-023-00622-7.
- Koga, Shunsuke; Sekiya, Hiroaki; Kondru, Naveen; Ross, Owen A.; Dickson, Dennis W. (2021): Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. In: *Molecular Neurodegeneration* 16 (1), S. 83. DOI: 10.1186/s13024-021-00501-z.
- Kordower, Jeffrey H.; Chu, Yaping; Hauser, Robert A.; Freeman, Thomas B.; Olanow, C. Warren (2008): Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. In: *Nat Med* 14 (5), S. 504–506. DOI: 10.1038/nm1747.
- Kraus, Allison; Hoyt, Forrest; Schwartz, Cindi L.; Hansen, Bryan; Artikis, Efrosini; Hughson, Andrew G. et al. (2021): High-resolution structure and strain comparison of infectious mammalian prions. In: *Molecular Cell* 81 (21), 4540-4551.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.08.011.
- Krüger, R.; Kuhn, W.; Müller, T.; Voitalla, D.; Graeber, M.; Kösel, S. et al. (1998): Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. In: *Nature genetics* 18 (2), S. 106–108. DOI: 10.1038/ng0298-106.
- Kumar, Senthil T.; Mahul-Mellier, Anne-Laure; Hegde, Ramanath Narayana; Rivière, Gwladys; Moons, Rani; Ibáñez de Opakua, Alain et al. (2022): A NAC domain mutation

- (E83Q) unlocks the pathogenicity of human alpha-synuclein and recapitulates its pathological diversity. In: *Science Advances* 8 (17), eabn0044. DOI: 10.1126/sciadv.abn0044.
- Kuzuhara, S.; Mori, H.; Izumiyama, N.; Yoshimura, M.; Ihara, Y. (1988): Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. In: *Acta Neuropathol* 75 (4), S. 345–353. DOI: 10.1007/BF00687787.
- Lee, Andrea; Gilbert, Rebecca M. (2016): Epidemiology of Parkinson Disease. In: *Neurologic Clinics* 34 (4), S. 955–965. DOI: 10.1016/j.ncl.2016.06.012.
- Lee, He-Jin; Suk, Ji-Eun; Bae, Eun-Jin; Lee, Jung-Ho; Paik, Seung R.; Lee, Seung-Jae (2008a): Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (9), S. 1835–1849. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.01.017.
- Lee, He-Jin; Suk, Ji-Eun; Patrick, Christina; Bae, Eun-Jin; Cho, Ji-Hoon; Rho, Sangchul et al. (2010): Direct transfer of alpha-synuclein from neuron to astroglia causes inflammatory responses in synucleinopathies. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (12), S. 9262–9272. DOI: 10.1074/jbc.M109.081125.
- Lee, James T.; Wheeler, Tiffany C.; Li, Lian; Chin, Lih-Shen (2008b): Ubiquitination of alpha-synuclein by Siah-1 promotes alpha-synuclein aggregation and apoptotic cell death. In: *Human molecular genetics* 17 (6), S. 906–917. DOI: 10.1093/hmg/ddm363.
- Lewis, Yuka E.; Galesic, Ana; Levine, Paul M.; Leon, Cesar A. de; Lamiri, Natalie; Brennan, Caroline K.; Pratt, Matthew R. (2017): O-GlcNAcylation of α -Synuclein at Serine 87 Reduces Aggregation without Affecting Membrane Binding. In: *ACS chemical biology* 12 (4), S. 1020–1027. DOI: 10.1021/acscchembio.7b00113.
- Li, Hong-Tao; Du, Hai-Ning; Tang, Lin; Hu, Jun; Hu, Hong-Yu (2002): Structural transformation and aggregation of human alpha-synuclein in trifluoroethanol: non-amyloid component sequence is essential and beta-sheet formation is prerequisite to aggregation. In: *Biopolymers* 64 (4), S. 221–226. DOI: 10.1002/bip.10179.
- Li, Jia-Yi; Englund, Elisabet; Holton, Janice L.; Soulet, Denis; Hagell, Peter; Lees, Andrew J. et al. (2008): Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. In: *Nat Med* 14 (5), S. 501–503. DOI: 10.1038/nm1746.
- Linderson, Evo; Beedholm, Rasmus; Højrup, Peter; Moos, Torben; Gai, WeiPing; Hendil, Klavs B.; Jensen, Poul H. (2004): Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. In: *The Journal of Biological Chemistry* 279 (13), S. 12924–12934. DOI: 10.1074/jbc.M306390200.
- Liu, Chang-Wei; Giasson, Benoit I.; Lewis, Karen A.; Lee, Virginia M.; Demartino, George N.; Thomas, Philip J. (2005): A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (24), S. 22670–22678. DOI: 10.1074/jbc.M501508200.
- Liu, Yanying; Qiang, Min; Wei, Yan; He, Rongqiao (2011): A novel molecular mechanism for nitrated {alpha}-synuclein-induced cell death. In: *Journal of molecular cell biology* 3 (4), S. 239–249. DOI: 10.1093/jmcb/mjr011.

- Lohmann, Stephanie; Bernis, Maria E.; Tachu, Babila J.; Ziemski, Alexandra; Grigoletto, Jessica; Tamgüney, Gültekin (2019): Oral and intravenous transmission of α -synuclein fibrils to mice. In: *Acta Neuropathol* 138 (4), S. 515–533. DOI: 10.1007/s00401-019-02037-5.
- Ludtmann, Marthe H. R.; Angelova, Plamena R.; Horrocks, Mathew H.; Choi, Minee L.; Rodrigues, Margarida; Baev, Artyom Y. et al. (2018): α -synuclein oligomers interact with ATP synthase and open the permeability transition pore in Parkinson's disease. In: *Nat Commun* 9 (1), S. 2293. DOI: 10.1038/s41467-018-04422-2.
- Luk, Kelvin C.; Kehm, Victoria; Carroll, Jenna; Zhang, Bin; O'Brien, Patrick; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M-Y (2012a): Pathological α -synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. In: *Science (New York, N.Y.)* 338 (6109), S. 949–953. DOI: 10.1126/science.1227157.
- Luk, Kelvin C.; Kehm, Victoria M.; Zhang, Bin; O'Brien, Patrick; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M. Y. (2012b): Intracerebral inoculation of pathological α -synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative α -synucleinopathy in mice. In: *The Journal of experimental medicine* 209 (5), S. 975–986. DOI: 10.1084/jem.20112457.
- Luk, Kelvin C.; Song, Cheng; O'Brien, Patrick; Stieber, Anna; Branch, Jonathan R.; Brunden, Kurt R. et al. (2009): Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (47), S. 20051–20056. DOI: 10.1073/pnas.0908005106.
- Luth, Eric S.; Stavrovskaya, Irina G.; Bartels, Tim; Kristal, Bruce S.; Selkoe, Dennis J. (2014): Soluble, prefibrillar α -synuclein oligomers promote complex I-dependent, Ca^{2+} -induced mitochondrial dysfunction. In: *Journal of Biological Chemistry* 289 (31), S. 21490–21507. DOI: 10.1074/jbc.M113.545749.
- Luthman, J.; Fredriksson, A.; Lewander, T.; Jonsson, G.; Archer, T. (1989): Effects of d-amphetamine and methylphenidate on hyperactivity produced by neonatal 6-hydroxydopamine treatment. In: *Psychopharmacology* 99 (4), S. 550–557. DOI: 10.1007/BF00589907.
- Mahul-Mellier, Anne-Laure; Fauvet, Bruno; Gysbers, Amanda; Dikiy, Igor; Oueslati, Abid; Georgeon, Sandrine et al. (2014): c-Abl phosphorylates α -synuclein and regulates its degradation: implication for α -synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Human molecular genetics* 23 (11), S. 2858–2879. DOI: 10.1093/hmg/ddt674.
- Maltsev, Alexander S.; Ying, Jinfa; Bax, Ad (2012): Impact of N-terminal acetylation of α -synuclein on its random coil and lipid binding properties. In: *Biochemistry* 51 (25), S. 5004–5013. DOI: 10.1021/bi300642h.
- Mandler, Markus; Valera, Elvira; Rockenstein, Edward; Mante, Michael; Weninger, Harald; Patrick, Christina et al. (2015): Active immunization against alpha-synuclein ameliorates the degenerative pathology and prevents demyelination in a model of multiple system atrophy. In: *Mol Neurodegeneration* 10, S. 10. DOI: 10.1186/s13024-015-0008-9.
- Mandler, Markus; Valera, Elvira; Rockenstein, Edward; Weninger, Harald; Patrick, Christina; Adame, Anthony et al. (2014): Next-generation active immunization approach for

synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. In: *Acta Neuropathol* 127 (6), S. 861–879. DOI: 10.1007/s00401-014-1256-4.

Mao, Xiaobo; Ou, Michael Tianhao; Karuppagounder, Senthilkumar S.; Kam, Tae-In; Yin, Xiling; Xiong, Yulan et al. (2016): Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. In: *Science (New York, N.Y.)* 353 (6307). DOI: 10.1126/science.aah3374.

Maroteaux, L.; Campanelli, J. T.; Scheller, R. H. (1988): Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 8 (8), S. 2804–2815. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.08-08-02804.1988.

Marotta, Nicholas P.; Lin, Yu Hsuan; Lewis, Yuka E.; Ambroso, Mark R.; Zaro, Balyn W.; Roth, Maxwell T. et al. (2015): O-GlcNAc modification blocks the aggregation and toxicity of the protein α -synuclein associated with Parkinson's disease. In: *Nature Chem* 7 (11), S. 913–920. DOI: 10.1038/nchem.2361.

Masliah, Eliezer; Rockenstein, Edward; Adame, Anthony; Alford, Michael; Crews, Leslie; Hashimoto, Makoto et al. (2005): Effects of alpha-synuclein immunization in a mouse model of Parkinson's disease. In: *Neuron* 46 (6), S. 857–868. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.05.010.

Masliah, Eliezer; Rockenstein, Edward; Mante, Michael; Crews, Leslie; Spencer, Brian; Adame, Anthony et al. (2011): Passive immunization reduces behavioral and neuropathological deficits in an alpha-synuclein transgenic model of Lewy body disease. In: *PLOS ONE* 6 (4), e19338. DOI: 10.1371/journal.pone.0019338.

Masuda-Suzukake, Masami; Nonaka, Takashi; Hosokawa, Masato; Oikawa, Takayuki; Arai, Tetsuaki; Akiyama, Haruhiko et al. (2013): Prion-like spreading of pathological α -synuclein in brain. In: *Brain* 136 (Pt 4), S. 1128–1138. DOI: 10.1093/brain/awt037.

Mazzio, Elizabeth A.; Reams, Renee R.; Soliman, Karam F. A. (2004): The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. In: *Brain Research* 1004 (1-2), S. 29–44. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.12.034.

McNaught, K. S.; Jenner, P. (2001): Proteasomal function is impaired in substantia nigra in Parkinson's disease. In: *Neuroscience Letters* 297 (3), S. 191–194. DOI: 10.1016/S0304-3940(00)01701-8.

Miraglia, Fabiana; Ricci, Alessio; Rota, Lucia; Colla, Emanuela (2018): Subcellular localization of alpha-synuclein aggregates and their interaction with membranes. In: *Neural Regeneration Research* 13 (7), S. 1136–1144. DOI: 10.4103/1673-5374.235013.

Mitra, Soham; Chakrabarti, Nilkanta; Bhattacharyya, Arindam (2011): Differential regional expression patterns of α -synuclein, TNF- α , and IL-1 β ; and variable status of dopaminergic neurotoxicity in mouse brain after Paraquat treatment. In: *J Neuroinflammation* 8 (1), S. 163. DOI: 10.1186/1742-2094-8-163.

Moon, Stuart P.; Balana, Aaron T.; Galesic, Ana; Rakshit, Ananya; Pratt, Matthew R. (2020): Ubiquitination Can Change the Structure of the α -Synuclein Amyloid Fiber in a Site Selective Fashion. In: *The Journal of organic chemistry* 85 (3), S. 1548–1555. DOI: 10.1021/acs.joc.9b02641.

- Murray, Ian V. J.; Giasson, Benoit I.; Quinn, Shawn M.; Koppaka, Vishwanath; Axelsen, Paul H.; Ischiropoulos, Harry et al. (2003): Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. In: *Biochemistry* 42 (28), S. 8530–8540. DOI: 10.1021/bi027363r.
- Nakajo, S.; Tsukada, K.; Omata, K.; Nakamura, Y.; Nakaya, K. (1993): A new brain-specific 14-kDa protein is a phosphoprotein. Its complete amino acid sequence and evidence for phosphorylation. In: *European journal of biochemistry* 217 (3), S. 1057–1063. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb18337.x.
- Negro, Alessandro; Brunati, Anna Maria; Donella-Deana, Arianna; Massimino, Maria Lina; Pinna, Lorenzo A. (2002): Multiple phosphorylation of alpha-synuclein by protein tyrosine kinase Syk prevents eosin-induced aggregation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16 (2), S. 210–212. DOI: 10.1096/fj.01-0517fje.
- Neumann, Manuela; Müller, Veronika; Kretzschmar, Hans A.; Haass, Christian; Kahle, Philipp J. (2004): Regional distribution of proteinase K-resistant alpha-synuclein correlates with Lewy body disease stage. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 63 (12), S. 1225–1235. DOI: 10.1093/jnen/63.12.1225.
- Nielsen, M. S.; Vorum, H.; Lindersson, E.; Jensen, P. H. (2001): Ca²⁺ binding to alpha-synuclein regulates ligand binding and oligomerization. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (25), S. 22680–22684. DOI: 10.1074/jbc.M101181200.
- Nimmo, Jacqui T.; Smith, Harry; Wang, Chang Yi; Teeling, Jessica L.; Nicoll, James A. R.; Verma, Ajay et al. (2022): Immunisation with UB-312 in the Thy1SNCA mouse prevents motor performance deficits and oligomeric α -synuclein accumulation in the brain and gut. In: *Acta Neuropathol* 143 (1), S. 55–73. DOI: 10.1007/s00401-021-02381-5.
- Nonaka, Takashi; Iwatsubo, Takeshi; Hasegawa, Masato (2005): Ubiquitination of alpha-synuclein. In: *Biochemistry* 44 (1), S. 361–368. DOI: 10.1021/bi0485528.
- Okochi, M.; Walter, J.; Koyama, A.; Nakajo, S.; Baba, M.; Iwatsubo, T. et al. (2000): Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (1), S. 390–397. DOI: 10.1074/jbc.275.1.390.
- Okuda, Shinya; Uemura, Norihito; Sawamura, Masanori; Taguchi, Tomoyuki; Ikuno, Masashi; Uemura, Maiko T. et al. (2022): Rapid Induction of Dopaminergic Neuron Loss Accompanied by Lewy Body-Like Inclusions in A53T BAC-SNCA Transgenic Mice. In: *Neurotherapeutics* 19 (1), S. 289–304. DOI: 10.1007/s13311-021-01169-5.
- Oliveira, Rita Machado de; Vicente Miranda, Hugo; Francelle, Laetitia; Pinho, Raquel; Szegő, Éva M.; Martinho, Renato et al. (2017): The mechanism of sirtuin 2-mediated exacerbation of alpha-synuclein toxicity in models of Parkinson disease. In: *PLoS biology* 15 (3), e2000374. DOI: 10.1371/journal.pbio.2000374.
- Orgogozo, J-M; Gilman, S.; Dartigues, J-F; Laurent, B.; Puel, M.; Kirby, L. C. et al. (2003): Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after Abeta42 immunization. In: *Neurology* 61 (1), S. 46–54. DOI: 10.1212/01.wnl.0000073623.84147.a8.
- Ouchi, Yasuomi; Yoshikawa, Etsuji; Sekine, Yoshimoto; Futatsubashi, Masami; Kanno, Toshihiko; Ogusu, Tomomi; Torizuka, Tatsuo (2005): Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. In: *Annals of neurology* 57 (2), S. 168–175. DOI: 10.1002/ana.20338.

- Paleologou, Katerina E.; Oueslati, Abid; Shakked, Gideon; Rospigliosi, Carla C.; Kim, Hai-Young; Lamberto, Gonzalo R. et al. (2010): Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30 (9), S. 3184–3198. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5922-09.2010.
- Pan, K. M.; Baldwin, M.; Nguyen, J.; Gasset, M.; Serban, A.; Groth, D. et al. (1993): Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (23), S. 10962–10966. DOI: 10.1073/pnas.90.23.10962.
- Pardridge, William M. (2007): Blood-brain barrier delivery. In: *Drug Discovery Today* 12 (1-2), S. 54–61. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.10.013.
- Pasanen, Petra; Myllykangas, Liisa; Siitonen, Maija; Raunio, Anna; Kaakkola, Seppo; Lyytinen, Jukka et al. (2014): Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. In: *Neurobiology of aging* 35 (9), 2180.e1-5. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.024.
- Peelaerts, W.; Bousset, L.; van der Perren, A.; Moskalyuk, A.; Pulizzi, R.; Giugliano, M. et al. (2015): α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. In: *Nature* 522 (7556), S. 340–344. DOI: 10.1038/nature14547.
- Perese, D. A.; Ulman, J.; Viola, J.; Ewing, S. E.; Bankiewicz, K. S. (1989): A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. In: *Brain Research* 494 (2), S. 285–293. DOI: 10.1016/0006-8993(89)90597-0.
- Plotegher, N.; Gratton, E.; Bubacco, L. (2014): Number and Brightness analysis of alpha-synuclein oligomerization and the associated mitochondrial morphology alterations in live cells. In: *Biochimica et biophysica acta* 1840 (6), S. 2014–2024. DOI: 10.1016/j.bbagen.2014.02.013.
- Poewe, Werner; Volc, Dieter; Seppi, Klaus; Medori, Rossella; Lührs, Petra; Kutzelnigg, Alexandra et al. (2021): Safety and Tolerability of Active Immunotherapy Targeting α -Synuclein with PD03A in Patients with Early Parkinson's Disease: A Randomized, Placebo-Controlled, Phase 1 Study. In: *Journal of Parkinson's disease* 11 (3), S. 1079–1089. DOI: 10.3233/JPD-212594.
- Polymeropoulos, M. H.; Higgins, J. J.; Golbe, L. I.; Johnson, W. G.; Ide, S. E.; Di Iorio, G. et al. (1996): Mapping of a gene for Parkinson's disease to chromosome 4q21-q23. In: *Science (New York, N.Y.)* 274 (5290), S. 1197–1199. DOI: 10.1126/science.274.5290.1197.
- Polymeropoulos, M. H.; Lavedan, C.; Leroy, E.; Ide, S. E.; Dehejia, A.; Dutra, A. et al. (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. In: *Science (New York, N.Y.)* 276 (5321), S. 2045–2047. DOI: 10.1126/science.276.5321.2045.
- Pratt, Matthew R.; Abeywardana, Tharindumala; Marotta, Nicholas P. (2015): Synthetic Proteins and Peptides for the Direct Interrogation of α -Synuclein Posttranslational Modifications. In: *Biomolecules* 5 (3), S. 1210–1227. DOI: 10.3390/biom5031210.

- Pringsheim, Tamara; Jette, Nathalie; Frolkis, Alexandra; Steeves, Thomas D. L. (2014): The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. In: *Movement Disorders* 29 (13), S. 1583–1590. DOI: 10.1002/mds.25945.
- Pronin, A. N.; Morris, A. J.; Surguchov, A.; Benovic, J. L. (2000): Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (34), S. 26515–26522. DOI: 10.1074/jbc.M003542200.
- Prots, Iryna; Veber, Vanesa; Brey, Stefanie; Campioni, Silvia; Buder, Katrin; Riek, Roland et al. (2013): α -Synuclein oligomers impair neuronal microtubule-kinesin interplay. In: *Journal of Biological Chemistry* 288 (30), S. 21742–21754. DOI: 10.1074/jbc.M113.451815.
- Proukakis, Christos; Dudzik, Christopher G.; Brier, Timothy; MacKay, Donna S.; Cooper, J. Mark; Millhauser, Glenn L. et al. (2013): A novel α -synuclein missense mutation in Parkinson disease. In: *Neurology* 80 (11), S. 1062–1064. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31828727ba.
- Prusiner, S. B. (1991): Molecular biology of prion diseases. In: *Science (New York, N.Y.)* 252 (5012), S. 1515–1522. DOI: 10.1126/science.1675487.
- Przedborski, Serge; Vila, Miquel (2003): The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 991 (1), S. 189–198. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07476.x.
- Recasens, Ariadna; Dehay, Benjamin (2014): Alpha-synuclein spreading in Parkinson's disease. In: *Frontiers in neuroanatomy* 8, S. 159. DOI: 10.3389/fnana.2014.00159.
- Ren, Pei-Hsien; Lauckner, Jane E.; Kachirskaja, Ioulia; Heuser, John E.; Melki, Ronald; Kopito, Ron R. (2009): Cytoplasmic penetration and persistent infection of mammalian cells by polyglutamine aggregates. In: *Nat Cell Biol* 11 (2), S. 219–225. DOI: 10.1038/ncb1830.
- Rey, Nolwen L.; Petit, Geraldine H.; Bousset, Luc; Melki, Ronald; Brundin, Patrik (2013): Transfer of human α -synuclein from the olfactory bulb to interconnected brain regions in mice. In: *Acta Neuropathol* 126 (4), S. 555–573. DOI: 10.1007/s00401-013-1160-3.
- Rietdijk, Carmen D.; Perez-Pardo, Paula; Garszen, Johan; van Wezel, Richard J. A.; Kraneveld, Aletta D. (2017): Exploring Braak's Hypothesis of Parkinson's Disease. In: *Front. Neurol.* 8, S. 37. DOI: 10.3389/fneur.2017.00037.
- Rockenstein, Edward; Mallory, Margaret; Hashimoto, Makoto; Song, David; Shults, Clifford W.; Lang, Ingrid; Masliah, Eliezer (2002): Differential neuropathological alterations in transgenic mice expressing alpha-synuclein from the platelet-derived growth factor and Thy-1 promoters. In: *Journal of neuroscience research* 68 (5), S. 568–578. DOI: 10.1002/jnr.10231.
- Rott, Ruth; Szargel, Raymonde; Haskin, Joseph; Shani, Vered; Shainskaya, Alla; Manov, Irena et al. (2008): Monoubiquitylation of alpha-synuclein by seven in absentia homolog (SIAH) promotes its aggregation in dopaminergic cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (6), S. 3316–3328. DOI: 10.1074/jbc.M704809200.
- Rott, Ruth; Szargel, Raymonde; Shani, Vered; Hamza, Haya; Savyon, Mor; Abd Elghani, Fatimah et al. (2017): SUMOylation and ubiquitination reciprocally regulate α -synuclein degradation and pathological aggregation. In: *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America 114 (50), S. 13176–13181. DOI: 10.1073/pnas.1704351114.

Sacino, Amanda N.; Brooks, Mieu; Thomas, Michael A.; McKinney, Alex B.; Lee, Sooyeon; Regenhardt, Robert W. et al. (2014): Intramuscular injection of α -synuclein induces CNS α -synuclein pathology and a rapid-onset motor phenotype in transgenic mice. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29), S. 10732–10737. DOI: 10.1073/pnas.1321785111.

Sampathu, Deepak M.; Giasson, Benoit I.; Pawlyk, Aaron C.; Trojanowski, John Q.; Lee, Virginia M-Y (2003): Ubiquitination of alpha-synuclein is not required for formation of pathological inclusions in alpha-synucleinopathies. In: *The American Journal of Pathology* 163 (1), S. 91–100. DOI: 10.1016/s0002-9440(10)63633-4.

Sanchez-Guajardo, Vanesa; Annibali, Ambra; Jensen, Poul Henning; Romero-Ramos, Marina (2013): α -Synuclein vaccination prevents the accumulation of parkinson disease-like pathologic inclusions in striatum in association with regulatory T cell recruitment in a rat model. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72 (7), S. 624–645. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31829768d2.

Schapira, A. H. V.; Emre, M.; Jenner, P.; Poewe, W. (2009): Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. In: *European journal of neurology* 16 (9), S. 982–989. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2009.02697.x.

Schneeberger, Achim; Tierney, Lanay; Mandler, Markus (2016): Active immunization therapies for Parkinson's disease and multiple system atrophy. In: *Movement Disorders* 31 (2), S. 214–224. DOI: 10.1002/mds.26377.

Schwartz, David C.; Hochstrasser, Mark (2003): A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. In: *Trends in Biochemical Sciences* 28 (6), S. 321–328. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00113-0.

Sevcsik, Eva; Trexler, Adam J.; Dunn, Joanna M.; Rhoades, Elizabeth (2011): Allostery in a disordered protein: oxidative modifications to α -synuclein act distally to regulate membrane binding. In: *Journal of the American Chemical Society* 133 (18), S. 7152–7158. DOI: 10.1021/ja2009554.

Shavali, Shaik; Combs, Colin K.; Ebadi, Manuchair (2006): Reactive macrophages increase oxidative stress and alpha-synuclein nitration during death of dopaminergic neuronal cells in co-culture: relevance to Parkinson's disease. In: *Neurochemical research* 31 (1), S. 85–94. DOI: 10.1007/s11064-005-9233-x.

Shin, Youngah; Klucken, Jochen; Patterson, Cam; Hyman, Bradley T.; McLean, Pamela J. (2005): The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. In: *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25), S. 23727–23734. DOI: 10.1074/jbc.M503326200.

Spillantini, M. G.; Crowther, R. A.; Jakes, R.; Hasegawa, M.; Goedert, M. (1998): alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (11), S. 6469–6473. DOI: 10.1073/pnas.95.11.6469.

- Spillantini, M. G.; Goedert, M. (2000): The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 920, S. 16–27. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06900.x.
- Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. (1997): Alpha-synuclein in Lewy bodies. In: *Nature* 388 (6645), S. 839–840. DOI: 10.1038/42166.
- Sprenger, Fabienne S.; Stefanova, Nadia; Gelpi, Ellen; Seppi, Klaus; Navarro-Otano, Judith; Offner, Felix et al. (2015): Enteric nervous system α -synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder. In: *Neurology* 85 (20), S. 1761–1768. DOI: 10.1212/WNL.0000000000002126.
- Stefanova, Nadia; Reindl, Markus; Neumann, Manuela; Kahle, Philipp J.; Poewe, Werner; Wenning, Gregor K. (2007): Microglial activation mediates neurodegeneration related to oligodendroglial alpha-synucleinopathy: implications for multiple system atrophy. In: *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 22 (15), S. 2196–2203. DOI: 10.1002/mds.21671.
- Sung, J. Y.; Kim, J.; Paik, S. R.; Park, J. H.; Ahn, Y. S.; Chung, K. C. (2001): Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. In: *The Journal of Biological Chemistry* 276 (29), S. 27441–27448. DOI: 10.1074/jbc.M101318200.
- Tamgüney, Gültekin; Giles, Kurt; Bouzamondo-Bernstein, Essia; Bosque, Patrick J.; Miller, Michael W.; Safar, Jiri et al. (2006): Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. In: *Journal of virology* 80 (18), S. 9104–9114. DOI: 10.1128/JVI.00098-06.
- Tamgüney, Gültekin; Korczyn, Amos D. (2018): A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. In: *Cell Tissue Res* 373 (1), S. 213–220. DOI: 10.1007/s00441-017-2712-y.
- Tanaka, K.; Chiba, T. (1998): The proteasome: a protein-destroying machine. In: *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 3 (8), S. 499–510. DOI: 10.1046/j.1365-2443.1998.00207.x.
- Taschenberger, Grit; Garrido, Manuel; Tereshchenko, Yuliya; Bähr, Mathias; Zweckstetter, Markus; Kügler, Sebastian (2012): Aggregation of α Synuclein promotes progressive in vivo neurotoxicity in adult rat dopaminergic neurons. In: *Acta Neuropathologica* 123 (5), S. 671–683. DOI: 10.1007/s00401-011-0926-8.
- Tavassoly, Omid; Yue, Jefferey; Vocadlo, David J. (2021): Pharmacological inhibition and knockdown of O-GlcNAcase reduces cellular internalization of α -synuclein preformed fibrils. In: *The FEBS journal* 288 (2), S. 452–470. DOI: 10.1111/febs.15349.
- Tetzlaff, Julie E.; Putcha, Preeti; Outeiro, Tiago F.; Ivanov, Alexander; Berezovska, Oksana; Hyman, Bradley T.; McLean, Pamela J. (2008): CHIP targets toxic alpha-Synuclein oligomers for degradation. In: *The Journal of Biological Chemistry* 283 (26), S. 17962–17968. DOI: 10.1074/jbc.M802283200.
- Theodore, Shaji; Cao, Shuwen; McLean, Pamela J.; Standaert, David G. (2008): Targeted overexpression of human alpha-synuclein triggers microglial activation and an adaptive immune response in a mouse model of Parkinson disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67 (12), S. 1149–1158. DOI: 10.1097/NEN.0b013e31818e5e99.

Tofaris, George K.; Garcia Reitböck, Pablo; Humby, Trevor; Lambourne, Sarah L.; O'Connell, Mark; Ghetti, Bernardino et al. (2006): Pathological changes in dopaminergic nerve cells of the substantia nigra and olfactory bulb in mice transgenic for truncated human alpha-synuclein(1-120): implications for Lewy body disorders. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (15), S. 3942–3950. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4965-05.2006.

Tofaris, George K.; Razaq, Azam; Ghetti, Bernardino; Lilley, Kathryn S.; Spillantini, Maria Grazia (2003): Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. In: *The Journal of Biological Chemistry* 278 (45), S. 44405–44411. DOI: 10.1074/jbc.M308041200.

Tolosa, Eduardo; Garrido, Alicia; Scholz, Sonja W.; Poewe, Werner (2021): Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease. In: *The Lancet. Neurology* 20 (5), S. 385–397. DOI: 10.1016/S1474-4422(21)00030-2.

Tong, Junchao; Wong, Henry; Guttman, Mark; Ang, Lee C.; Forno, Lysia S.; Shimadzu, Mitsunobu et al. (2010): Brain alpha-synuclein accumulation in multiple system atrophy, Parkinson's disease and progressive supranuclear palsy: a comparative investigation. In: *Brain : a journal of neurology* 133 (Pt 1), S. 172–188. DOI: 10.1093/brain/awp282.

Tran, Hien T.; Chung, Charlotte Hiu-Yan; Iba, Michiyo; Zhang, Bin; Trojanowski, John Q.; Luk, Kelvin C.; Lee, Virginia M. Y. (2014): A-synuclein immunotherapy blocks uptake and templated propagation of misfolded α -synuclein and neurodegeneration. In: *Cell Reports* 7 (6), S. 2054–2065. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.05.033.

Tuttle, Marcus D.; Comellas, Gemma; Nieuwkoop, Andrew J.; Covell, Dustin J.; Berthold, Deborah A.; Kloepper, Kathryn D. et al. (2016): Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human α -synuclein. In: *Nature structural & molecular biology* 23 (5), S. 409–415. DOI: 10.1038/nsmb.3194.

Uéda, K.; Fukushima, H.; Masliah, E.; Xia, Y.; Iwai, A.; Yoshimoto, M. et al. (1993): Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (23), S. 11282–11286. DOI: 10.1073/pnas.90.23.11282.

Uemura, Norihito; Yagi, Hisashi; Uemura, Maiko T.; Hatanaka, Yusuke; Yamakado, Hodaka; Takahashi, Ryosuke (2018): Inoculation of α -synuclein preformed fibrils into the mouse gastrointestinal tract induces Lewy body-like aggregates in the brainstem via the vagus nerve. In: *Mol Neurodegeneration* 13 (1), S. 21. DOI: 10.1186/s13024-018-0257-5.

van den Berge, Nathalie; Ferreira, Nelson; Gram, Hjalte; Mikkelsen, Trine Werenberg; Alstrup, Aage Kristian Olsen; Casadei, Nicolas et al. (2019): Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. In: *Acta Neuropathol* 138 (4), S. 535–550. DOI: 10.1007/s00401-019-02040-w.

Visanji, Naomi P.; Brooks, Patricia L.; Hazrati, Lili-Naz; Lang, Anthony E. (2013): The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. In: *acta neuropathol commun* 1 (1), S. 2. DOI: 10.1186/2051-5960-1-2.

Volc, Dieter; Poewe, Werner; Kutzelnigg, Alexandra; Lühns, Petra; Thun-Hohenstein, Caroline; Schneeberger, Achim et al. (2020): Safety and immunogenicity of the α -synuclein active immunotherapeutic PD01A in patients with Parkinson's disease: a

- randomised, single-blinded, phase 1 trial. In: *The Lancet. Neurology* 19 (7), S. 591–600. DOI: 10.1016/S1474-4422(20)30136-8.
- Wang, Wei; Perovic, Iva; Chittuluru, Johnathan; Kaganovich, Alice; Nguyen, Linh T. T.; Liao, Jingling et al. (2011): A soluble α -synuclein construct forms a dynamic tetramer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (43), S. 17797–17802. DOI: 10.1073/pnas.1113260108.
- Wasmer, Christian; Lange, Adam; van Melckebeke, Hélène; Siemer, Ansgar B.; Riek, Roland; Meier, Beat H. (2008): Amyloid fibrils of the HET-s(218-289) prion form a beta solenoid with a triangular hydrophobic core. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5869), S. 1523–1526. DOI: 10.1126/science.1151839.
- Welchman, Rebecca L.; Gordon, Colin; Mayer, R. John (2005): Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (8), S. 599–609. DOI: 10.1038/nrm1700.
- Wilms, H.; Rosenstiel, P.; Romero-Ramos, M.; Arlt, A.; Schäfer, H.; Seegert, D. et al. (2009): Suppression of MAP kinases inhibits microglial activation and attenuates neuronal cell death induced by alpha-synuclein protofibrils. In: *International journal of immunopathology and pharmacology* 22 (4), S. 897–909. DOI: 10.1177/039463200902200405.
- Winner, Beate; Jappelli, Roberto; Maji, Samir K.; Desplats, Paula A.; Boyer, Leah; Aigner, Stefan et al. (2011): In vivo demonstration that α -synuclein oligomers are toxic. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (10), S. 4194–4199. DOI: 10.1073/pnas.1100976108.
- Wu, D. C.; Jackson-Lewis, Vernice; Vila, Miquel; Tieu, Kim; Teismann, Peter; Vadseth, Caryn et al. (2002): Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22 (5), S. 1763–1771. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-05-01763.2002.
- Young, B. K.; Camicioli, R.; Ganzini, L. (1997): Neuropsychiatric adverse effects of antiparkinsonian drugs. Characteristics, evaluation and treatment. In: *Drugs & aging* 10 (5), S. 367–383. DOI: 10.2165/00002512-199710050-00005.
- Yu, Zhongwang; Xu, Xiaohui; Xiang, Zhenghua; Zhou, Jianfeng; Zhang, Zhaohuan; Hu, Chun; He, Cheng (2010): Nitrated alpha-synuclein induces the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of rats. In: *PLOS ONE* 5 (4), e9956. DOI: 10.1371/journal.pone.0009956.
- Yuzwa, Scott A.; Macauley, Matthew S.; Heinonen, Julia E.; Shan, Xiaoyang; Dennis, Rebecca J.; He, Yuan et al. (2008): A potent mechanism-inspired O-GlcNAcase inhibitor that blocks phosphorylation of tau in vivo. In: *Nat Chem Biol* 4 (8), S. 483–490. DOI: 10.1038/nchembio.96.
- Yuzwa, Scott A.; Shan, Xiaoyang; Macauley, Matthew S.; Clark, Thomas; Skorobogatko, Yuliya; Vosseller, Keith; Vocadlo, David J. (2012): Increasing O-GlcNAc slows neurodegeneration and stabilizes tau against aggregation. In: *Nature chemical biology* 8 (4), S. 393–399. DOI: 10.1038/nchembio.797.

Zarranz, Juan J.; Alegre, Javier; Gómez-Esteban, Juan C.; Lezcano, Elena; Ros, Raquel; Ampuero, Israel et al. (2004): The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. In: *Annals of neurology* 55 (2), S. 164–173. DOI: 10.1002/ana.10795.

Zhang, Wei; Wang, Tongguang; Pei, Zhong; Miller, David S.; Wu, Xuefei; Block, Michelle L. et al. (2005): Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (6), S. 533–542. DOI: 10.1096/fj.04-2751com.

Zhao, Kun; Lim, Yeh-Jun; Liu, Zhenying; Long, Houfang; Sun, Yunpeng; Hu, Jin-Jian et al. (2020): Parkinson's disease-related phosphorylation at Tyr39 rearranges α -synuclein amyloid fibril structure revealed by cryo-EM. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (33), S. 20305–20315. DOI: 10.1073/pnas.1922741117.

8. Anhang

Teile dieser Dissertation wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

Titel: Vaccination with structurally modified fungal proteins induces immunity to Parkinson's disease

Autoren: Verena Pesch, José Miguel Flores-Fernandez, Sara Reithofer, Liang Ma, Pelin Özdüzenciler, Yannick Busch, Aishwarya Sriraman, YongLiang Wang, Sara Amidian, Chiara V. M. Kroepel, Yi Lien, Olivia Rudtke, Benedikt Frieg, Gunnar F. Schröder, Holger Wille, Gültekin Tamgüney