

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
(Prof. Dr. S. O. Rizzoli)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

***Nanobody*-basierter Sensor für die Zell-
zu-Zell-Übertragung von α -Synuclein bei
Morbus Parkinson**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christoph Gerdes

aus
Rheine

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. S. O. Rizzoli

Ko-Betreuer: Prof. Dr. P. Lingor

Prüfungskommission

Referent: Prof. Dr. S. O. Rizzoli

Ko-Referent: Prof. Dr. T. F. Outeiro

Drittreferent: Prof. Dr. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 25.05.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "*Nanobody*-basierter Sensor für die Zell-zu-Zell-Übertragung von α -Synuclein bei Morbus Parkinson" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 02. Juni 2020

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Gerdes C, Waal N, Offner T, Fornasiero EF, Wender N, Verbarg H, Manzini I, Trenkwalder C, Mollenhauer B, Strohäker T, Zweckstetter M, Becker S, Rizzoli SO, Basmanav FB, Opazo F (2020): A nanobody-based fluorescent reporter reveals human α -synuclein in the cell cytosol. *Nat Commun* 11, 2729

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1 Einleitung	1
1.1 Einführung zum Thema Morbus Parkinson	1
1.2 Überblick über Morbus Parkinson	1
1.2.1 Definition.....	1
1.2.2 Pathophysiologie von Morbus Parkinson	2
1.2.3 Epidemiologie von Morbus Parkinson	3
1.2.4 Diagnostik und Therapie von Morbus Parkinson.....	4
1.3 Aktueller Wissensstand mit besonderem Blick auf α -Synuclein	5
1.3.1 Physiologische Rolle von α -Synuclein.....	5
1.3.2 Pathophysiologische Rolle von α -Synuclein bei Morbus Parkinson	6
1.3.3 Zell-zu-Zell-Übertragung von α -Synuclein	9
1.4 <i>Nanobody</i> -basierter Sensor für die zytosolische Detektion von α -Synuclein	12
1.4.1 <i>Nanobodies</i>	12
1.4.2 Aufbau des Sensors.....	12
1.4.3 Sensor in Zellen	12
1.4.4 Theorie und Hypothese über die Funktionsweise der Sensorzellen	13
1.5 Entwicklung des Forschungsthemas	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Hersteller	15
2.2 Antikörper	19
2.3 Proteine.....	19
2.4 Plasmide.....	20
2.5 Puffer und Lösungen.....	20
2.6 Untersuchungen an der Zellkultur.....	22
2.6.1 HEK293-mCherry-T2a-NbSyn87-Zellen (Sensorzellen)	23
2.6.2 HEK293-Zellen	23
2.6.3 HEK293-i- α Syn-Zellen (α Syn-Zellen)	23
2.6.4 Poly-L-Lysin-Platten	23
2.6.5 Zellaussaat	23
2.6.6 Transfektion	23
2.6.7 MG 132-Gabe.....	24
2.6.8 Sensitivität der Sensorzellen.....	24
2.6.9 Spezifität der Sensorzellen	24
2.6.10 Proteingabe.....	24
2.6.11 Mediumtransfer.....	25
2.6.12 Kokultur mit transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen.....	25

2.6.13	Zellfusion.....	26
2.6.14	Fixieren.....	28
2.6.15	Immunfluoreszenzfärbung.....	28
2.6.16	Höchst 33342-Färbung.....	28
2.6.17	Montieren der Zellen auf Objektträgern	28
2.7	Untersuchungen am Liquor.....	28
2.7.1	Patienten	28
2.7.2	Liquorproben	33
2.7.3	Liquorgabe.....	34
2.8	Biochemische Methoden.....	34
2.8.1	Agarosegelelektrophorese	34
2.8.2	<i>Dot Blot</i>	34
2.8.3	Dissoziationskonstanten (K_d)-Bestimmung.....	34
2.8.4	Zellysat	35
2.8.5	<i>Bicinchoninic acid assay</i> (BCA)	35
2.8.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.8.7	<i>Western Blot</i>	36
2.8.8	Proteinaufreinigung.....	36
2.9	Molekularbiologische Methoden.....	37
2.9.1	Plasmide	37
2.9.2	Plasmidklonierung.....	37
2.10	Bildgebung.....	38
2.10.1	Epifluoreszenzmikroskopische Bildgebung.....	38
2.10.2	Konfokalmikroskopische Bildgebung.....	39
2.10.3	Automatische Bildgebung mittels Biotek Cytation 3 Imaging Reader.....	39
2.10.4	Bildgebung mit dem Amersham Imager 600.....	39
2.11	Bildanalyse	39
2.12	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Nachvollziehung der Vorarbeiten im Labor.....	41
3.2	Charakterisierung des <i>Nanobodies</i> NbSyn87.....	42
3.2.1	Bindungsnachweis an α -Synuclein und Rpn10 mittels <i>Dot Blot</i>	42
3.2.2	Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d	44
3.3	Charakterisierung der Sensorzellen.....	46
3.3.1	Proteasominhibition mittels MG 132-Gabe in verschiedenen Konzentrationen	47
3.3.2	Proteasominhibition mittels MG 132-Gabe über unterschiedliche Dauer	48
3.3.3	Sensitivität des Sensors.....	49
3.3.4	Biochemischer Nachweis des Sensors mittels <i>Western Blot</i>	50
3.3.5	Spezifität der Sensorzellen	55
3.4	Übertragung von α -Synuclein.....	58
3.4.1	Nachweis einer Aufnahme von (-30)GFP in Zellen.....	58
3.4.2	Nachweis einer Aufnahme von α -Synuclein in Zellen	59
3.5	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen.....	61

3.5.1	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Kokultur.....	61
3.5.2	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Mediumtransfer ohne Mediumwechsel	61
3.5.3	Bestätigung der Wirksamkeit von DNase mittels Gelelektrophorese	61
3.5.4	Exkurs: Überprüfung einer Plasmidübertragung beim Mediumtransfer mithilfe von <i>pTOM70-EGFP</i>	64
3.5.5	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Mediumtransfer mit Mediumwechsel	67
3.6	Exkurs: Plasmidübertragung zwischen Zellen in einer Kokultur.....	68
3.6.1	Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Mediumwechsel und PBS-Waschung.....	69
3.6.2	Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Mediumwechsel, PBS- Waschung und DMSO- oder Ethanol- Gabe.....	71
3.6.3	Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Trypsinisierung sowie mit Trypsinierung und Ethanolgabe.....	73
3.7	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Kokultur aus α -Synuclein-Zellen und Sensorzellen.....	76
3.8	Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Zellfusion von α -Synuclein-Zellen und Sensorzellen.....	78
3.9	Überprüfung von Liquor auf α -Synuclein	79
4	Diskussion.....	83
4.1	Methodenkritik und Limitierungen der Studie	83
4.2	Funktionsweise des <i>Nanobody</i> -basierten Sensors	83
4.2.1	Der Sensor wird in Abwesenheit von α -Synuclein über das Proteasom abgebaut.....	84
4.2.2	Der Sensor wird in Zellen durch α -Synuclein stabilisiert.....	85
4.2.3	Der Sensor weist α -Synuclein ab ca. 120 fg im Zytosol nach	86
4.2.4	Der Sensor ist spezifisch für humanes α -Synuclein	87
4.2.5	Senzorzellfunktionsweise.....	88
4.3	Übertragung von α -Synuclein.....	90
4.3.1	α -Synuclein wird <i>in vitro</i> bevorzugt mit einer lipidhaltigen Hülle ins Zytosol von Zellen aufgenommen	91
4.3.2	Keine Übertragung von α -Synuclein über das Medium von Zellen.....	93
4.3.3	Exkurs: Plasmidübertragung in Kokulturen	94
4.3.4	Keine Übertragung von α -Synuclein in Kokulturen von Zellen.....	96
4.3.5	Übertragung von α -Synuclein durch Liquor	98
4.4	Ausblick.....	102
5	Zusammenfassung.....	103
6	Anhang	104
6.1	Matlab Script für die Analyse von mit Olympus IX71 erstellten Bildern	104
6.2	Matlab Script für die Auswertung von mit Cytation erstellten Bildern	107
7	Literaturverzeichnis	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Folgen einer Degeneration der <i>Substantia nigra pars compacta</i> in Bezug auf die Basalganglien.....	3
Abbildung 2: Hypothese über die Funktionsweise des <i>Nanobody</i> -basierten Sensors für α Syn.....	13
Abbildung 3: Beispiel einer Albumin-Standardkurve für ein BCA.	35
Abbildung 4: Sensorzellen mit und ohne humanem α Syn.....	42
Abbildung 5: Abschnitt der Aminosäuresequenz von humanem α Syn und der humanen proteasomalen Untereinheit Rpn10.....	42
Abbildung 6: <i>Dot Blot</i>	44
Abbildung 7: NbSyn87 bindet α Syn mit einer K_d von 13,9 nM und bindet Rpn10.....	46
Abbildung 8: MG 132-Gabe in verschiedenen Konzentrationen.	48
Abbildung 9: MG 132-Gabe über unterschiedliche Dauer.....	49
Abbildung 10: Sensitivität des Sensors.....	50
Abbildung 11: <i>Western Blot</i> des Sensors.....	51
Abbildung 12: <i>Western Blot</i> α Syn.....	52
Abbildung 13: Abschnitt der Aminosäuresequenz von humanem, Ratten- α Syn und humanem β -Syn sowie Maus (<i>Mus musculus</i>)- α Syn.....	56
Abbildung 14: Spezifität des Sensors.	57
Abbildung 15: Proteingabe (-30)GFP.	59
Abbildung 16: Proteinaufnahme in Sensorzellen.	60
Abbildung 17: α Syn-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen.....	63
Abbildung 18: Mediumtransfer ohne Mediumwechsel mit <i>pTom70-EGFP</i>	65
Abbildung 19: Mediumtransfer mit Mediumwechsel mit <i>pTom70-EGFP</i> transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen).....	67
Abbildung 20: α Syn-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen: Mediumtransfer 48 h nach Mediumwechsel.....	68
Abbildung 21: Zellverbindung.....	69
Abbildung 22: Kokultur zwischen mit <i>pTOM70-EGP</i> transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen).	70
Abbildung 23: Kokulturen zwischen getöteten, mit <i>pTOM70-EGP</i> transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen).	72
Abbildung 24: Spenderzellen.	73
Abbildung 25: Kokulturen zwischen mit <i>pTOM70-EGP</i> transfizierten und anschließend trypsinisierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) sowie Empfängerzellen (Sensorzellen).	75
Abbildung 26: Kokultur aus α Syn-Zellen und Sensorzellen.....	77
Abbildung 27: Zellfusion von α Syn-Zellen und Sensorzellen.....	79
Abbildung 28: Überprüfung von Liquor auf α Syn.....	81
Abbildung 29: Überprüfung von Liquor auf α Syn in Verbindung mit der Familienanamnese.	82
Abbildung 30: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Sensorzellen und repräsentative konfokale Bilder.	90

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der Hersteller.....	15
Tabelle 2: Chemikalien.....	16
Tabelle 3: Antikörper.....	19
Tabelle 4: Proteine.....	20
Tabelle 5: Plasmide.....	20
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 7: Media, Puffer und Lösungen für die Zellkultur.....	22
Tabelle 8: Schema Zellfusionsplatte.....	28
Tabelle 9: Morbus-Parkinson-Patienten.....	29
Tabelle 10: Patienten mit Lewy-Körper-Demenz oder Multisystematrophie.....	31
Tabelle 11: Neurologische Kontrollen.....	32
Tabelle 12: Filterwürfel für Epifluoreszenzbildgebung.....	38
Tabelle 13: Objektive für Epifluoreszenzbildgebung.....	38
Tabelle 14: Laser, Beamsplitter und Filter für konfokale Mikroskopie.....	39
Tabelle 15: Berechnung der α Syn-Menge im Zellysat.....	52
Tabelle 16: Bedeutung und genaue Bestimmung der Variablen.....	53
Tabelle 17: Vorhandene Menge an α Syn in einer einzelnen Zelle.....	55

Abkürzungsverzeichnis

α Syn	α -Synuclein
α Syn-Zellen	HEK293-i- α Syn-Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bichinbionic assay</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
β Syn	β -Synuclein
CBD	Kortikobasale Degeneration
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
d	<i>Dies</i> (Tag)
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	<i>DNase I grade II</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>et al.</i>	<i>Et alii</i> (und andere)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FTD	Frontotemporale Demenz
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	<i>Hora</i> (Stunde)
HA	Hämagglutinin
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HVJ-E	<i>Hemagglutinating Virus of Japan-envelope</i>

LB	<i>Lysogeny Broth</i>
min	Minute
MMSE	<i>Mini-Mental State Examination</i>
MP	Morbus Parkinson (auch: Idiopathisches Parkinson-Syndrom oder Parkinson-Krankheit)
NAC	<i>Non-amyloid-β component</i>
NPH	<i>Normal Pressure Hydrocephalus</i> (Normaldruckhydrozephalus)
Opti-MEM	<i>Opti-MEM I Reduced Serum Medium</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PNP	Polyneuropathie
PSP	<i>Progressive Supranuclear Palsy</i> (Progressive Supranukleäre Blickparese)
RLS	<i>Restless-Legs-Syndrom</i>
RNAimax	<i>Lipofectamine RNAimax Transfection Reagent</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardfehler des Mittelwertes)
Sensorzellen	HEK293-mCherry-T2a-NbSyn87-Zellen
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SUMO-Protease	<i>Small ubiquitin-related modifier-protease</i>
TOM	<i>Translocase of the outer membrane</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UPDRS	<i>Unified Parkinson`s Disease Rating Scale</i>

1 Einleitung

1.1 Hinführung zum Thema Morbus Parkinson

Millionen Menschen sind weltweit an Morbus Parkinson (MP) erkrankt, darunter berühmte Persönlichkeiten wie Papst Johannes Paul II, Muhammad Ali oder Michael J. Fox, die jahrelang an der Krankheit MP litten bzw. leiden und mit dieser an die Öffentlichkeit traten. Fast jeder hat einen Bekannten¹, der an MP erkrankt ist. Das besonders Eindrückliche dieser Krankheit liegt darin, dass die Erkrankten oft lange Zeit mit ihr kämpfen und leben müssen und es eine stetige Progression gibt. Diese beiden Punkte, die Häufigkeit der Erkrankung und der hohe Leidensdruck durch das Fortschreiten dieser, die ich persönlich im Patientenkontakt kennenlernte, haben dazu geführt, dass ich mich genauer mit diesem Thema beschäftigen und einen Beitrag zu umfassenderem Wissen und Verständnis der Krankheit leisten wollte.

1.2 Überblick über Morbus Parkinson

1.2.1 Definition

Vor inzwischen mehr als 200 Jahren verfasste der englische Arzt James Parkinson im Jahre 1817 als Erster einen systematischen Aufsatz (Goetz 2011) über Symptome der *Paralysis agitans* mit dem Titel „*An Essay on the Shaking Palsy*“ (Parkinson 1817). Hierin schilderte er Symptome des später nach ihm benannten Parkinson-Syndroms.

Allen Parkinson-Syndromen gemeinsam ist das Vorhandensein einer Akinese sowie mindestens eines weiteren Kardinalsymptoms und zwar entweder Rigor, Ruhetremor oder posturale Instabilität. Parkinson-Syndrome können je nach ihrer Ursache in vier Gruppen eingeteilt werden: Erstens in MP (auch Idiopathisches Parkinson-Syndrom oder Parkinson-Krankheit; 75% aller Parkinson-Syndrome), zweitens in genetische Formen (ca. 5-10% aller Parkinson-Syndrome (Lesage und Brice 2009)), drittens in Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (auch atypische Parkinson-Syndrome) und viertens in symptomatische sekundäre Parkinson-Syndrome, bei welchen die Parkinson-Symptomatik u. a. durch Toxine oder metabolische Erkrankungen hervorgerufen wird, z. B. Morbus Wilson (Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016). Die genetischen Formen werden durch verschiedene Genmutationen verursacht, bei welchen viele im für α -Synuclein (α Syn) kodierenden SNCA-Gen liegen. Bei atypischen Parkinson-Syndromen bestehen früh auftretende andere Symptome neben der typischen Parkinsonsymptomatik,

¹ In der vorliegenden Arbeit wird aufgrund der einfacheren Lesbarkeit stets nur die männliche Form verwendet, es sei denn, der Sinnzusammenhang bezieht sich explizit auf das weibliche Geschlecht.

z. B. Lewy-Körper-Demenz (Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016). Das häufigste Parkinson-Syndrom ist MP, welches ca. 75% aller Parkinson-Syndrome ausmacht. Im Folgenden konzentriert sich der Autor auf MP.

Im Gegensatz zu anderen Parkinson-Syndromen machen bei MP v. a. die motorischen Störungen die Krankheit aus. Zusätzlich zu diesen motorischen Symptomen gibt es oft eine Anzahl von sensorischen (z. B. Geruchsstörungen), vegetativen (z. B. Verdauungsstörungen), psychischen (z. B. Depressionen) oder kognitiven Begleitsymptomen (z. B. Demenz im Krankheitsverlauf bei mehr als 40% der Erkrankten (Aarsland *et al.* 2003; Hely *et al.* 2008)).

1.2.2 Pathophysiologie von Morbus Parkinson

MP beruht auf einer Degeneration von Neuronen, wobei insbesondere die dopaminergen Neurone in der *Substantia nigra pars compacta* betroffen sind. Hieraus resultieren v. a. die motorischen Symptome. Eine Degeneration derselben führt letztendlich zu einer verstärkten Inhibierung des Thalamus (Abbildung 1) und darüber zu einer geringeren Aktivität des motorischen Kortex. Dabei gibt es zwei pathophysiologische Wege: Beim indirekten Weg führt die Degeneration über eine verringerte Hemmung (mittels D2-Rezeptoren) des Striatums zu einer stärkeren Hemmung des *Globus pallidus externus*, was zu einer verringerten Hemmung des *Nucleus subthalamicus* führt. Dieser stimuliert daraufhin den *Globus pallidus internus* und die *Substantia nigra pars reticulata* stärker, was in einer verstärkten Inhibierung des Thalamus resultiert. Beim direkten Weg führt die Degeneration zu einer verringerten Erregung (mittels D1-Rezeptoren) des Striatums und darüber zu einer verringerten Inhibierung des *Globus pallidus internus* und der *Substantia nigra pars reticulata*, was ebenfalls in einer verstärkten Inhibierung des Thalamus resultiert.

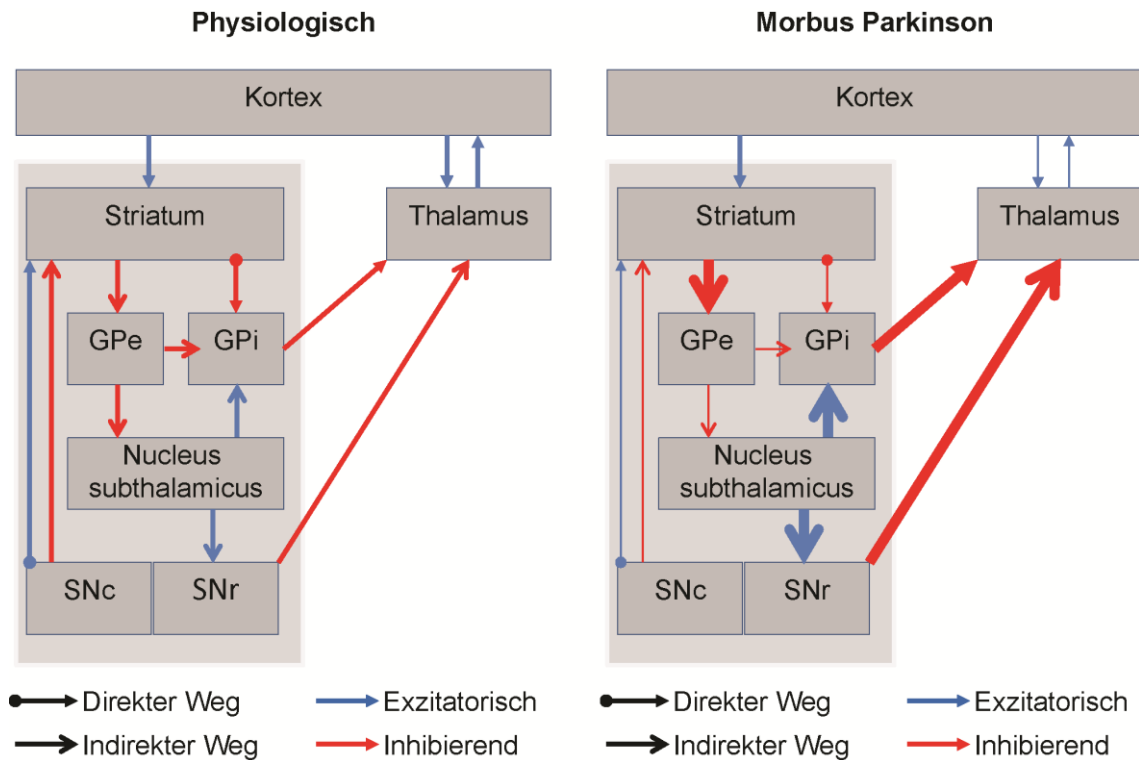


Abbildung 1: Pathophysiologische Folgen einer Degeneration der *Substantia nigra pars compacta* in Bezug auf die Basalganglien. Links ist die physiologische Verschaltung dargestellt. Rechts sind bei MP pathologisch verstärkte (durch dicke Pfeile gekennzeichnet) oder verminderte (durch dünne Pfeile gekennzeichnet) Verschaltungen dargestellt. GPe: *Globus pallidus externus*. GPi: *Globus pallidus internus*. SNc: *Substantia nigra pars compacta*. SNr: *Substantia nigra pars reticulata*.

Auch andere Hirnregionen sind betroffen, welche weitere klinische Symptome hervorrufen können. Das pathohistologische Korrelat von MP sind die sogenannten Lewy-Körper (Lewy 1912), welche eine sehr sichere Diagnose von MP erlauben – jedoch nur *post mortem*. In diesen Proteinaggregaten findet sich v. a. das Protein α -Synuclein (α Syn) (Spillantini *et al.* 1997).

1.2.3 Epidemiologie von Morbus Parkinson

Laut EUROPARKIN-Studie kommt MP bei 65-69-Jährigen mit einer Prävalenz von 0,6%, im Alter von 85-89 Jahren mit 3,5% vor (de Rijk *et al.* 1997). Somit ist das Alter entscheidend für das Auftreten der Krankheit. Als Ätiologie wird ein Zusammenwirken aus prädisponierender Genetik und darauf einwirkenden Umweltfaktoren angenommen. Neben dem Alter wurden in einer großen Metaanalyse verschiedene Risikofaktoren für MP ermittelt (Noyce *et al.* 2012). Dies sind (von hoher *Odds Ratio* zu niedriger) positive Familienanamnese für MP, für MP bei erstgradig Verwandten und für Tremor. Des Weiteren wird das Risiko durch Obstipation, affektive Störungen, Pestizidexposition, Kopfverletzungen, Leben in ländlichen Gebieten, β -Blocker-Einnahme, einen Beruf im landwirtschaftlichen Sektor (vermutlich aufgrund der Pestizidexposition) und das Trinken von Brunnenwasser erhöht.

Eine Senkung des Risikos wurde für Rauchen, Kaffee, Hypertonus, Einnahme von Nichtsteroidalen Antirheumatika und Ca^{2+} -Kanalblockern sowie Alkohol festgestellt. Ob Rauchen dabei vor MP schützt oder aber MP-Patienten seltener Rauchen, weil sie einen geringeren Nikotin-Effekt verspüren, wird derzeit noch diskutiert (Ritz *et al.* 2014).

Aktuell wird die Zahl an MP-Erkrankten in Deutschland auf 219.579, europaweit sogar auf 1.249.312 geschätzt, wobei sie aufgrund des demografischen Wandels in Zukunft vermutlich weiter zunehmen wird (Gustavsson *et al.* 2011). MP ist somit nach Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit (Dorsey *et al.* 2007; Alzheimer's Association 2016).

Studien zu der Lebenserwartung und dem Überleben von MP-Patienten zeigen sehr unterschiedliche Ergebnisse. So zeigte die DATATOP-Kohorte (Marras *et al.* 2005) keinen Gesamtüberlebensunterschied zwischen MP- und gesunden Kontrollpatienten. Andere berichten wiederum über eine deutlich verringerte Lebenserwartung für MP-Patienten je nach Beginn der Krankheit, so für über 65-Jährige eine Verkürzung von neun auf fünf Jahre verbliebene Lebenserwartung (Ishihara *et al.* 2007). Gründe für eine verkürzte Lebenserwartung könnten vielfältig sein, z. B. erhöhte Sturzgefahr (Nystrom *et al.* 2016) oder häufigere Pneumonien.

1.2.4 Diagnostik und Therapie von Morbus Parkinson

Die Diagnose am Lebenden wird klinisch gestellt, da es für MP keinen definitiven Test, z. B. Labortest, gibt. Die sicherste Diagnosestellung findet daher klinisch statt, wobei eine laufende Verlaufsbeobachtung die richtige Diagnosestellung erhöht, in einer Studie bei Bewegungsstörungsspezialisten von 79,6% auf 83,9% (Rizzo *et al.* 2016). Hierfür werden häufig die *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Clinical Diagnostic Criteria* genutzt (Gibb und Lees 1988) bzw. die *Movement Disorder Society Clinical Diagnostic Criteria for Parkinson's disease* (Postuma *et al.* 2015). Die Progredienz der Krankheit hängt mit ihrer Dauer zusammen und kann klinisch in Stadien nach Hoehn und Yahr (Hoehn und Yahr 1967) oder nach der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale* (UPDRS) (Fahn *et al.* 1987) und pathologisch nach Braak (Braak *et al.* 2003) eingeteilt werden.

Die Therapie wurde in den 1960ern mit der Entdeckung des Medikamentes L-Dopa entscheidend verbessert (Barbeau A 1962; Birkmayer und Hornykiewicz 1961; Cotzias *et al.* 1967). Neben diesem gibt es zahlreiche andere Medikamente, z. B. MAO-B-Hemmer, die allerdings wie L-Dopa rein symptomatisch wirken und die Krankheit nicht ursächlich behandeln können. Die Symptome werden aber gemildert und deren Eintritt herausgezögert.²

² Für ausführlichere Darstellungen der allgemeinen Symptome, Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie etc. sei auf Lehrbücher und Sammelwerke (Goetz *et al.* 2005; Leplow 2007; Lingor *et al.* 2011; Steinmetz und Sitzer 2011; Klinker *et al.* 2014) und die Leitlinie (Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016) verwiesen.

1.3 Aktueller Wissensstand mit besonderem Blick auf α -Synuclein

1.3.1 Physiologische Rolle von α -Synuclein

α Syn gehört neben β - und γ -Synuclein zur Synuclein-Familie und ist ein aus 140 Aminosäuren bestehendes wasserlösliches, ungefaltetes Protein (Wales *et al.* 2013), welches aus drei Domänen aufgebaut ist. Es besteht aus einer N-Terminus-Region (Aminosäuren 1-60), die vier (KTKEGV)-Repetitionen aufweist und lipidbindende Eigenschaften besitzt, aus der hydrophoben, amyloidogenen NAC-Domäne (*non-amyloid- β component*; Aminosäuren 61-95) und aus dem stark negativ geladenen C-Terminus (Aminosäuren 96-140).

α Syn ist ein bei Isolation intrinsisch ungeordnetes Protein von ca. 14 kDa (Weinreb *et al.* 1996). Dieses weithin akzeptierte Konzept wurde vor kurzer Zeit in Frage gestellt. So berichteten Bartels *et al.* über eine physiologisch hauptsächlich vorkommende helixreiche Tetramer-Struktur von ca. 58 kDa, die nicht neurotoxisch ist und nicht aggregiert. Sie fanden eine nicht-denaturierte α Syn-Form von 45-50 kDa Größe in verschiedenen Zelllinien sowie im Frontalkortex von Mäusen unter natürlichen Bedingungen durch eine *Clear Native* PAGE (Polyacrylamid-Gelelektrophorese), die durch weitere Methoden bestätigt wurde. Sie erklären die Differenz zwischen ihren Funden und den vorherigen durch den Einsatz von denaturierenden Detergenzien bei den bisherigen Studien (Bartels *et al.* 2011). Burré *et al.* fanden zwar auch ein potentiell Tetramer von ca. 63 kDa in der PAGE, zeigen durch weitere Untersuchungen jedoch, dass dieses weniger als fünf Prozent des physiologischen α Syn ausmacht (Burré *et al.* 2013). Diese Diskussion bleibt offen, jedoch gibt es weitere Hinweise dafür, dass α Syn physiologisch sicherweise ungefaltet vorkommt (Fauvet *et al.* 2012). Durch Einschleusung von ^{15}N -Isotopen in α Syn in Säugetierzellen in Verbindung mit *nuclear magnetic resonance* und *electron paramagnetic resonance* konnte gezeigt werden, dass α Syn auch in Zellen größtenteils ungeordnet vorliegt mit einer Abschirmung der NAC-Region, was vermutlich einer spontanen Aggregation vorbeugt (Theillet *et al.* 2016). In Zellen liegt α Syn etwas kompakter als in Puffern vor, jedoch kommt es selbst bei α Syn-Konzentrationen von 50 μM zu keiner Oligomerisierung.

Bei Membranbindung, welche durch den N-Terminus vermittelt wird, nimmt α Syn eine α -helikale Form aus 5 Helices an (Bartels *et al.* 2010). Dabei gibt es je nach Vesikelgröße einerseits die *extended α -helix*- oder die *broken-helix*-Form (Alderson und Markley 2013). Durch diese Formänderungen kann α Syn Membrankrümmungen sowohl wahrnehmen als auch veranlassen (Varkey *et al.* 2010; Pranke *et al.* 2011; Westphal und Chandra 2013). Da α Syn zwar über das gesamte Gehirn verteilt vorkommt, aber v. a. mit Synapsen assoziiert ist (Iwai *et al.* 1995) und dort in Konzentrationen von ca. 22 μM vorliegt (Wilhelm *et al.* 2014), wird durch diese Ergebnisse eine Rolle von α Syn bei der Vesikelendozytose und -exozytose impliziert, bei denen Membrankrümmung eine wichtige Rolle spielt. Einhergehend mit diesen Ergebnissen konnte eine Vielzahl an Einflüssen auf die Vesikelfunktion nachgewiesen werden (Lautenschläger *et al.* 2018), so auf die Regulierung der Vesikelendozytose (Ben Gedalya *et al.* 2009), des Vesikelpools (Cabin *et al.* 2002), der Vesikelmobilisierung (Nemani

et al. 2010) und der intersynaptischen Vesikelübertragung (Scott und Roy 2012) nachgewiesen werden.

Insbesondere gibt es vermehrt Hinweise darauf, dass α Syn eine wichtige Rolle in der Exozytose spielt. So scheint α Syn die SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-Komplex-Gruppierung *in vitro* und *in vivo* zu unterstützen, indem es mittels C-Terminus an Synaptobrevin-2 bindet (Burré *et al.* 2010; Burré *et al.* 2012). Unterschiedliche Beeinträchtigungen der SNARE-Komplex-Gruppierung konnten durch α Syn rückgängig gemacht werden. Diese Ergebnisse werden jedoch derzeit diskutiert, da monomeres, natives α Syn die Vesikelfusion in mehreren Studien nur durch Veränderung der Lipiddoppelschicht beeinträchtigte und nicht durch Interaktion mit dem SNARE-Komplex (Darios *et al.* 2010; DeWitt und Rhoades 2013). Allerdings wurde ein gleichzeitiger Einfluss von α Syn sowohl auf Lipide als auch SNARE-Proteine, nämlich Synaptobrevin-2/VAMP2, beschrieben (Diao *et al.* 2013), sodass α Syn Vesikel in die Nähe der aktiven Zone bringen könnte. Dass α Syn an der SNARE-Komplex-Gruppierung beteiligt ist, wurde auch durch Versuche an CSP α -*Knockout*-Mäusen unterstützt. CSP α -*Knockout*-Mäuse zeigten erniedrigte Level an SNAP-25 und eingeschränkte SNARE-Komplex-Gruppierung, was für SNARE-bedingte Neurodegeneration durch Anreicherung von SNARE-Proteinen sprechen könnte (Sharma *et al.* 2012). α Syn kann diese SNARE-Komplex-Gruppierung wiederherstellen und verhinderte die Neurodegeneration (Chandra *et al.* 2005).

Somit scheint α Syn physiologischerweise in den Vesikelkreislauf vor allem während der Exozytose einzugreifen.

1.3.2 Pathophysiologische Rolle von α -Synuclein bei Morbus Parkinson

1.3.2.1 Genetik

Molekular gehört MP neben der Lewy-Körper-Demenz, der Multisystematrophie und weiteren selteneren Krankheiten zu den Synucleinopathien. Diesen gemein ist das Vorkommen von Lewy-Körpern. Im Gehirn von MP-Patienten finden sich Lewy-Körper, in welchen wiederum das Protein α Syn als Hauptbestandteil identifiziert wurde (Spillantini *et al.* 1997). Zuvor wurde die A53T-Mutation im SNCA-Gen gefunden, welche autosomal-dominant vererbten Parkinson auslöst (Polymeropoulos *et al.* 1997) und in einer italienischen Familie sowie drei griechischen Familien nachgewiesen wurde. Neben dieser Mutation wurden inzwischen viele weitere gefunden, sowohl *missense*-Mutationen (Krüger *et al.* 1998; Zarranz *et al.* 2004; Lesage *et al.* 2013; Appel-Cresswell *et al.* 2013; Pasanen *et al.* 2014; Yoshino *et al.* 2017), die teilweise zu einer schnelleren Bildung von Oligomeren führen (Conway *et al.* 2000) und zahlreiche andere Effekte haben könnten (Lazaro *et al.* 2014), als auch Triplikationen (Singleton *et al.* 2003) und Duplikationen (Chartier-Harlin *et al.* 2004) des SCNA-Gens. Während Duplikationen zu einem typischen *late-onset* Parkinson führen, verursachen Triplikationen ein früheres und schwereres Auftreten der Symptomatik (Chartier-Harlin *et al.* 2004; Ibáñez *et al.* 2004). Dies spricht – außerhalb dieser eher seltenen Fäl-

len von spezifischen Mutationen – auch für einen Zusammenhang zwischen α Syn-Menge und Entstehung von Parkinson beim idiopathischen MP. Diese Beobachtung wird dadurch unterstützt, dass schon kleine Erhöhungen der α Syn-Konzentration in Synapsen die Neurotransmitterfreisetzung durch Verringerung der Vesikeldichte und Veränderung des Vesikelclusterings nach Endozytose hemmen (Nemani *et al.* 2010). Durch genomweite Assoziationsstudien konnte außerdem gezeigt werden, dass polymorphe Varianten im SNCA-Gen einen Risikofaktor für die Entwicklung des idiopathischen MP bilden (Satake *et al.* 2009; Simón-Sánchez *et al.* 2009; Edwards *et al.* 2010). Dies könnte zum Teil die bereits oben erwähnte positive Familienanamnese als Risikofaktor für MP erklären.

1.3.2.2 Molekularer Ablauf der Aggregation

In den Lewy-Körpern kommt α Syn nicht mehr in seiner intrinsisch ungeordneten monomeren Form vor, sondern aggregiert zu unlöslicher Fibrillenform, die eine β -Faltblattstruktur annimmt (Giráldez-Pérez *et al.* 2014). Hierfür ist besonders die NAC-Domäne wichtig, deren Struktur mittels *Micro-Electron Diffraction* genauer analysiert werden konnte. Die NAC-Region scheint gepaarte β -Faltblätter auszubilden, wie es typisch für amyloide Fibrillen ist. Dabei ist der eine Strang um 2,4 Å verschoben, wodurch sich die beiden β -Faltblätter genau ineinander lagern. Insbesondere die Region ⁶⁸GAVVIGVTAVA⁷⁸ scheint zur Fibrillenbildung befähigt zu sein und diese sowie ganze α Syn-Fibrillen sind stark zytotoxisch (Rodríguez *et al.* 2015). Eine Fibrillenbildung konnte *in vitro* auch von Wildtyp- α Syn nachgewiesen werden, was impliziert, dass auch ohne Veränderungen von α Syn selbst eine Aggregation möglich ist (Serpell *et al.* 2000; Conway *et al.* 2000). Im Zuge der Aggregation findet zunächst eine langsame Keimbildung statt, bei der sich aus α Syn-Dimeren mit anti-parallelen β -Faltblattstrukturen Kerne aus Oligomeren bilden (Wood *et al.* 1999). Eine schnelle Expansionsphase folgt. Diese Konformationsänderungen führen zu einer Exposition der NAC-Domäne, die durch hydrophobe Interaktionen zur Aggregation beitragen kann (Giasson *et al.* 2001). In der Expansionsphase bilden sich aus den Oligomeren kugelförmige Protofibrillen, aus denen sich ringförmige Fibrillen entwickeln (Ding *et al.* 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Oligomere mit einer langsamen Kinetik in eine andere Form von Oligomeren übergehen können, welche kompakter und toxischer sind, da diese den oxidativen Stress erhöhen (Cremades *et al.* 2012). Zudem scheinen sich diese Oligomere aus bereits gebildeten Fibrillen wieder zu mobilisieren. Außerdem wird derzeit diskutiert, ob unterschiedliche α Syn-Formen verschiedene neurodegenerative Erkrankungen hervorrufen, da α Syn-Fibrillen zu Zelltod führten, während α Syn-*ribbons* zur Bildung von Lewy-Neuriten und Beteiligung der Oligodendrozyten führten, was eher mit der Pathologie der Multisystematrophie übereinstimmt (Peelaerts *et al.* 2015).

1.3.2.3 Aggregations- und Toxizitätsmechanismen von α -Synuclein

Im Folgenden seien nur einige Mechanismen genannt, welche eine Aggregation und Toxizität von α Syn begründen könnten. Verschiedenste Abläufe unter Beteiligung von einigen Organellen führen zu Neurodegeneration. α Syn ist sowohl davon betroffen als auch selbst toxisch für die Zellen. Insbesondere Oligomere scheinen toxisch für Zellen zu sein, denn sie können Membranen stören und die Aggregation von endogenem α Syn auslösen (Danzer *et al.* 2007; Danzer *et al.* 2009; Winner *et al.* 2011; Pieri *et al.* 2016).

α Syn kann *in vivo* die Homöostase des Endoplasmatischen Retikulums stören (Colla *et al.* 2012). Dies wiederum kann zu einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase führen und Mitochondrien beeinträchtigen (Calì *et al.* 2013). Sowohl α Syn als auch Pestizide wie Rotenon – wobei, wie bereits erwähnt, Pestizide ein Risikofaktor für MP sind – oder MPTP inhibieren den Mitochondrien-Komplex I, was eine Erhöhung des oxidativen Stresses und eine selektive Neurodegeneration der *Substantia nigra* (zum Teil durch Apoptose) mit α Syn-reichen intrazytoplasmatischen Inklusionen bedingt (Betarbet *et al.* 2000; Devi *et al.* 2008). Eine Überexpression von α Syn kann zusätzlich die Sensitivität für oxidativen Stress erhöhen (Hernández-Vargas *et al.* 2011). Andererseits scheint oxidativer Stress auch eine Rolle in der Genese von α Syn-Fibrillen zu spielen. So konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass Stoffe wie Eisen, welche die reaktiven O_2 -Spezies erhöhen, u. a. zu einer schnelleren Aggregation führen (Lingor *et al.* 2016).

Als ein weiterer Mechanismus bei der Bildung von Lewy-Körpern wurde die Kürzung des C-Terminus beschrieben. Um den C-Terminus gekürztes α Syn aggregiert schneller als Wildtyp- α Syn (Murray *et al.* 2003). Zudem führen Änderungen dieser Region wie die Bindung von Polyaminen zu einer schnelleren Aggregation (Fernández *et al.* 2004), weshalb dem C-Terminus regulatorische Funktionen zugesprochen werden. Die Ursache hierfür und die höhere Toxizität könnte in der schon oben beschriebenen Regulation der SNARE-Komplex-Gruppierung liegen, welche durch den C-Terminus reguliert wird (Burré *et al.* 2010). Zudem kann eine $\text{CSP}\alpha$ -*Knockout*-induzierte Neurodegeneration durch C-Terminus-gekürztes α Syn nicht aufgehoben werden – im Gegensatz zu ganzem α Syn, welches diese Neurodegeneration rückgängig machen kann (Chandra *et al.* 2005). Auch andere Modifikationen scheinen die Lewy-Körper-Bildung zu begünstigen. So konnte gezeigt werden, dass der Großteil von α Syn in Lewy-Körpern an Serin-129 phosphoryliert ist (Anderson *et al.* 2006), was allerdings nicht unbedingt bedeutet, dass diese Phosphorylierung tatsächlich zu Aggregation führt, sondern auch erst im Anschluss an die Bildung der Lewy-Körper stattfinden könnte.

α Syn spielt, wie oben beschrieben, eine wichtige Rolle in der Synapse und kann somit bei Überexpression das Vesikelrecycling, die neuronale Plastizität und die Integrität der Synapse stören (Bonini und Giasson 2005). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Faltung der SNARE-Proteine durch α Syn beeinträchtigt werden kann (Vekrellis *et al.* 2011).

Ein anderer aggregationsverstärkender Faktor könnte eine pathologisch veränderte Proteindegradation sein. Übermäßig viel fehlgefaltetes Protein könnte das Proteasom-System

überlasten. α Syn wird in Zellen Ubiquitin-unabhängig direkt durch das 20S-Proteasom (Tofaris *et al.* 2001) oder über Lysosomen per Autophagie abgebaut (Lee *et al.* 2004; Klucken *et al.* 2012). Dieser Abbau kann durch Nitrierung verlangsamt werden (Hodara *et al.* 2004) und durch unvollständige Degradation sogar zu um den C-Terminus gekürztem α Syn führen (Liu *et al.* 2003), welches, wie bereits erwähnt, ein erhöhtes Risiko für Aggregation birgt. Verändertes α Syn in Lewy-Körpern von ca. 24 kDa Größe wird mono- oder diubiquitiniert (Tofaris *et al.* 2003). Dies könnte bedeuten, dass die Zellen zusätzlich zu dem normalerweise Ubiquitin-unabhängigen Abbau bei zu viel oder fehlgefaltetem Protein eine Degradation über das 26S-Proteasom oder das Lysosom – welches eine Monoubiquitinierung benötigt – zu erzielen versuchen. Außerdem führen heterozygote Mutationen in dem *GTP-binding protein type A1*-Gen, welches für die Glucocerebrosidase-1 kodiert, zu einem fünf-fach höheren Risiko für MP (Noyce *et al.* 2012). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass eine Einschränkung der Glucocerebrosidase-1-Aktivität zu einer Beeinträchtigung des Lysosoms und zu einer Aggregation von α Syn führt (Bae *et al.* 2015).

Da insbesondere dopaminerge Neuronen betroffen sind, wird untersucht, ob eine Störung der Dopaminhomöostasedisregulation zu einer stärkeren Fibrillenbildung führt. Überexpression von Wildtyp- und mutiertem α Syn veränderten den pH-Wert in Vesikeln und erhöhten die Katecholamin-Level, welche aus Dopamin hervorgehen und den oxidativen Stress erhöhen können (Mosharov *et al.* 2006). Dopamin wiederum stabilisiert Oligomere, welche die Vesikelintegrität stören können (Conway *et al.* 2001; Mazzulli *et al.* 2006; Lee *et al.* 2011). Außerdem wird die Anfälligkeit von Neuronen für Aggregation durch das Level an endogen produziertem α Syn beeinflusst (Courte *et al.* 2020).

Oligomere haben eine große Tendenz, an Membranen zu binden und können diese anscheinend permeabilisieren (Zhu *et al.* 2003; Stöckl *et al.* 2013), was deren Toxizität mitbegründen könnte. Einen weiteren Hinweis dafür, dass Membranen eine Rolle in der Aggregation spielen könnten, lieferte die Beobachtung, dass eine Exposition von Zellen des Mesencephalons gegenüber ungesättigten Fettsäuren zu einer verstärkten Oligomerisation führte (Sharon *et al.* 2003). Andererseits scheinen Membranen α Syn vor Oxidation und Nitrierung schützen zu können (Troostchansky *et al.* 2006).

Somit deutet Vieles darauf hin, dass α Syn über unterschiedliche Wege eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von MP spielt.

1.3.3 Zell-zu-Zell-Übertragung von α -Synuclein

Es gibt derzeit eine große Diskussion darüber, ob α Syn in einem Prion-ähnlichen Mechanismus übertragen wird (Jucker und Walker 2013; Goedert 2015). Es bleibt weiter unklar, ob α Syn sich zwischen Zellen ausbreiten kann und so zu einer Ausbreitung von MP im Körper führen kann.

Erste Hinweise für eine interzelluläre Übertragung von α Syn kamen durch eine anatomisch-pathologische Studie durch Braak *et al.*, die 110 Gehirne von klinisch diagnostizierten MP-Patienten und klinisch als nicht-MP diagnostizierten verstorbenen Patienten in

Bezug auf Lewy-Körper auswerteten (Braak *et al.* 2003). Diese zeigten eine vom klinischen Stadium abhängige Verteilung der Lewy-Körper. Es wurden sechs konsekutive Stadien definiert, wobei bei den höheren Stadien immer auch die Pathologie der vorangehenden Stadien zu finden war. Zunächst zeigte sich ein Befall der unteren *Medulla oblongata*, anschließend zusätzlich der *Pons*, des *Mesencephalons*, hin zum basalen Frontalhirn und dem Neokortex. Bei einer Subgruppe von symptomlosen Patienten fanden sich Lewy-Körper im *Bulbus olfactorius* und *Nucleus olfactorius anterior* sowie im *Nucleus dorsalis nervi vagi*. Der Befall dieser Subgruppe wurde als frühestes Stadium von MP interpretiert, was mit der Erkenntnis einhergeht, dass MP-Patienten vor dem Auftreten von anderen klinischen Symptomen häufig eine Geruchseinschränkung erleiden (Hawkes 2003). Wegen der Korrelation zwischen klinischer Symptomatik und Lewy-Körper-Pathologie entstand hieraus die Verbreitungstheorie. Unterstützend für diese Theorie wurde α Syn im Extrazellularraum von Zellkulturmedium, Blut und Liquor nachgewiesen (El-Agnaf *et al.* 2003).

Außerdem ergab sich hieraus die *dual-hit*-Hypothese, da anscheinend zwei unterschiedliche Stellen zu Beginn betroffen sind (Hawkes *et al.* 2007; Angot *et al.* 2010). Es wurde die Theorie aufgestellt, dass ein Pathogen wie z. B. Rotenone über die Nasenschleimhaut und den gastrointestinalen Trakt in den Körper eindringt und dort den Beginn für MP setzt (Pan-Montojo *et al.* 2012). Hierfür spricht, dass Lewy-Körpern auch außerhalb des zentralen Nervensystems im Auerbach- und Meissnerplexus (Wakabayashi *et al.* 1988) sowie den autonomen Nerven der *Glandula submandibularis* (Del Tredici *et al.* 2010) gefunden wurde und sich die Pathologie (z. B. über α Syn-Übertragung) somit über den *Nervus vagus* in den *Nucleus dorsalis nervi vagi* ausbreiten könnte. Eine Vagotomie führt in der Tat zu einem signifikant erniedrigten Risiko, an MP zu erkranken (Svensson *et al.* 2015), was bedeuten könnte, dass hierdurch eine Ausbreitung auf das zentrale Nervensystem verhindert wird. Eine Ausbreitung von α Syn-haltigen Inklusionen in der beschriebenen Reihenfolge konnte in Mäusen *in vivo* durch intragastrale Applikation von Rotenone erzeugt werden, wobei eine Anreicherung von Rotenone im Blut oder Gehirn der Mäuse und somit eine direkte Schädigung des zentralen Nervensystems ausgeschlossen wurde (Pan-Montojo *et al.* 2010).

Ein weiterer starker Hinweis in Richtung Ausbreitung von α Syn war die Entdeckung, dass zwei bis fünf Prozent von fetalen Neuronen, die in das Gehirn von MP-Patienten transplantiert wurden, nach nur 10 bis 16 Jahren Lewy-Körper aufwiesen (Li *et al.* 2008). In einer Autopsie eines MP-Patienten 24 Jahre nach Transplantation wiesen sogar elf bis zwölf Prozent der fetalen Neurone Lewy-Körper auf, was eine allmähliche Ausbreitung von pathologischen Substanzen, z. B. α Syn, eher als eine Übertragung von ganzen Lewy-Körpern nahelegt (Li *et al.* 2016). Dennoch könnte die Lewy-Körper-Bildung auch durch lokale Faktoren im MP-Gehirn bedingt sein, die nicht durch Übertragung von Proteinen wirkt, sondern die Neuronen direkt schädigt. Ähnliche Ergebnisse gab es in einem *in-vivo*-Experiment, bei welchem kortikale neuronale Maus-Stammzellen in transgene α Syn-exprimierende Mäuse transplantiert wurden (Desplats *et al.* 2009). Die transplantierten Stammzellen zeigten nach vier und acht Wochen α Syn-haltige Inklusionen, welche per En-

dozytose übertragen wurden. Die α Syn-positiven Stammzellen wiesen im Gegensatz zu den α Syn-negativen zudem Zeichen von Apoptose wie Kernfragmentation und Caspase-3-Aktivierung auf.

Zusätzlich zu diesen Beobachtungen wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass exogene β -faltblattreiche α Syn-Aggregate in Zellen aufgenommen werden und eine Aggregation von löslichem α Syn in diesen Zellen auslösen können (Luk *et al.* 2009; Nonaka *et al.* 2010; Emmanouilidou *et al.* 2010; Volpicelli-Daley *et al.* 2011). Zudem führte die Aufnahme von Aggregaten in Zellen der *Substantia nigra* von Mäusen auch zu einer Zell-zu-Zell-Übertragung in anatomisch verbundene Areale (Luk *et al.* 2012; Masuda-Suzukake *et al.* 2014; Paumier *et al.* 2015).

Somit gibt es viele Hinweise darauf, dass eine Übertragung von α Syn zwischen Zellen stattfindet. Wie genau eine solche Übertragung stattfinden soll, ist umstritten. So werden direkte Übertragung über Membrantranslokation, Übertragung durch Sekretion und Endozytose, Exosomen, Synapsen oder *tunneling nanotubes* diskutiert (Wales *et al.* 2013; Guo und Lee 2014), welche in der Diskussion noch einmal aufgegriffen werden, hier aber kurz erwähnt werden sollen. Eine direkte Aufnahme über die Membran mittels N-Terminus wurde für monomeres α Syn, nicht aber Oligomere oder Fibrillen, beschrieben (Ahn *et al.* 2006). Für eine Sekretion von α Syn spricht der Nachweis von α Syn in Körperflüssigkeiten (El-Agnaf *et al.* 2003). Die Aufnahme per Endozytose wurde auch beschrieben. So wurde die Aufnahme von α Syn in Kolokalisation mit den endosomalen GTPasen Rab5a und Rab7 beschrieben (Desplats *et al.* 2009), wobei Rab5a essentiell für die α Syn-Endozytose zu sein scheint (Sung *et al.* 2001). Jedoch ist umstritten, wie α Syn aus den Endosomen ins Zytoplasma übertreten soll und so nicht durch Lysosomen degradiert wird. Als ein weiterer Übertragungsweg wurden Exosomen *in vitro* und *in vivo* beschrieben (Emmanouilidou *et al.* 2010), was zur Aufnahme von α Syn und Zelltod führte. Außerdem wurden Exosomen, die α Syn beinhalten, im Liquor von Patienten gefunden (Stuendl *et al.* 2016). Exosomen sind extrazelluläre Vesikel von 40-120 nm im Durchmesser, die von unterschiedlichen Zellen wie HEK293-Zellen und Neuronen freigesetzt werden (Fauré *et al.* 2006; Zheng *et al.* 2017).

Vor Kurzem erst wurde die Übertragung von α Syn-Fibrillen durch *tunneling nanotubes* beschrieben (Abounit *et al.* 2016), ‚Membranröhren‘ von 50 bis 200 nm Durchmesser und einer Länge von mehreren μ m (Rustom *et al.* 2004).

Ob MP eine Prion-ähnliche Erkrankung ist, verbleibt trotz dieser zahlreichen Hinweise, dass α Syn zwischen Zellen übertragen wird und toxische Formen von α Syn nicht-aggregiertes α Syn zur Aggregation bringen können, umstritten, denn bislang gibt es noch keinen Beweis für eine Übertragung von Mensch zu Mensch (Irwin *et al.* 2013; Walsh und Selkoe 2016).

1.4 *Nanobody*-basierter Sensor für die zytosolische Detektion von α -Synuclein

1.4.1 *Nanobodies*

In der biologischen Familie der *Camelidae* gibt es – zusätzlich zu den klassischen IgG-Antikörpern bei Säugetieren mit zwei schweren (H-) und zwei leichten (L-) Ketten – sogenannte *heavy-chain-antibodies*, denen die L-Kette sowie die erste konstante Domäne (CH₁) fehlt (Hamers-Casterman *et al.* 1993). Am N-Terminus der H-Kette enthalten sie eine variable Domäne (V_HH), die dem *antigen-binding fragment* (Fab) klassischer Antikörper entspricht. Die rekombinante antigen-spezifische V_HH mit einer Größe im Nanometerbereich wird auch *Nanobody* (Nb) oder *single-domain antibody* genannt (Muyldermans 2013). Ihre geringe Größe um die 15 kDa, hohe Stabilität, große Produktionsrate in rekombinanten Wirten und ihre geringe Immunogenität wegen der hohen Übereinstimmung mit der menschlichen VH Familie III haben zu einer weit verbreiteten Nutzung in Grundlagenforschung und klinischen Studien geführt (Schenk *et al.* 1999; Dumoulin *et al.* 2003; Kirchofer *et al.* 2010; Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.* 2013; Rissiek *et al.* 2014; Vaikath *et al.* 2019).

1.4.2 Aufbau des Sensors

Das Prinzip, einen *Nanobody* zur Detektion von Proteinen in Zellen zu exprimieren, wurde das erste Mal von Rothbauer *et al.* (Rothbauer *et al.* 2006) angewandt. Im Labor von Professor Rizzoli wurde eine *Nanobody*-basierte Sensorzelllinie HEK293-mCherry-T2a-NbSyn87 (Sensorzellen, Sirion Biotech GmbH) entwickelt, welche das Protein α Syn nachweisen kann. Die Sensorzellen produzieren ein Sensorprotein. Dieses besteht aus einem *Nanobody*, welcher humanes α Syn binden kann, einem daran gekoppelten *Green Fluorescent Protein* (GFP) und einem Kernlokalisierungssignal. Der Sensor wurde auf Basis des *Nanobodies* NbSyn87 entwickelt, welcher von Williams *et al.* beschrieben wurde (Williams *et al.* 2013). Dessen Hauptepitop stellen die Aminosäuren 118-131 von α Syn dar. Der *Nanobody* beeinflusst durch seine Bindung nur in sehr geringem Maße die Struktur von α Syn.

1.4.3 Sensor in Zellen

Der Sensor wird in den Sensorzellen zusammen mit mCherry durch Doxycyclin über ein T2a-System induziert, was eine gleich hohe Expression von Sensor und mCherry sicherstellt. Durch mCherry können die Sensorzellen identifiziert werden und zugleich die erfolgreiche Induktion überprüft werden. Dass eine Induktion die erfolgreiche Synthese von Sensor und mCherry zur Folge hat, ist auch durch Sirion Biotech GmbH mittels quantitativer PCR gezeigt worden. Hierfür wurden Sensorzellen für 48 h mit 0,5 μ g/ml Doxycyclin induziert und anschließend aus der isolierten RNA eine quantitative *polymerase chain reaction* durchgeführt. Es zeigten sich eine 145,71-fache Expressionsteigerung für mCherry und

eine 139,78-fache für den Sensor. Für eine optimale Induktion wurde bereits eine Konzentration von 0,5 µg/ml Doxycyclin für 48 h durch Professor Rizzolis Labor bestätigt.

1.4.4 Theorie und Hypothese über die Funktionsweise der Sensorzellen

Im Labor von Professor Rizzoli wurde vor meiner Arbeit beobachtet, dass der Sensor in Zellen in Anwesenheit von α Syn akkumuliert und die Zellen GFP anreichern, in Abwesenheit von α Syn sich jedoch trotz erfolgreicher Doxycyclin-Induktion (durch mCherry erkennbar) kein GFP anreichert; der Sensor scheint also nicht in den Zellen vorhanden zu sein. Es wurde vermutet, dass der Sensor in Abwesenheit von α Syn abgebaut wird.

Eine mit BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführte Suche offenbarte eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von α Syn und der proteasomalen Untereinheit Rpn10 (auch *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4* genannt) des 26S-Proteasoms. Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass der *Nanobody* und damit der Sensor in Abwesenheit von α Syn über das Proteasom abgebaut werden könnte, indem der *Nanobody* spezifisch an das Proteasom bindet.

Diese Beobachtungen führten zu folgender Hypothese: Ist α Syn vorhanden, bindet es den *Nanobody* und führt so zu einer Stabilisierung des Sensors. Der Sensor akkumuliert somit in Zellen mit viel α Syn. Durch das angekoppelte GFP ist eine Anreicherung des Sensors in Zellen mit dem Mikroskop zu erkennen (durch das Kernlokalisierungssignal wird das GFP im Kern konzentriert). Ist kein α Syn vorhanden, könnte der Sensor über das Proteasom abgebaut werden (Abbildung 2).

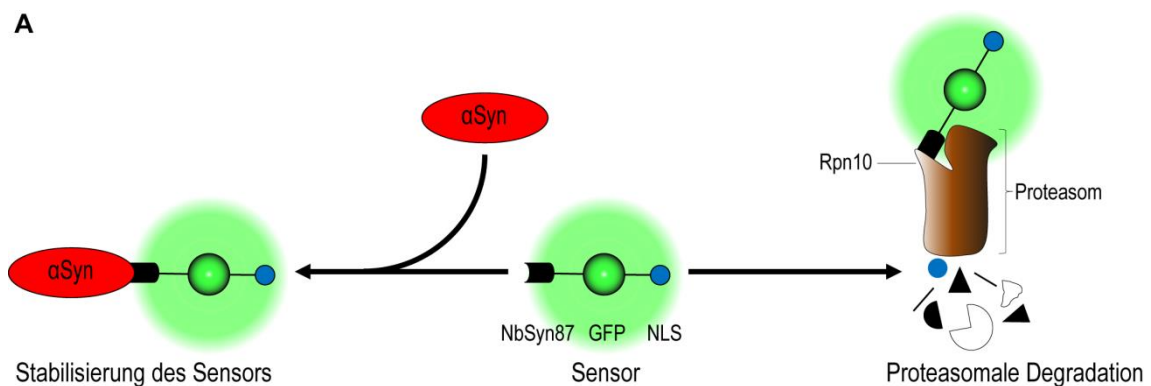


Abbildung 2: Hypothese über die Funktionsweise des *Nanobody*-basierten Sensors für α Syn. Der Sensor besteht aus einem *Nanobody* (NbSyn87), an welchen α Syn (α Syn) binden kann, einem daran gekoppelten GFP und einem Kernlokalisierungssignal (NLS=*nuclear localization signal*).

1.5 Entwicklung des Forschungsthemas

Viele Hinweise lassen vermuten, dass α Syn maßgeblich an der Entstehung von MP beteiligt ist. Dessen Übertragung von Zelle zu Zelle trägt vermutlich entscheidend zu der Pathologie und Progredienz der Krankheit bei. Ein Kernaspekt der aktuellen Parkinson-Forschung

ist die Frage, ob und auf welchem Wege das Protein α Syn von einer Zelle auf andere Zellen übertragen werden kann. Hierzu soll das oben beschriebene Sensorsystem genutzt werden. In der folgenden Arbeit soll erstens ein neues Sensorsystem zum Nachweis von α Syn in Zellen charakterisiert werden. Dazu soll seine Funktionsweise und anschließend die Spezifität und Sensitivität ermittelt werden.

Zweitens soll der Übertragungsweg von α Syn zwischen Zellen mithilfe dieses Sensorsystems untersucht werden. Hierbei wird auch kurz auf methodische Probleme bezüglich der Untersuchung von Proteinübertragungen mit transfizierten Zellen eingegangen.

Drittens soll das Vorkommen von α Syn im Liquor von MP-Patienten untersucht werden, um so den potentiellen Gebrauch der Sensorzellen für die Diagnostik des MP zu klären.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Hersteller

Die Labormaterialien und Chemikalien wurden von den in folgender Tabelle aufgelisteten Firmen erworben. Für einzelne Fälle wird in der restlichen Arbeit nur noch der kurze Firmenname angeführt. Bitte ziehen Sie diese Tabelle für weitere Informationen heran.

Tabelle 1: Liste der Hersteller.

Firma	Stadt	Staat
AppliChem GmbH	Darmstadt	Deutschland
Biometra GmbH	Göttingen	Deutschland
Cell Lines Signaling GmbH	Eppelheim	Deutschland
Core Life Sciences Inc.	Irvine, CA	USA
Chroma Technology Corp.	Bellow Falls, VT	USA
Cosmo Bio Co. Ltd.	Tokio	Japan
Dianova GmbH	Hamburg	Deutschland
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
GE Healthcare	Little Chalfont	Vereinigtes Königreich
Graphpad Software Inc.	San Diego, CA	USA
Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster	Österreich
InvivoGen	San Diego, CA	USA
Leica Microsystems GmbH	Mannheim	Deutschland
Lonza Group AG	Basel	Schweiz
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	Düren	Deutschland
Merck KGaA	Darmstadt	Deutschland
Merck Millipore	Darmstadt	Deutschland
NanoTemper Technologies GmbH	München	Deutschland

Firma	Stadt	Staat
Olympus Corporation	Tokio	Japan
Roche	Basel	Schweiz
Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg	Deutschland
Sigma-Aldrich	St. Louis, MO	USA
Sirion Biotech GmbH	Martinsried	Deutschland
Synaptic Systems	Göttingen	Germany
The Mathworks Inc.	Natick, MA	USA
Thermo Fisher Scientific Inc.	Waltham, MA	USA
Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel	Braunschweig	Deutschland
TSI GmbH & Co. KG	Zeven	Deutschland
VWR	Hannover	Deutschland

Die Chemikalien wurden von den in folgender Tabelle aufgelisteten Firmen erworben.

Tabelle 2: Chemikalien.

Chemikalien	Firma	Katalognummer
Albumin (<i>Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules</i>)	Thermo Fisher Scientific	23209
Aprotinin	Sigma-Aldrich	10236624001
Bovines Serumalbumin (BSA)	AppliChem	A1391
BCA Protein Assay Kit	Merck	71288
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%	Roth	A124.2
<i>Brilliant Blue G</i>	Sigma-Aldrich	B0770
<i>cOmplete™ His-Tag Purification Resin</i>	Roche	5893682001

Chemikalien	Firma	Katalognummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem	A3672
<i>DNase I grade II</i> (DNase)	Sigma-Aldrich	10104159001
Doxycyclin	Sigma-Aldrich	10592-13-9
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich	10197777001
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM)	Lonza	BE12-917F
<i>Dulbecco's Phosphate-buffered saline</i> (PBS) für die Zellkultur	Sigma-Aldrich	D8662
Ethidiumbromid	Roth	HP47.1
<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (EDTA)	Merck	1.08418
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Merck	S 0615
Glycerol	VWR	444485B
Glycin	Merck	56406
<i>Halt Protease Inhibitor Cocktail</i>	Thermo Fisher Scientific	78440
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>	Gibco, Thermo Fisher Scientific	14175-103
HCl	Roth	84625.2
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Merck	1.10110
IgePAL Ca-630	Sigma-Aldrich	18896
<i>Imidazole Ultra pure</i>	AppliChem	A83635
Isopropanol	Merck	1.09634
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich	I6758
KCl	Merck	1.04936
KH ₂ PO ₄	Merck	1.04873
Leupeptin	Sigma-Aldrich	11017101001
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	17-605E
Lipofectamine2000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	11668019

Chemikalien	Firma	Katalognummer
Lipofectamine RNAimax <i>Transfection Reagent</i> (RNAimax)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	13778030
<i>Lysogeny Broth</i> (LB)	Sigma-Aldrich	L3022
LB mit Agar	Sigma-Aldrich	L2897
Magermilchpulver Sucofin	TSI GmbH & Co. KG	
Methanol	Merck	1.06009
MG 132	Sigma-Aldrich	M7449
Mowiol 4-88	Merck	475904
NaCl	Merck	1.06404
NaOH	Merck	1.06495
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich	30970
NH ₄ Cl	Merck	12125-02-9
N,N,N',N' Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Sigma-Aldrich	T9281
<i>Opti-MEM I Reduced Serum Medium</i> (Opti-MEM)	Gibco, Thermo Fisher Scientific	31985070
<i>PageRuler Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific	26616
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich	P6148
Penicillin/Streptomycin	Lonza	17-602E
Pepstatin A	Sigma-Aldrich	10253286001
PMSF	AppliChem	A0999
Poly-L-Lysin (PLL)	Sigma-Aldrich	P2658
Puromycin	InvivoGen	ant-pr-1
<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS) ultra pure für Elektrophorese	Roth	2326.2
Tricin	Merck	5704041
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Merck	1.08382
Triton X-100	Merck	1.12298
Trypsin/EDTA	Lonza	BE171611

Chemikalien	Firma	Katalognummer
Tween20	Merck	8.22184

2.2 Antikörper

In der Tabelle sind alle verwendeten Antikörper aufgelistet. Im Folgenden wird nur noch die kurze Bezeichnung angeführt.

Tabelle 3: Antikörper.

Ziel	Wirt, Klonalität, Fluoreszenz	Katalognummer, (Klon)	Anwendung, Konzentration	Hersteller
α/β -Synuclein	Kaninchen, polyklonal	128002	Immunfluoreszenzfärbung, 1:500	Synaptic Systems
α -Synuclein	Kaninchen, polyklonal	Sc-7011-R, (C20-R)	<i>Western Blot</i> , 1:1000	Santa Cruz
β -Actin	Kaninchen, polyklonal, Cy 5	251003, (130B4)	<i>Western Blot</i> , 1:1000	Synaptic Systems
GFP	Maus, monoklonal	A11120, (3E6)	<i>Western Blot</i> , 1:500	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
Kaninchen	Esel, monoklonal, Cy3	711-165-152	<i>Western Blot</i> , 1:1000	Dianova
Kaninchen	Esel, monoklonal, Cy5	711-175-152	Immunfluoreszenzfärbung, 1:500	Dianova
Maus	Esel, polyklonal, Cy5	715-175-150	<i>Western Blot</i> , 1:1000	Dianova

2.3 Proteine

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten, im Labor hergestellten Proteine aufgeführt. Im Folgenden wird nur noch die kurze Bezeichnung angeführt. Für die Aufreinigungsmethode sei auf 2.8.8 verwiesen.

Tabelle 4: Proteine.

Bezeichnung	Erklärung
(-30)GFP	GFP mit 30 negativen Ladungen
α Syn	Humanes α Syn
β Syn	Humanes β Syn
NbSyn87-Alexa647	NbSyn87 mit daran gekoppeltem Alexa647
Rpn10	Humane Rpn10-Untereinheit des 26S-Proteasoms
<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i> (SUMO)-Protease	Protease, welche das SUMO-Protein (auch als <i>Ubiquitin like protein</i> bekannt) erkennt und abspaltet

2.4 Plasmide

In der folgenden Tabelle sind verwendete Plasmide aufgelistet. Im Folgenden wird nur noch die kurze Bezeichnung angeführt. Für die Herstellung sei auf 2.9.1 verwiesen.

Tabelle 5: Plasmide.

Bezeichnung	Erklärung
<i>paSyn</i>	Humanes α Syn in <i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>paSyn-HA</i>	Humanes α Syn mit HA-tag in <i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>pβSyn</i>	Humanes β Syn in <i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>pcDNA3.1(+)</i>	<i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>praSyn</i>	α Syn der Ratte in <i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>pSensor</i>	NbSyn87 vor <i>enhanced GFP</i> (EGFP) und einem <i>nuclear localization signal</i> in <i>pcDNA3.1(+)</i> (Thermo Fisher Scientific)
<i>pTOM70-EGFP</i>	<i>Translocase of the outer membrane</i> (TOM)70 von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vor EGFP in N1 (Clontech)

2.5 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet. Im Folgenden wird nur noch die kurze Bezeichnung angeführt.

Tabelle 6: Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe und Zubereitung
Anodenpuffer	0,2 M Tris, eingestellt auf pH 8,9 mit HCl.
Blockpuffer	5% Magermilchpulver, 0,05% Tween20 in PBS.
Kathodenpuffer	0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS.
Lysepuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% IgePAL, 0,5% Natriumdeoxycholat. Der Puffer wurde bei 4 °C aufbewahrt. Frisch hinzugefügt wurden vor Gebrauch je 1:1000 DNase, Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A, <i>Halt Protease Inhibitor Cocktail</i> (FisherScientific) und 1:800 PMSF.
LB-Agarplatten	LB-Agarplatten wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers hergestellt. Hierzu wurden 35 g LB mit Agar Pulver in 1 l Wasser aufgelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen wurden Antibiotika hinzugegeben und die Flüssigkeit in Petrischalen gegossen.
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerol, 6 ml destilliertes Wasser und 12 ml 0,2 M Tris. Zubereitung: Die Chemikalien wurden 5 Tage lang bei milder Wärme gemischt und mit HCl auf pH 8,5 eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert, schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.
Paraformaldehyd (PFA)	4% PFA in PBS. Zubereitung: 8 g PFA wurden in 180 ml destilliertem Wasser durch Mischen bei mildem Erwärmen und Zufügen von 200 µl 10 M NaOH aufgelöst. Nach Hinzufügen von 20 ml 10x PBS, pH 7,4, wurde der pH mit HCl auf 7,4 eingestellt. Die Lösung wurde aliquotiert und bei -20 °C bis zum Experiment aufbewahrt.
Permeabilisationspuffer	0,1% Triton X-100, 2% BSA in PBS.
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4.
<i>High salt</i> PBS	500 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ PO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4.
Probenpuffer	50mM Tris, 4% SDS, 0,01% Serva Blue G, 12% Glycerin.
<i>Quenching</i> -Lösung für PFA	80 mg NH ₄ Cl, 13,5 ml PBS und 1,5 ml 1 M Glycin. Zubereitung: 80 mg NH ₄ Cl wurden durch Mischen in PBS und Glycin aufgelöst.

Bezeichnung	Inhaltsstoffe und Zubereitung
Sammelgel	4% Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%, 1 M Tris (pH 8,45), 0,1% SDS.
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol, 0,04% SDS; pH 8,3.
Trenngel	10% Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30%, 1 M Tris (pH 8,45), 0,1% SDS und 10% Glycerol.
Tris Puffer	1 M Tris, eingestellt auf pH 8,0 mit HCl.
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris-Acetat (Tris und Essigsäure), 1 mM EDTA; pH 8,4. Die Lösung wurde autoklaviert.
Waschpuffer	0,05% Tween20 in PBS.

2.6 Untersuchungen an der Zellkultur

In der folgenden Tabelle sind speziell in der Zellkultur verwendete Media, Puffer und Lösungen aufgeführt. Im Folgenden wird nur noch die kurze Bezeichnung angeführt.

Tabelle 7: Media, Puffer und Lösungen für die Zellkultur.

Bezeichnung	Mengen/Konzentrationen
Pen/Strep-Medium	10% FBS (FBS wurde für 20 min bei 56 °C im Wasserbad inaktiviert), 4 mM L-Glutamin und 600 U/ml Penicillin-Streptomycin in <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM).
Puromycinmedium	10% FBS, 2 mM L-Glutamin und 0,5 µg/ml Puromycin (0,55 U/ml) in DMEM.
Transfektionsmedium	10% FBS, 4 mM L-Glutamin in DMEM.
DNase	DNase I grade II wurde mit <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> auf 0,1 mg/ml verdünnt und Aliquots bei -20 °C eingefroren. Für alle Experimente wurde eine Konzentration von 2 µg/ml verwendet (entspricht 0,002% wt/volume).
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> .
Trypsin/EDTA	200 mg EDTA/l, 170.000 U Trypsin/l.

2.6.1 HEK293-mCherry-T2a-NbSyn87-Zellen (Sensorzellen)

Sensorzellen (Sirion Biotech GmbH) wurden in Puromycinmedium bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit in einem HERAcell 150i CO₂ Inkubator (Thermo Fisher Scientific) gezüchtet.

2.6.2 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen (Cell Lines Service GmbH), erstmals von Graham *et al.* (Graham *et al.* 1977) beschrieben, wurden in Pen/Strep-Medium bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit in einem HERAcell 150i CO₂ Inkubator (Thermo Fisher Scientific) gezüchtet.

2.6.3 HEK293-i- α Syn-Zellen (α Syn-Zellen)

α Syn-Zellen (Sirion Biotech GmbH) wurden in Puromycinmedium bei 37 °C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit in einem HERAcell 150i CO₂ Inkubator (Thermo Fisher Scientific) gezüchtet.

2.6.4 Poly-L-Lysin-Platten

Deckgläser (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel) wurden säuregewaschen (1 M HCl über Nacht, dann 1 M NaOH für 45 min) und nach jeder Säure- oder Basenbehandlung mit bidestilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen und in >95% Ethanol aufbewahrt. Vor Zellaussaat wurden sie abgeflämmt, für 1 h mit PLL (0,1 mg/ml) bedeckt und abschließend dreimal mit ddH₂O gewaschen.

2.6.5 Zellaussaat

Das Ernten erfolgte durch Inkubation mit Trypsin/EDTA. Die Reaktion wurde mit Zellkulturmedium (für Experimente mit transfizierten Zellen wurde durchgehend Medium ohne Antibiotikum (Transfektionsmedium) genutzt) gestoppt und die abgelösten, gesammelten Zellen für 4 min bei 1.000 rpm (Heraeus Megafuge 8 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml neuem 37 °C warmen Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und anschließend eine Zellsuspension mit definierter Zellzahl angesetzt. Hiervon wurde – wenn nicht anders erwähnt – 1 ml/Well in 12-Well-Platten mit PLL-benetzten Deckgläsern ausgesät. Sensorzellen und α Syn-Zellen wurden mit 0,5 μ g/ml Doxycyclin induziert.

2.6.6 Transfektion

Ein Well einer 12-Well-Platte wurde – wenn nicht anders gekennzeichnet – mit 2 μ g DNA und 3 μ g Lipofectamine2000 transfiziert. Wenn weniger als 2 μ g Plasmid-DNA genutzt wurden, wurde ein leeres *backbone*-Plasmid hinzugefügt, um den absoluten Plasmidgehalt konstant zu halten.

Ausführlich: Hierzu wurde für ein Well einer 12-Well-Platte für 5 min (i) 2 µg DNA mit 48 µl Opti-MEM angesetzt sowie (ii) 3 µg Lipofectamine2000 und 47 µl Opti-MEM. Anschließend wurden die Lösungen für 20 min zusammengegeben und daraufhin 100 µl/Well gegeben.

2.6.7 MG 132-Gabe

2.6.7.1 MG 132-Gabe in verschiedenen Konzentrationen

Das Proteasom wurde in Sensorzellen 48 h nach Aussäen (140.000/Well) mit MG 132 in unterschiedlichen Konzentrationen inhibiert – wobei in allen Konditionen die gleiche Menge DMSO, nur mit unterschiedlichen Konzentrationen an MG 132, gegeben wurde – und nach 16 h fixiert und mit Hoechst 33342 gefärbt. Als Kontrolle wurde Zellen nur DMSO gegeben (3.3.1)

2.6.7.2 MG 132-Gabe über unterschiedliche Dauer

Das Proteasom wurde in Sensorzellen 48 h nach Aussäen (140.000/Well) mit MG 132 (1µM) inhibiert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert und mit Hoechst 33342 gefärbt. Als Kontrolle wurde den Zellen DMSO anstelle von MG 132 gegeben (3.3.2).

2.6.8 Sensitivität der Sensorzellen

Die Sensorzellen wurden 48 h nach Aussäen (140.000/Well) mit je 2 µg Plasmid und 3 µg Lipofectamine2000 pro Well transfiziert. Weitere 48 h später wurden sie fixiert. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Mengen an *paSyn*-Plasmid transfiziert. Wenn weniger als 2 µg *paSyn*-Plasmid transfiziert wurden, wurde die Plasmidmenge mit einer *backbone*-DNA (*pcDNA3.1(+)*) auf eine gleiche absolute Plasmidmenge von 2 µg aufgefüllt (3.3.3).

2.6.9 Spezifität der Sensorzellen

Die Sensorzellen wurden 48 h nach Aussäen (140.000/Well) mit je 2 µg Plasmid und 3 µg Lipofectamine2000 pro Well transfiziert. Weitere 48 h später wurden sie fixiert. Die Sensorzellen wurden mit humanem *paSyn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*), humanem *pβSyn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*), Ratten (*Rattus norvegicus*)-*praSyn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*) und einem leeren *pcDNA3.1(+)*-Plasmid als Kontrolle transfiziert. Durch das gleiche *backbone* wurden etwaige Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Plasmide ausgeschlossen (3.3.5).

2.6.10 Proteingabe

2.6.10.1 (-30)GFP-Gabe

Es wurden ca. 140.000 HEK293-Zellen pro Well einer 12-Well-Platte in Transfektionsmedium ausgesät. 24 h später wurde 1 µM Protein gegeben. Für die Proteingabe mit RNAi-

max wurden 2 μ l RNAimax mit Opti-MEM für 5 min angesetzt. Nach 20 min wurde Protein zugegeben, sodass für jede Kondition insgesamt 200 μ l bestehend aus Protein, Opti-MEM und evtl. RNAimax angesetzt waren. Als Kontrolle wurde PBS mit Opti-MEM zu insgesamt 200 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde dies auf die Zellen zu 200 μ l Medium gegeben. Nach 36 h wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.4.1).

2.6.10.2 α Syn-Gabe

Es wurden ca. 70.000 Sensorzellen pro Well einer 24-Well-Platte in Transfektionsmedium ausgesät. 48 h später wurde α Syn hinzugegeben, sodass die Konzentration im Well 2,8 μ M bzw. 22 μ M betrug. Für die Proteingabe mit RNAimax wurden 2 μ l RNAimax mit Opti-MEM für 5 min angesetzt. Nach 20 min wurde Protein zugegeben, sodass für jede Kondition insgesamt 200 μ l bestehend aus Protein, Opti-MEM und evtl. RNAimax angesetzt waren. Als Kontrolle wurde PBS mit Opti-MEM zu insgesamt 200 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde dies auf die Zellen zu 200 μ l Medium gegeben. Nach 14 h wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.4.2).

2.6.11 Mediumtransfer

Es wurden ca. 75.000 Sensorzellen/Well einer 12-Well-Platte und ca. 120.000 HEK293-Zellen/Well einer 12-Well-Platte in unterschiedlichen Wells ausgesät. 12 h nach Aussaat wurden die HEK293-Zellen transfiziert. Für den Mediumtransfer mit Mediumwechsel wurde das Medium 8 h nach Transfektion verworfen, die Zellen mit PBS gewaschen (1ml/Well), frisches Medium gegeben und 24 h oder 48 h nach diesem Mediumwechsel eingesammelt. Für den Mediumtransfer ohne Mediumwechsel wurde das Medium 24 h nach Transfektion eingesammelt. Das eingesammelte Medium (950 μ l/Well) wurde für 4 min bei 1.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5418), damit sich tote und lose Zellen als Pellet ansammeln konnten. Der Überstand (900 μ l/Well) wurde abgenommen und für 30 min entweder mit oder ohne DNase (2 μ g/ml) im Inkubator *Biometra OV 1 mini hybridization oven* (Core Life Sciences) bei 37 °C mit angeschaltetem Rotor behandelt, sodass die DNase gut im Medium verteilt wurde. Anschließend wurde das Medium (900 μ l/Well) auf Sensorzellen gegeben. 36 h nach Mediumtransfer auf die Sensorzellen wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.5.2, 3.5.4, 3.5.5).

2.6.12 Kokultur mit transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen

Es wurde eine Kokultur aus transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen angesetzt.

2.6.12.1 Kokultur mit PBS-Waschung nach Transfektion

Es wurden ca. 90.000 HEK293-Zellen pro Well einer 12-Well-Platte 12 h nach Aussaat transfiziert. 24 h später wurde DNase (2 μ g/ml) für 30 min hinzugegeben. Anschließend wurde zweimal mit PBS (1 ml/Well) gewaschen und ca. 90.000 Sensorzellen pro Well in

neuem Transfektionsmedium zu den HEK293-Zellen hinzugegeben. Nach 36 h wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.5.1, 3.6.1).

2.6.12.2 Kokultur mit Ethanol- oder Dimethylsulfoxid (DMSO)-Gabe nach Transfektion

Es wurden ca. 90.000 HEK293-Zellen pro Well einer 12-Well-Platte 12 h nach Aussaat transfiziert. 24 h später wurde DNase (2 µg/ml) für 30 min hinzugegeben. Für die Kokultur mit Ethanol wurde anschließend 70% Ethanol für 20 min gegeben. Für die Kokultur mit DMSO wurde anschließend das Medium mit DMSO auf 20% DMSO für 20 min angereichert. Daraufhin wurden die Zellen viermal mit PBS (1 ml/Well) gewaschen und ca. 90.000 Sensorzellen pro Well in neuem Transfektionsmedium zu den HEK293-Zellen hinzugegeben. Nach 36 h wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.6.2).

2.6.12.3 Kokultur mit Trypsinisierung der transfizierten HEK293-Zellen

HEK293-Zellen wurden in drei 100-mm-Platten in einer Zellzahl von ca. 200.000/ml ausgesät. 12 h später wurden zwei der Platten mit 1 µg/ml TOM70-EGFP-Plasmid transfiziert. Die dritte Platte wurde als nicht-transfizierte Kontrolle genutzt. 22 h nach Transfektion der HEK293-Zellen wurden ca. 80.000 Sensorzellen/Well einer 12-Well-Platte in 0,5 ml Transfektionsmedium ausgesät. 23,5 h nach Transfektion der HEK293-Zellen wurde zu den transfizierten HEK293-Zellen in einer Platte DNase (2 µg/ml) für 0,5 h gegeben. HEK293-Zellen wurden 24 h nach Transfektion trypsinisiert, das Trypsin mit 6 ml Medium abgelöscht, zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml neuem Medium resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurde die benötigte Menge für eine Zellzahl von ca. 100.000 HEK293-Zellen/Well in 0,5 ml gegeben (normalerweise etwa 8,333 µl in 0,5 ml, was einer Verdünnung von ca. 1:60 entspricht). 36 h später wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (3.6.3).

2.6.12.4 Kokultur mit Trypsinisierung der transfizierten HEK293-Zellen und anschließender Ethanol-Gabe

Es wurde, wie unter 2.6.12.3 beschrieben, verfahren. Die Sensorzellen wurden vor den HEK293-Zellen ausgesät, damit sie sich anhaften konnten und somit nicht auf toten HEK293-Zellen festwachsen.

Von der Zellsuspension nach Trypsinisierung und Ablöschen des Trypsins wurde die benötigte Menge für eine Zellzahl von ca. 100.000 HEK293-Zellen/Well in 0,5 ml 70%-iges Ethanol gegeben. Nach 20 min wurde dieses zentrifugiert, das Ethanol abgenommen und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Anschließend wurde wieder wie in 2.6.12.3 beschrieben verfahren (3.6.3).

2.6.13 Zellfusion

Um eine Zellfusion zu induzieren, wurde eine inaktivierte Sendaivirushülle (HVJ-E (*Hemagglutinating Virus of Japan-Envelope*)) genutzt. Diese wurde aus dem HVJ Envelope Cell Fusion

Kit GenomONE-CF Ex (Cat# ISK-CF-001-EX, Cosmo Bio Co. Ltd.) bezogen. Die Anweisungen des Herstellers wurden befolgt. Hierzu wurden α Syn- sowie HEK293-Zellen, zwei Tage nachdem sie in einer 6-Well-Platte ausgesät worden waren, mit kaltem PBS gewaschen und mit kaltem Medium von der Platte gelöst. Diese Zellsuspension wurde für 5 min bei 4 °C und 1.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet mit 500 μ l eiskaltem *cell fusion buffer* (Cosmo Bio Co. Ltd.) resuspendiert. Die Zellen wurden in je zwei Röhrchen aufgeteilt. Eines wurde als Nicht-Fusions-Kontrolle gebraucht, das andere wurde zur Fusion genutzt, indem 1 μ l eiskalte HVJ-E Suspension (Cosmo Bio Co. Ltd.) hinzugefügt und untergemischt wurde. Nach 5 min auf Eis wurde die Mischung für 5 min bei 4 °C und 2.000 rpm zentrifugiert. Nach Entnahme des Überstandes wurde *cell fusion buffer* hinzugefügt. 1 ml dieser Mischung wurde pro Well in eine 12-Well-Platte zu Sensorzellen gegeben, welche zuvor mit PBS gewaschen und für 5 min in eiskaltem *cell fusion buffer* inkubiert worden waren (für eine Sensorzellfusionskontrolle wurden in ein Well mit Sensorzellen 0,5 μ l HVJ-E hinzugefügt). Die Platte wurde nach leichtem Mischen für 5 min bei 4 °C und 1.000 rpm zentrifugiert. Nachdem die Platte daraufhin für 15 min bei 37 °C inkubiert worden war, wurde der *cell fusion buffer* gegen Medium ausgetauscht. Nach 16 h wurden die Zellen fixiert (3.8).

Neben der eigentlichen Experimentkondition aus Sensor- und α Syn-Zellen mit HVJ-E wurden Kontrollen durchgeführt: Erstens wurde getestet, ob die Fusion von Zellen eine Auswirkung auf das Sensorsignal hat, indem eine Fusion der Sensor- und HEK293-Zellen herbeigeführt wurde. Zweitens wurde getestet, ob HVJ-E an sich zu einer Beeinträchtigung des Sensorsignals führt und ob die Sensorzellen die HVJ-E-Behandlung überleben. Drittens wurde überprüft, ob α Syn-Zellen und HEK293-Zellen eine Behandlung mit HVJ-E überleben. Diese Konditionen sind in Tabelle 8 dargestellt. In der oberen Zeile sind Fusionen der einzelnen Zelltypen aufgelistet; in der zweiten Zeile hierzu komplementäre Kontrollen, bei denen keine Fusion durchgeführt wurde.

Tabelle 8: Schema Zellfusionsplatte.

Fusion (+HVJ-E)	Sensor- + α Syn-Zellen	Sensor- + HEK293- Zellen	Sensorzellen	α Syn-Zellen	HEK293- Zellen
Keine Fusion (-HVJ-E)	Sensor- + α Syn-Zellen	Sensor- + HEK293- Zellen	Sensorzellen	α Syn-Zellen	HEK293- Zellen

2.6.14 Fixieren

Die Zellen wurden mit PBS (1 ml/Well) gewaschen und daraufhin mit 500 μ l PFA für 30 min unter Aluminiumfolie fixiert. Das PFA wurde mit 1 ml *Quenching*-Lösung/Well für 15 min gelöscht. Die Zellen wurden dreimal mit PBS (1 ml/Well) gewaschen.

2.6.15 Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden einmal kurz und anschließend für 15 min mit Permeabilisationspuffer unter Rotation inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser mit 50% Permeabilisationspuffer in PBS und primären Antikörper (anti- α Syn; 1:500; Tabelle 3) für 1 h unter leichter Rotation inkubiert. Darauf wurde dreimal kurz und einmal für 10 min mit PBS gewaschen, bevor die Deckgläser für 45 min mit 50% Permeabilisationspuffer in PBS und sekundärem Antikörper (anti-Kaninchen; 1:500; Tabelle 3) inkubiert wurden. Abschließend wurde dreimal kurz mit PBS und einmal für 10 min mit *High Salt* PBS gewaschen.

2.6.16 Höchst 33342-Färbung

Die Zellen wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers mit 1 μ g Höchst 33342/ml (Thermo Fisher Scientific) unter leichter Rotation (Rotamax 120, Heidolph) für 5 min gefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS (1 ml/Well) gewaschen.

2.6.17 Montieren der Zellen auf Objektträgern

Die Deckgläser wurden aus dem PBS genommen und ein Deckgläschen in 8,5 μ l Mowiol eingebettet.

2.7 Untersuchungen am Liquor

2.7.1 Patienten

Die Patienten waren in der Paracelsus Elena Klinik, Kassel, Deutschland in Behandlung (Ethikvoten Georg-August-Universität 36/7/02 und 9/7/04 sowie Doktorandeninforma-

tion DOK_162_2016). Bei ihnen ist Morbus Parkinson (60 Patienten), eine Lewy-Demenz (5 Patienten) oder eine Multisystematrophie (1 Patientin) mittels Standardkriterien diagnostiziert worden (Gibb 1988; McKeith *et al.* 2004). Bei neurologischen Kontrollpatienten (42 Patienten) wurden verschiedene nicht-verwandte (keine Synucleinopathien) neurologische Erkrankungen diagnostiziert. Für ausführliche Informationen siehe Tabelle 9, Tabelle 10 und Tabelle 11.

Tabelle 9: Morbus-Parkinson-Patienten. ID: Identifikationsnummer. MMSE: *Mini-Mental State Examination*. UPDRS: *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*.

ID	Geschlecht	Alter	Familienanamnese für MP	Erkrankungsdauer	Alter bei Diagnose	MMSE	Hoehn&Yahr Stadium	UPDRS
697	f	72	unbekannt	13	59	29	unbekannt	unbekannt
731	m	75	-	10	65	24	unbekannt	unbekannt
863	m	80	-	10	70	27	5	67
920	f	70	-	4	66	26	2	29
934	f	78	-	0,5	77,5	28	3	46
939	f	83	-	0,5	82,5	25	3	44
948	f	74	unbekannt	9	65	unbekannt	5	126
961	m	80	unbekannt	5	75	21	3	49
966	m	73	+	9	64	22	5	115
970	m	79	unbekannt	18	61	15	3	63
975	f	80	-	1	79	17	3	59
982	m	77	unbekannt	1	76	26	2,5	47
991	f	76	+	5	71	28	4	50
1005	f	57	+	1	56	27	3	42
1019	m	64	-	5	59	19	3	87
1022	f	75	+	5	70	22	3	48
1024	m	62	-	5	57	24	4	75
1031	m	67	-	6	61	18	2,5	43
1037	f	69	+	6	63	25	2,5	40

ID	Geschlecht	Alter	Familienanamnese für MP	Erkrankungsdauer	Alter bei Diagnose	MMSE	Hohn&Yahr Stadium	UPDRS
1044	f	79	unbekannt	21	58	28	5	82
1052	f	75	-	2,5	72,5	29	3	54
1054	m	69	+	0,5	68,5	unbekannt	unbekannt	unbekannt
1057	f	74	-	15	59	23	2,5	41
1058	m	74	-	0,5	73,5	30	3	38
1062	f	83	-	2	81	16	5	102
1080	f	55	+	1	54	unbekannt	2,5	19
1081	m	69	unbekannt	18	51	unbekannt	5	95
1084	m	81	+	5	76	13	5	73
1091	m	86	-	3	83	19	3	44
1094	m	39	-	1	38	29	3	61
1100	m	71	+	5	66	23	4	75
1102	f	74	+	1	73	26	3	53
1116	m	62	-	2	60	27	2	26
1119	f	84	-	5	79	unbekannt	3	34
1120	m	75	unbekannt	3	72	17	3	80
1131	m	71	unbekannt	8	63	22	unbekannt	unbekannt
1136	m	59	unbekannt	4	55	20	5	79
1148	m	68	unbekannt	6	62	23	1,5	18
1159	m	77	-	5	72	28	4	59
1163	m	76	unbekannt	4	72	27	unbekannt	unbekannt
1180	m	74	-	7	67	19	4	56
1265	m	68	-	28	40	15	5	88
1340	f	77	unbekannt	4	73	23	4	88
1357	m	78	unbekannt	4	74	21	2	52
1407	m	82	unbekannt	14	68	unbekannt	5	unbekannt

ID	Geschlecht	Alter	Familienanamnese für MP	Erkrankungsdauer	Alter bei Diagnose	MMSE	Hoehn&Yahr Stadium	UPDRS
1413	m	67	unbekannt	3	64	23	4	84
1439	m	77	-	13	64	25	4	62
1443	f	77	+	2	75	18	4	55
1521	f	51	-	4	47	unbekannt	1	15
1560	m	83	unbekannt	5	78	27	4	101
1589	m	74	-	4	70	18	5	116
1594	f	75	unbekannt	16	59	11	4	73
1620	m	72	-	6	66	6	4	69
1627	f	76	-	20	56	14	4	94
1630	f	65	-	0,8	64,2	unbekannt	1,5	28
1698	m	83	+	1	82	26	4	77
1723	m	52	+	4	48	30	4	65
1735	m	72	-	4	68	unbekannt	4	99
1738	m	72	-	11	61	26	5	122
1776	m	60	unbekannt	9	51	29	4	106

Tabelle 10: Patienten mit Lewy-Körper-Demenz oder Multisystematrophie. ID: Identifikationsnummer.

ID	Geschlecht	Alter	Morbus Parkinson in Familie	Diagnose
1204	f	60	-	Lewy-Körper-Demenz
1216	f	73	-	Lewy-Körper-Demenz
1239	m	65	+	Lewy-Körper-Demenz
1246	f	70	+	Lewy-Körper-Demenz
1258	m	71	+	Lewy-Körper-Demenz
1111	f	70	-	Multisystematrophie

Tabelle 11: Neurologische Kontrollen. ID: Identifikationsnummer. CBD: Kortikobasale Degeneration. FTD: Frontotemporale Demenz. NPH: Normaldruckhydrozephalus (*Normal Pressure Hydrocephalus*). PNP: Polyneuropathie. PSP: Progressive Supranukleäre Blickparese (*Progressive Supranuclear Palsy*). RLS: *Restless-Legs*-Syndrom. SCA: Spinozerebelläre Ataxie.

ID	Geschlecht	Alter	Morbus Parkinson in Familie	Diagnose
680	f	64	-	Myalgie-Faszikulations-Crampus-Syndrom
725	f	73	-	RLS
846	m	77	unbekannt	FTD
861	f	60	-	RLS
906	m	73	-	CBD
911	m	74	-	SCA
954	m	68	-	PSP
955	f	82	unbekannt	PSP
969	f	71	+	PSP
997	f	64	-	FTD
1010	m	87	-	Vaskuläres Parkinson-Syndrom
1012	m	88	+	Essentieller Tremor
1048	m	76	-	Vaskuläre Demenz
1049	f	81	-	PSP
1059	m	70	unbekannt	PSP
1063	f	81	unbekannt	NPH
1071	f	73	unbekannt	CBD
1072	m	76	-	RLS
1086	m	73	-	NPH
1103	f	69	-	NPH
1135	f	77	-	NPH
1155	m	75	-	PSP
1157	f	73	-	CBD

ID	Geschlecht	Alter	Morbus Parkinson in Familie	Diagnose
1168	f	64	-	SCA
1188	m	60	unbekannt	PSP
1191	f	75	+	SCA
1223	f	77	-	Hashimoto-Enzephalitis
1259	f	71	-	Essentieller Tremor
1303	m	69	unbekannt	PSP
1382	f	75	+	Dystoner Tremor
1529	m	84	-	PNP
1579	f	35	-	PNP
1606	f	65	-	Neuroleptikainduzierte Dyskinesie
1706	m	48	-	RLS
1759	f	59	unbekannt	PSP
1765	m	76	-	PNP
1768	m	65	unbekannt	PNH
1772	m	60	-	SCA
1774	f	71	-	CBD
1777	f	80	-	Benigner paroxysmaler Lagerungsschwindel
1785	f	73	-	RLS
1790	m	67	-	PSP

2.7.2 Liquorproben

Liquorproben wurden mittels identischen *standard operating procedures* an der Paracelsus Elena Klinik, Kassel, Deutschland gesammelt. Der Liquor wurde durch eine Lumbalpunktion von sitzenden, nüchternen Patienten am Morgen gewonnen. Er wurde durch Zentrifugation bei 2.000 g für 10 min bei Raumtemperatur weiterverarbeitet. Der Überstand wurde innerhalb von 20-30 min eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

Proben mit Erythrozyten $>50/\mu\text{l}$ oder Hinweisen auf eine Entzündung wurden ausgeschlossen.

2.7.3 Liquorgabe

Normale HEK293-Zellen und Sensorzellen wurden in einer 96-Well-Platte mit PLL-bedecktem Glasboden (Sensoplate, Greiner Bio-One International GmbH) ausgesät (ca. 14.000/Well) und mit $0,5 \mu\text{g/ml}$ Doxycyclin induziert. Um der Verdunstung von Flüssigkeit vorzubeugen, wurden die Zwischenräume und Randwells mit Wasser aufgefüllt. Nach 24 h wurde der bei -80°C gelagerte Liquor auf Eis aufgetaut, der Liquor eines Patienten gepoolt und $50 \mu\text{l}$ Liquor auf die Zellen gegeben, nachdem das Medium bis auf $25 \mu\text{l}$ von den Zellen entfernt worden war. Bilder von den lebendigen Zellen wurden mit dem Biotek Cytation 3 Imaging Reader nach 24 h in Liquor-Medium erstellt. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 4% PFA über Nacht fixiert, dann mit $0,1 \text{ M NH}_4\text{Cl}$ für 15 min gelöscht und anschließend wurden Bilder von den Zellen in PBS erstellt (3.9).

2.8 Biochemische Methoden

2.8.1 Agarosegelelektrophorese

Eine übliche Agarosegelelektrophorese wurde durchgeführt: Es wurde durch Mischen unter Erwärmen ein 1% Agarosegel aus Agarose und TAE hergestellt. Dem Gel wurde Ethidiumbromid gemäß den Anweisungen des Herstellers (Roth) zugegeben. Es wurde mit einer 1 Kilobasenpaare-Leiter beladen. Die Elektrophorese wurde bei 90 V durchgeführt. Die Bilder wurden unter UV-Licht gemacht (3.5.3).

2.8.2 Dot Blot

Es wurde eine Reihenverdünnung von Proteinen in Waschpuffer angesetzt und $1 \mu\text{l}$ der Proteinlösungen auf eine Nitrozellulosemembran gegeben. Nach Trocknung wurde die Membran mit Blockpuffer und 2% FBS für 1 h unter Rotation geblockt, für 1 h mit 50 nM fluoreszent markiertem *Nanobody* NbSyn87-Alexa647 inkubiert und 1 h mit Waschpuffer gewaschen. Die Bilder der Membran wurden mit einem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) erstellt (3.2.1).

2.8.3 Dissoziationskonstanten (K_d)-Bestimmung

Für die K_d -Bestimmung und Bindungsnachweise wurde ein Nanotemper Monolith NT.115 verwendet (NanoTemper Technologies GmbH). Hierzu wurde eine Reihenverdünnung von Protein angesetzt und jeweils 5 nM des fluoreszent-markierten *Nanobodies* NbSyn87-Alexa647 hinzugefügt. Diese Lösungen wurden in Glaskapillaren gefüllt (Monolith NT.115 Standard Treated Capillary (K002)). Das Gerät erhitzt die Lösung in Glaskapillaren kon-

zentriert an einem Punkt und misst die Geschwindigkeit, mit welcher sich Teilchen von hier fortbewegen. Ist der *Nanobody* gebunden, sind die Moleküle größer und bewegen sich somit langsamer von diesem Ort weg als im ungebundenen Zustand, sodass hieraus der Anteil gebundener und ungebundener Moleküle bestimmt werden kann. Hierüber wird die K_d berechnet (3.2).

2.8.4 Zellysat

Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion einmal mit kaltem PBS (1ml/well) gewaschen. Daraufhin wurde eiskalter Lysepuffer mit 250 μ M PMSF und frisch hinzugefügten 10 ng Leupeptin, 10 ng Aprotinin, 1 ng Pepstatin A, 10 ng DNase und 1 μ l *Halt Protease Inhibitor Cocktail* (Thermo Fisher Scientific) gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber eingesammelt. Diese Lösung wurde gut gemischt und anschließend für 1 h bei 13.200 rpm bei 4 °C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) zentrifugiert, der Überstand in zwei neue Mikroreaktionsgefäße gefüllt und schockgefroren.

2.8.5 Bicinchoninic acid assay (BCA)

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellysat wurde eines der Mikroreaktionsgefäße aufgetaut und ein BCA, wie von Smith *et al.* ((Smith *et al.* 1985)) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden Reihenverdünnungen von Standard-Albumin (*Pierce™ Bovine Serum Albumin Standard Ampules*) und Proben in Triplikaten angesetzt. Diese wurden zu BCA-Lösung (0,08% Kupfersulfat in *BCA-Solution*) gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde die Auswertung mit dem Biotek Cytation 3 Imaging Reader durchgeführt und anschließend über eine Albumin-Standardkurve (Abbildung 3) die Proteinmenge berechnet.

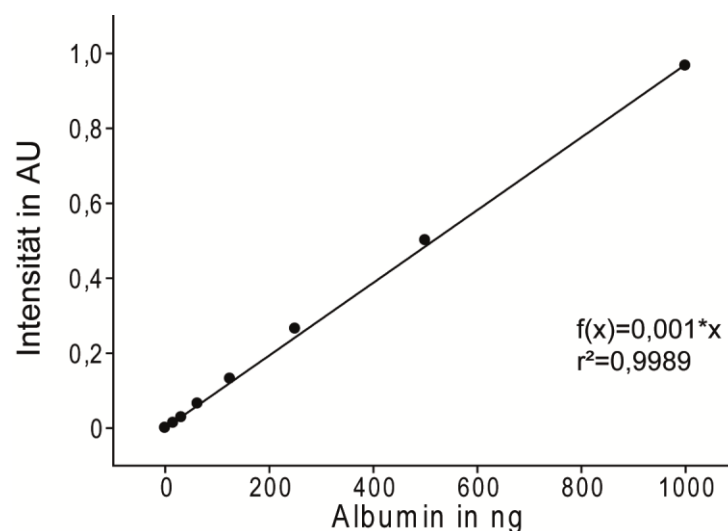


Abbildung 3: Beispiel einer Albumin-Standardkurve für ein BCA.

2.8.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Zellysate wurden auf Eis aufgetaut und auf die gleiche Proteinkonzentration verdünnt. 20 µl des Zellysats wurden mit 5 µl Laemmlipuffer gemischt, auf 95 °C für 10 min erhitzt, zentrifugiert und die Geltaschen wurden mit der gleichen Proteinmenge und dem gleichen Gesamtvolumen beladen. Proteine wurden mittels einer SDS-PAGE elektrophoretisch wie bereits beschrieben (Schagger und Jagow 1987) mit Sammelgel und Trenngel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in einem diskontinuierlichen Puffersystem aus Anoden- und Kathodenpuffer für 15 min bei 70 V und 60-90 min bei 120 V durchgeführt.

2.8.7 Western Blot

Die Proteine wurden durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 400 mA für 2 h bei 4 °C von dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin *et al.* 1989). Die Membran wurde anschließend für 1 h mit Blockpuffer geblockt und mit primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C unter konstantem Durchmischen inkubiert. Die Membran wurde für vier Mal 10 min mit Blockpuffer geblockt, anschließend mit einem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert und mit Waschpuffer für vier Mal 10 min gewaschen. Die Bilder der Membran wurden mit einem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) erstellt (3.3.4).

2.8.8 Proteinaufreinigung

Proteine wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Opazo (*Molecular Probes for Quantitative Neurosciences, Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration, Göttingen*) hergestellt (Tabelle 4). Die Herstellungsmethode sei hier kurz dargestellt.

Nachdem eine Kultur mit *NEB® Express Competent E. coli* – für die Proteinaufreinigung von Rpn10, α Syn und β Syn – oder *SHuffle® Express Competent E. coli* (beide New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA) – für die Proteinaufreinigung von SynNb87 – mit dem jeweiligen Plasmid über Nacht in LB und Antibiotika gezüchtet worden war, wurden die Zellen mit 0,8 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) für 4 h bei 37 °C induziert. Nachdem 5 mM EDTA während Rotation hinzugefügt worden waren, wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 4.000 rpm für 30 minutes bei 10 °C gesammelt und bei -20 °C bis zur weiteren Nutzung eingefroren. Die Zellen wurden auf Eis mit 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT), 25 mM Imidazol und 1 mM PMSF in A500 Puffer (50 mM HEPES pH 8,0, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 10% Glycerol) mit frisch hinzugefügter DNase und Lysozym resuspendiert, bevor sie durch Ultraschall auf Eis lysiert wurden. Zelltrümmer wurden von der Flüssigkeit durch Zentrifugation bei 1.100 rpm für 1 h bei 4 °C getrennt. Die Proteine wurden nun unter Nutzung von *cOmplete™ His-Tag Purification Resin* aufgereinigt. 2 ml an voräquilibrierten Ni-beads wurden zum Überstand für 1 h hinzugefügt. Dies wurde auf eine Sigmasäule transferiert, welche anschließend mit 25 mM Imidazol in jeweils A500 Puffer, HS Puffer (50 mM HEPES pH 8,0, 1.000 mM NaCl, 10 mM MgCl₂

und 5% Glycerol) und B500 Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ und 5% Glycerol) gewaschen wurde. Schließlich wurde das Protein mittels 500 mM Imidazol in B500 Puffer herausgelöst. Eine SUMO-Protease wurde für 30 min hinzugefügt, um das Protein herauszuschneiden. Nachdem Ni-beads zur Reinigung hinzugefügt worden waren, wurde die Reinheit des Proteins mittels SDS-PAGE bestätigt. Die Proteine wurden in Aliquots bei -80 °C aufbewahrt und zur Verwendung auf Eis frisch aufgetaut.

2.9 Molekularbiologische Methoden

2.9.1 Plasmide

Plasmide wurden von Dr. Basmanav Ünalán (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Göttingen), Dr. Opazo (*Molecular Probes for Quantitative Neurosciences, Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration, Göttingen*) und Dr. Fornasiero (Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie, Göttingen) freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Tabelle 5).

2.9.2 Plasmidklonierung

Für das Klonieren von Plasmiden wurden Standardtechniken der molekularen Biologie angewandt.

2.9.2.1 Transformation

E.coli DH5-a (Invitrogen) chemokompetente Zellen wurden für die Transformation auf Eis aufgetaut und anschließend mit dem zu amplifizierenden Plasmid gemischt. Nach 20 min auf Eis wurden die Zellen bei 42 °C für 38 Sekunden hitzegeschockt und 3 min auf Eis gestellt. LB wurde hinzugefügt und nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 400 rpm (ThermoMixer C, Eppendorf) wurden die Zellen durch Zentrifugierung bei 4.000 rpm (Centrifuge 5424, Eppendorf) für eine Minute pelletiert. Das Pellet wurde in LB resuspendiert und auf LB Agarplatten mit passendem Antibiotikum geimpft, die über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2.9.2.2 Endotoxinfreie Midi-prep

Für die Vorkultur wurde eine Kolonie in 5 ml LB Medium mit Antibiotikum (1:1.000) gegeben und für 6 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert (Innova 42, Eppendorf). Anschließend wurde 1 ml der Bakterienlösung in 150 ml LB Medium mit Antibiotikum (1:1.000) bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden bei 1.000 g für 20 min bei 4 °C (Centrifuge 5804 R, Eppendorf) pelletiert. Die Midi-prep wurde mit NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) durchgeführt. Die Konzentration der DNA wurde mit einem NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bestimmt.

2.10 Bildgebung

2.10.1 Epifluoreszenzmikroskopische Bildgebung

Epifluoreszenzbilder wurden mittels eines Olympus IX71 Mikroskop (Olympus) erstellt, ausgestattet mit einem 20x Objektiv und einer *F-View II charge-coupled device* (CCD)-Kamera (1376 Pixel x 1032 Pixel; Pixelgröße 6,45 μm x 6,45 μm). Alle Filter wurden von Chroma gekauft und sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 12: Filterwürfel für Epifluoreszenzbildgebung.

Filter	Erregung	Beamsplitter	Emission
DAPI	350/50 D	400 DCLP	460/50 D
GFP	480/40 HQ	505 LP Q	527/30 HQ
TexasRed®	545/30 HQ	570 LP Q	610/75 HQ
Cy5	620/60 HQ	660 LP Q	700/75 HQ

Die verwendeten Objektive sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 13: Objektive für Epifluoreszenzbildgebung.

Linsentyp	Vergrößerung	Numerische Apertur
UPlanFL N	20x (trocken)	0,5
Plan N	10x (trocken)	0,25

Alle Bilder wurden – wenn nicht anders gekennzeichnet – mit dem Olympus IX 71 und der Software *Soft Imaging Systems cell^P* mit 20x-Vergrößerung erstellt, wobei im GFP-Kanal mit 500 ms, im Cy5-Kanal mit 500 ms (nur bei Experimenten mit Immunfluoreszenzfärbung), im TexasRed®-Kanal mit 350 ms und im DAPI-Kanal mit 3 ms akquiriert wurde (Abbildung 4, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27). Für alle Experimente mit *pTOM70-EGFP* wurde im GFP-Kanal mit 20 ms akquiriert (Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 22, Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25).

2.10.2 Konfokalmikroskopische Bildgebung

Konfokale Bilder wurden mit einem Leica LSM 150 Mikroskop erstellt, ausgestattet mit einem C-Apochromat 63x/1.2 W corr-Objektiv (1024 Pixel x 1024 Pixel; Pixelgröße 54 nm x 54 nm) (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 30).

Tabelle 14: Laser, Beamsplitter und Filter für konfokale Mikroskopie.

	GFP	mCherry
Laser	Argon2 bei 488 nm (10%)	HeNe bei 543 nm (11%)
Beamsplitter	HFT 488/543 und NFT 490	
Filter	BP 505-550	BP 560-615
Average	Line 16	
Master gain	668	991
Digital gain	1,00	1,01
Digital offset	0,10	
Pinhole	160 μm	72 μm

2.10.3 Automatische Bildgebung mittels Biotek Cytation 3 Imaging Reader

Die BCA Analyse wurde durchgeführt (Abbildung 3) und Bilder von 96-Well-Platten (Experimente mit Liquor: Abbildung 28, Abbildung 29) wurden aufgenommen mit einem Biotek Cytation 3 Imaging Reader ausgestattet mit einem 20x, Plan Fluorite WD 6.6 NA 0.45 Objektiv (Cat# 1220517), einer 465 nm LED (Cat # 1225001), einem GFP Filterwürfel (Cat# 1225101), einer 523 nm LED (Cat# 1225003) und einem RFP Filterwürfel (Cat# 1225103) und einer 16-bit monochromatischen CCD-Kamera (Pixelgröße 6,45 μm x 6,45 μm).

2.10.4 Bildgebung mit dem Amersham Imager 600

Für die Bildgebung von Dot Blots und Western Blots wurde ein Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) verwendet (Abbildung 6, Abbildung 11, Abbildung 12), ausgestattet mit einer 16-bit, 3,2 Megapixel super-honeycomb CCD-Kamera, mit einer Apertur von f/0,85 und einer FUJINON™ Linse.

2.11 Bildanalyse

Mit dem Olympus IX71 akquirierte mikroskopische Bilder (Abbildung 4, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16, Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22, Abbildung 23,

Abbildung 24, Abbildung 25, Abbildung 26, Abbildung 27) wurden mittels eines mit Matlab (The Mathworks Company) geschriebenen Makros (Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli) ausgewertet. Bei jedem Bild wurde zunächst das Hintergrundsignal entfernt, indem es in einer Region ermittelt wurde, welche per Hand ausgewählt wurde, und anschließend subtrahiert wurde. Daraufhin wurde anhand des DAPI-Signals jede Zelle ermittelt und ihr zugehöriges GFP- und mCherry-Signal bestimmt. Zellen mit veränderten Zellkernen, z. B. durch Apoptose, wurden eliminiert.

Die mit dem Biotek Cytation 3 akquirierten Bilder (Abbildung 28, Abbildung 29) wurden ebenfalls mittels eines mit Matlab (The Mathworks Company) geschriebenen Makros (Prof. Dr. Silvio O. Rizzoli) ausgewertet. Hierbei wurde durch das mCherry-Signal eine Zelle erkannt und der ihr zugehörige GFP-Wert ermittelt, nachdem das Hintergrundsignal automatisiert subtrahiert worden ist. Zellen mit einem mCherry-Wert > 700 AU wurden als tote Zellen und somit nicht gewertet.

Die gesamten geschriebenen Makros finden sich im Anhang (6).

Die mit dem Amersham Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences) akquirierten Bilder (Abbildung 6, Abbildung 11, Abbildung 12) wurden mittels ImageJ ausgewertet.

2.12 Statistische Auswertung

Alle Daten sind – wenn nicht anders gekennzeichnet – als Mittelwert \pm SEM (*standard error of mean*, Standardfehler) dargestellt. Zur statistischen Auswertung wurde SigmaPlot von Systat Software (San Jose, USA) oder GraphPad Prism (Graphpad Software Inc., San Diego, CA, USA) verwendet. P-Werte wurden – soweit nicht anders gekennzeichnet – mittels *Student's t-test (unpaired)* ermittelt. Für den Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen wurde ein *One-Way-ANOVA* und anschließend ein *Tukey's Post-hoc*-Test durchgeführt. Signifikanz wird als nicht-signifikant (ns) dargestellt, wenn $p > 0,05$; als *, wenn $p < 0,05$; als **, wenn $p < 0,01$, als ***, wenn $p < 0,001$, und als ****, wenn $p < 0,0001$.

3 Ergebnisse

Das erste Hauptziel der Arbeit war es, eine neue Methode zu charakterisieren und zu definieren, mittels welcher sich Proteine im Zytosol von Zellen nachweisen lassen. Hierzu wurde zunächst die Funktionsweise des bereits beschriebenen *Nanobodies* NbSyn87 überprüft (3.2). Anschließend wurde der Sensor in Zellen genauer betrachtet (3.3).

Als zweites Hauptziel der Arbeit sollte mithilfe des Sensors die Übertragung von α Syn zwischen Zellen untersucht werden. Zuerst wurden Experimente durchgeführt, um zu testen, ob und in welcher Form das Protein α Syn in Zellen eindringen kann (3.4). Als Exkurs wurde dabei die Übertragung von Plasmiden zwischen Zellen genauer angeschaut (3.5 und 3.6). Daraufhin wurden Kokulturen von α Syn-produzierenden Zellen und Sensorzellen angesetzt, um eine Übertragung zu prüfen (3.7).

Als drittes Hauptziel der Arbeit sollte Liquor von Parkinson-Patienten an den Sensorzellen getestet werden und hiermit untersucht werden, ob α Syn aus dem Liquor in das Zytosol von Zellen eindringt. Zusätzlich wurde geprüft, ob es zwischen Parkinson- und Kontrollpatienten einen Unterschied im Hinblick auf das Eindringungsverhalten von α Syn in Zellen gibt, was man als Diagnostikum nutzen könnte (3.9).

3.1 Nachvollziehung der Vorarbeiten im Labor

Die in der Einleitung beschriebene Hypothese sollte überprüft werden: Ist α Syn vorhanden, bindet es den *Nanobody* und führt so zu einer Stabilisierung des Sensors. Der Sensor akkumuliert somit in Zellen mit viel α Syn. Durch das angekoppelte GFP ist eine Anreicherung des Sensors in Zellen mit dem Mikroskop zu erkennen (durch das Kernlokalisations-signal wird das GFP im Kern konzentriert). Ist kein α Syn vorhanden, könnte der Sensor über das Proteasom abgebaut werden.

Zunächst wurden die im Labor bereits erfolgten Beobachtungen nachvollzogen. Dazu wurden die Sensorzellen mit *paSyn* oder als Kontrolle mit *pcDNA3.1(+)* transfiziert und anschließend mit einem Antikörper (anti- α / β Syn; Tabelle 3) gefärbt. Es zeigte sich, dass der Sensor in Anwesenheit von α Syn akkumuliert, sich in Abwesenheit von α Syn jedoch trotz erfolgreicher Doxycyclin-Induktion (durch mCherry erkennbar) kein GFP-Signal anreichert und der Sensor also nicht in den Zellen vorhanden zu sein scheint (Abbildung 4).

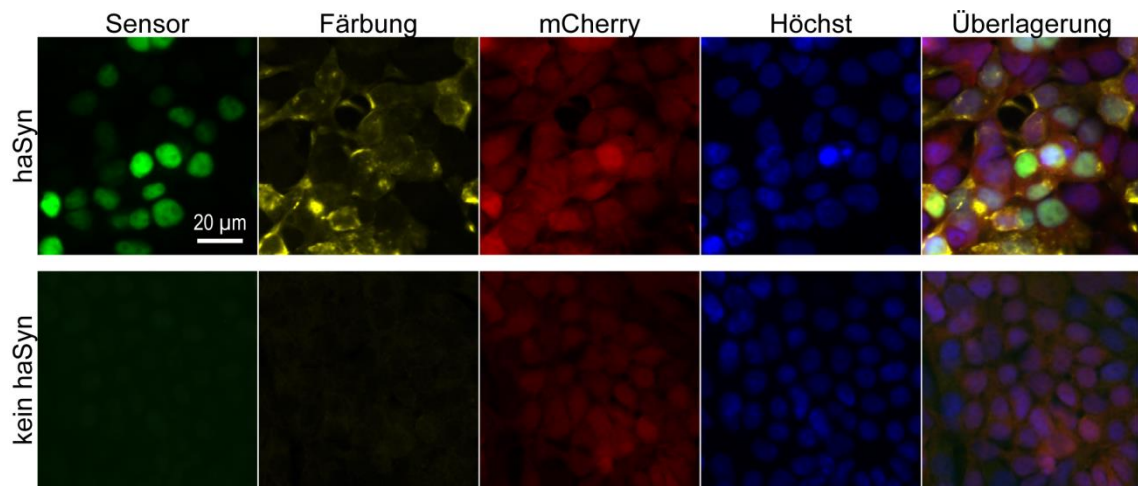


Abbildung 4: Sensorzellen mit und ohne humanem α Syn. Gleich skalierte repräsentative Bilder der Sensorzellen nach Transfektion mit humanem α Syn- und *pcDNA3.1(+)*-Plasmid als Kontrolle. Es wurde eine Färbung gegen α Syn durchgeführt.

Eine mit BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) durchgeführte Suche offenbarte eine Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von α Syn und der proteasomalen Untereinheit Rpn10 (auch *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4* genannt) des 26S-Proteasoms (Abbildung 5). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass der *Nanobody* und damit der Sensor in Abwesenheit von α Syn über das Proteasom abgebaut werden könnte, indem der *Nanobody* spezifisch an das Proteasom bindet. Es wurde vermutet, dass in Anwesenheit von α Syn der Sensor stärker an α Syn bindet als an Rpn10. Der Grund hierfür wäre, dass das Epitop des *Nanobodies* komplett mit der α Syn-Sequenz übereinstimmt, mit Rpn10 jedoch nur teilweise.

αSyn	101	GKNEEGAPQEGILEDMP	VDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP	EA	140
Rpn10	328	VMQDPEFLQSVLENLPG	VDPNNEA	IRNAMGSLASQATKDG	367

Abbildung 5: Abschnitt der Aminosäuresequenz von humanem α Syn und der humanen proteasomalen Untereinheit Rpn10. Schwarz hinterlegt ist das Epitop des Sensors (Aminosäuren 118-131). Grün hinterlegt sind die übereinstimmenden Aminosäuren von Rpn10 mit dem Epitop des Sensors.

3.2 Charakterisierung des *Nanobodies* NbSyn87

Aufgrund dieser Beobachtungen sollte zunächst der *Nanobody* charakterisiert werden und überprüft werden, ob und wie stark er, wie in der Theorie beschrieben, an α Syn und Rpn10 bindet, um so die Funktionsweise der Sensorzellen herauszufinden.

3.2.1 Bindungsnachweis an α -Synuclein und Rpn10 mittels *Dot Blot*

Um zu testen, ob der *Nanobody* NbSyn87 an α Syn und die proteasomale Untereinheit Rpn10 bindet, wurden drei unabhängige *Dot Blots* durchgeführt (Abbildung 6). Dazu wurde α Syn oder Rpn10 seriell auf verschiedene Konzentrationen verdünnt und auf eine Nitrozel-

lulosemembran aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden 5 μg BSA aufgetragen. Die Membran wurde in fluoreszent markiertem *Nanobody* NbSyn87-Alexa647 inkubiert (2.8.2). Die Fluoreszenz nimmt sowohl bei αSyn (Abbildung 6 A) als auch bei Rpn10 (Abbildung 6 B) mit steigender Konzentration an aufgetragenem Protein zu. Für Rpn10 nimmt die Fluoreszenz jedoch schwächer und erst bei höherer Konzentration zu, wie auch in der quantitativen Analyse zu erkennen ist. Bei Rpn10 gibt es erst ab ca. 5 μM an Rpn10 eine größere Änderung der Hintergrund-korrigierten Fluoreszenz (Mittelwert [5 μM] - Mittelwert [0 μM] = 0,04099 AU). Eine vergleichbare Veränderung der Hintergrund-korrigierten Fluoreszenz gibt es bei αSyn bereits bei einer 10-fach geringeren Konzentration, nämlich bei 0,5 μM (Mittelwert [0,5 μM] - Mittelwert [0 μM] = 0,04971 AU). Der *Nanobody* bindet somit gleich viele Rpn10- wie αSyn -Epitope, wenn Rpn10 in 10-fach höherer Konzentration als αSyn vorliegt.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der *Nanobody* beide Proteine binden kann, allerdings an αSyn stärker als an Rpn10 zu binden scheint. Eine durchgeführte Alignement-Analyse zeigt eine teilweise Übereinstimmung der Aminosäuresequenz zwischen dem αSyn -Epitop des *Nanobodies* und verschiedenen Arten an Rpn10, was die schwächere Bindung an Rpn10 erklären könnte.

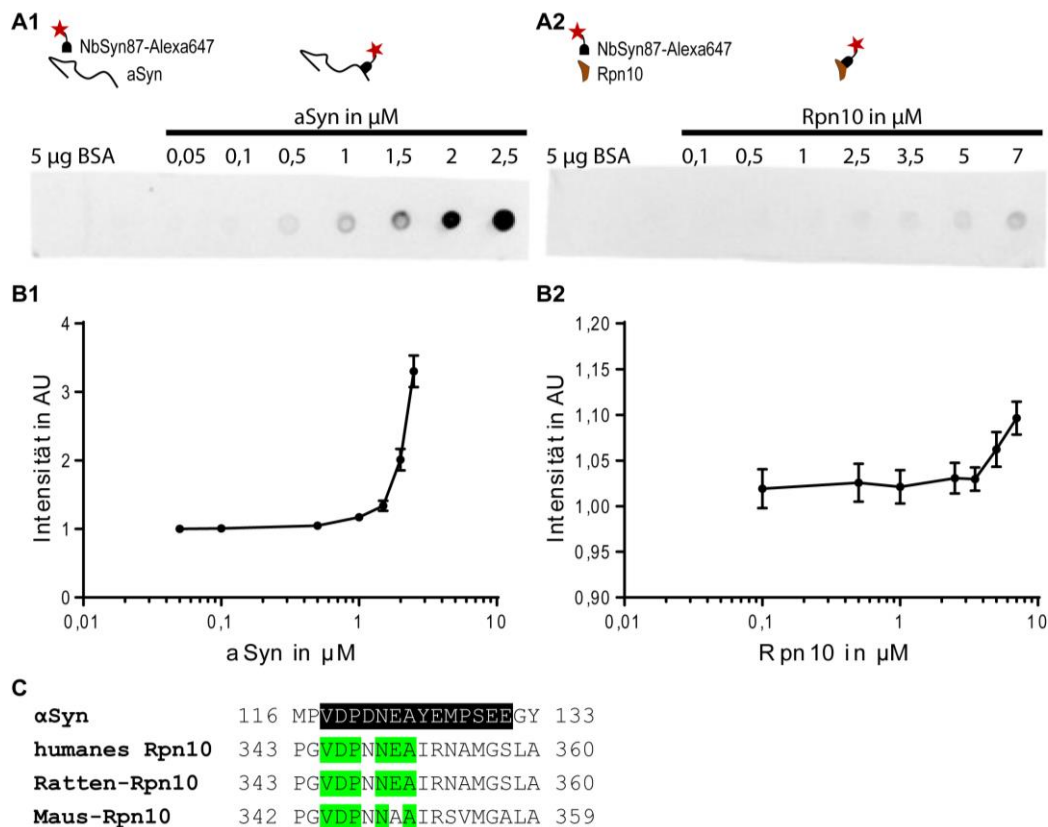


Abbildung 6: *Dot Blot*. **A1** und **A2**: Gleich skalierte repräsentative *Dot Blots* von αSyn und Rpn10. **B1**: Quantitative Analyse von drei unabhängigen *Dot Blots* mit αSyn . Auf der y-Achse ist die Hintergrund-korrigierte Cy5-Intensität in AU aufgetragen. **B2**: Quantitative Analyse von drei unabhängigen *Dot Blots* mit Rpn10. Auf der y-Achse ist die Hintergrund-korrigierte Cy5-Intensität in AU aufgetragen. **C**: Aminosäuren-Alignment-Analyse von humanem αSyn sowie Menschen-, Ratten- und Maus-Rpn10.

3.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d

Mittels eines Nanotemper Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies GmbH; s. 2.8.3 Dissoziationskonstanten (K_d)-Bestimmung) unter Nutzung einer *Microscale Thermophoresis* wurde die Bindungskonstante K_d des *Nanobodies* NbSyn87 sowohl an αSyn als auch an Rpn10 bestimmt.

3.2.2.1 Funktionsweise des Nanotemper Monolith NT.115

Zur Messung der K_d mit einem Nanotemper Monolith NT.115 wurde in Glaskapillaren eine serielle Verdünnung von Protein (in diesem Fall αSyn) angesetzt und zu jeder Proteinkonzentration die gleiche Konzentration an Bindungsprotein (in diesem Fall NbSyn87-Alexa647) hinzugegeben. Zur Messung einer Dissoziationskonstanten wurde in die Hälfte der Kapillaren nur Bindungsprotein (NbSyn87-Alexa647), in die andere Hälfte zusätzlich Protein (αSyn oder Rpn10) hinzugegeben.

Zunächst ermittelt das Gerät die *Photobleaching*-Rate, die durch das Exzitationslicht erzeugt wird, und definiert die anfangs gemessene Fluoreszenz als 1,00 (s. Abbildung 7 A). Darauf-

hin erhitzt ein Infrarotlaser die Glaskapillaren lokal, sodass sich die Moleküle von hier fortbewegen. Mithilfe des Exzitationslichtes, welches in diesem Fall den fluoreszent markierten *Nanobody* NbSyn87-Alexa647 anregt, misst es, wie viele fluoreszent markierte Moleküle am lokalen Punkt der Erhitzung noch vorhanden sind und wie schnell diese Fluoreszenz abnimmt. Hierdurch wird indirekt bestimmt, wie schnell sich die Moleküle von dem erhitzten Punkt fortbewegen. Die gebundenen Moleküle bewegen sich langsamer fort als die ungebundenen, sodass die Fluoreszenz hier über längere Zeit stärker ist. Hieraus kann einerseits bestimmt werden, ob überhaupt eine Bindung vorliegt (Bindungsscheck) und zweitens, ab was für einer Konzentration an Zielprotein (Rpn10 oder α Syn) eine Bindung stattfindet (entspricht der K_d).

3.2.2.2 Der *Nanobody* bindet an α Syn ca. 1.000 Mal besser als an Rpn10

Zunächst sollte überprüft werden, wie stark NbSyn87 an α Syn bindet (Abbildung 7 B). Es wurden 5 nM NbSyn87-Alexa647 zu verschiedenen Konzentrationen an α Syn in drei unabhängigen Experimenten gegeben. Die K_d betrug bei 25° C $13,9362 \pm 5,8425$ nM. Die Antwortamplitude betrug 9,4601 bei einer *Signal to Noise Ratio* von 11,7746.

Zudem sollte überprüft werden, ob und wie stark NbSyn87 an die proteasomale Untereinheit Rpn10 bindet, um zu schauen, ob ein proteasomaler Abbau möglich ist. Es wurde ein Bindungsscheck durchgeführt (Abbildung 7 C). Hierzu wurden in technischer Quadruplikation 10 nM NbSyn87-Alexa647 einmal mit 25 μ M Rpn10 und einmal ohne Rpn10 ange-setzt. Die Antwortamplitude betrug 6,8 ‰ normalisierte Fluoreszenz bei einer *Signal to Noise Ratio* von 26,2. Die Bindung konnte damit bestätigt werden. Zudem wurde die K_d zwischen *Nanobody* und Rpn10 bestimmt (freundlicherweise durch Natalia Waal, B. Sc., zur Verfügung gestellt, Daten hier nicht dargestellt). Die K_d betrug bei 25° C $14,60 \mu\text{M} \pm 3,729 \mu\text{M}$.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der *Nanobody* sowohl α Syn als auch Rpn10 bindet und dabei ca. 1.000 Mal stärker an α Syn.

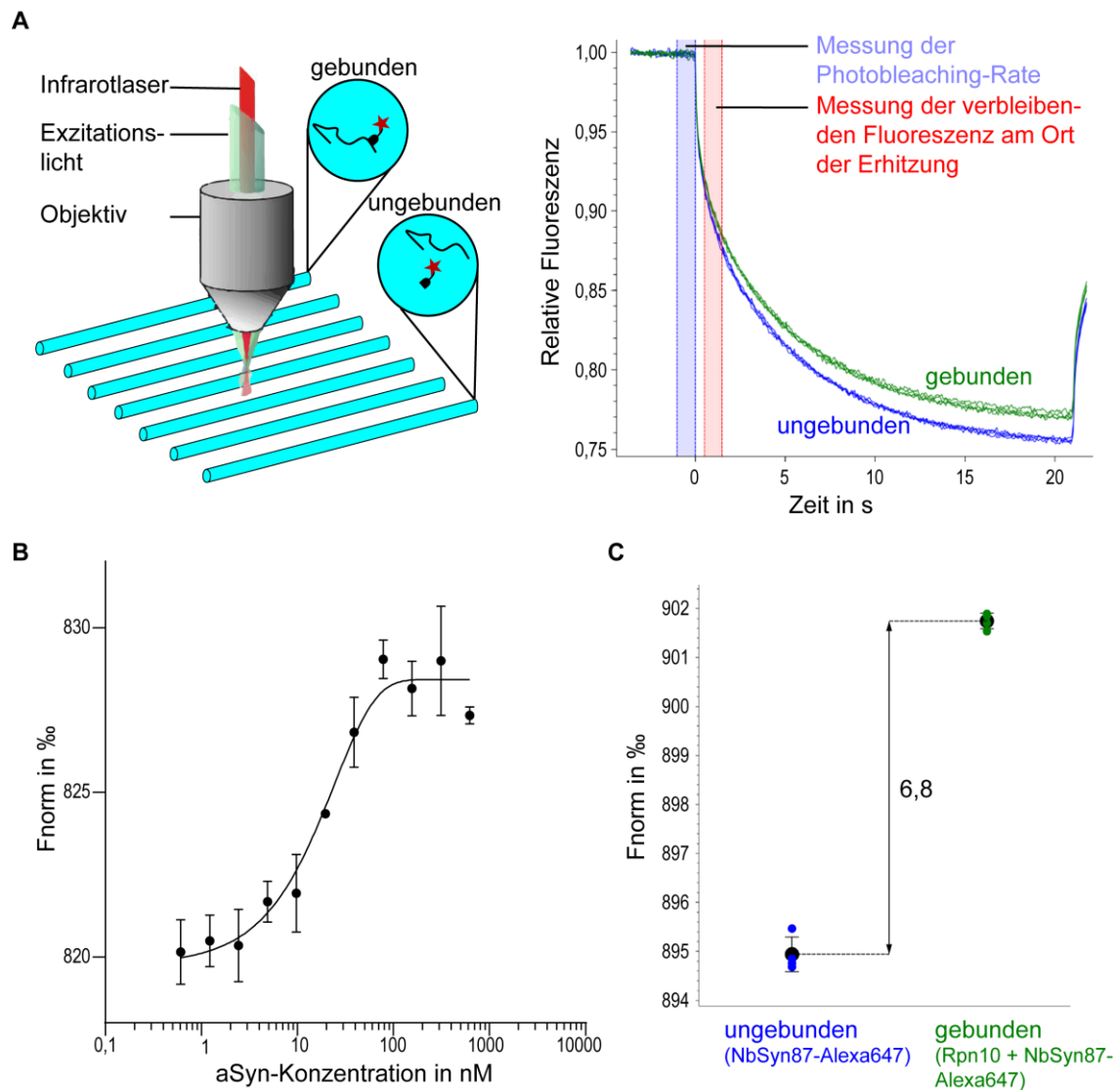


Abbildung 7: NbSyn87 bindet α Syn mit einer K_d von 13,9 nM und bindet Rpn10. **A:** Funktionsweise des Nanotemper Monolith NT.115. Die Abbildung wurde in Anlehnung an eine Abbildung mit Erlaubnis der NanoTemper Technologies GmbH erstellt. **B:** K_d -Bestimmung zwischen NbSyn87 und α Syn. F_{norm} ist die auf 1,00 normalisierte Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. **C:** Bindungscheck zwischen NbSyn87 und Rpn10. F_{norm} ist die auf 1,00 normalisierte Fluoreszenz. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM aus vier technischen Wiederholungen dargestellt.

3.3 Charakterisierung der Sensorzellen

Nachdem der *Nanobody* NbSyn87 genauer untersucht worden war, sollte das Wirkprinzip eines Sensors in Zellen untersucht werden. Die Sensorzellen waren dabei eine mit dem Sensor stabil transfizierte Zelllinie, wobei der Sensor aus dem *Nanobody* NbSyn87, einem daran gekoppelten GFP und einem Kernlokalisierungssignal bestand (1.4).

3.3.1 Proteasominhibition mittels MG 132-Gabe in verschiedenen Konzentrationen

Um zu prüfen, ob der *Nanobody* und damit der Sensor in Zellen an das Proteasom bindet und somit hierrüber abgebaut werden könnte, wurde das Proteasom in Sensorzellen inhibiert.

Der proteasomale Inhibitor MG 132 wurde auf Sensorzellen in einer Konzentration von 1 nM, 500 nM und 1.000 nM gegeben. Als Kontrolle wurde nur DMSO gegeben (2.6.7).

Ohne Proteasominhibitor lässt sich nur ein extrem niedriges Sensorsignal nachweisen, die Zellen erscheinen schwarz. Im Vergleich dazu lässt sich mCherry, welches wegen des T2A-Systems in exakt gleicher Menge wie der Sensor gebildet wird, deutlich nachweisen. Je mehr Proteasominhibitor MG 132 gegeben wurde, desto stärker wurde das Sensorsignal, ab 500 nM MG 132 gab es bereits einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (0 nM MG 132). Um zu überprüfen, ob dieser Anstieg stärker als bei anderen Proteinen innerhalb der Zellen war, wurde das Verhältnis zwischen Sensor und mCherry errechnet, welches ab einer Konzentration von 500 nM MG 132 signifikant von der Kontrolle abwich.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor über das Proteasom abgebaut wird und das deutlich stärker als mCherry.

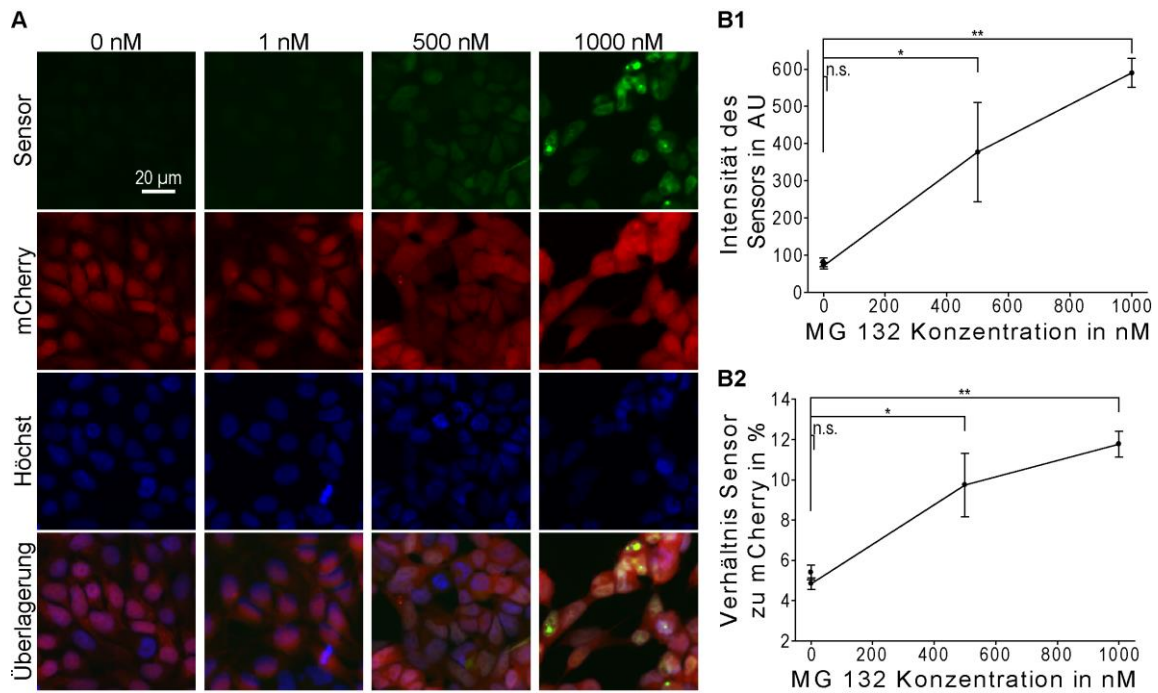


Abbildung 8: MG 132-Gabe in verschiedenen Konzentrationen. **A**: Gleich skalierte repräsentative Bilder. Man erkennt bei zunehmender Konzentration an Proteasominhibitor einen zunehmenden Signalanstieg des Sensors. **B**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt in der Analyse zeigt den errechneten Mittelwert \pm SEM. Pro Experiment und Kondition wurden mehr als 1.200 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt. **B1**: Analyse des ansteigenden Sensorsignals. **B2**: Analyse des Verhältnisses Sensor zu mCherry (Sensor/mCherry) in %.

3.3.2 Proteasominhibition mittels MG 132-Gabe über unterschiedliche Dauer

Zusätzlich sollte überprüft werden, ob sich ein zeitlicher Verlauf des Sensorabbaus über das Proteasom zeigt. Dafür wurde das Proteasom in Sensorzellen mit MG 132 inhibiert und anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten fixiert. Als Kontrolle wurde nur DMSO gegeben (2.6.7).

Im Vergleich zur Kontrolle nahm das Sensorsignal ab 4 h signifikant zu. Bereits nach 2 h stieg das Verhältnis zwischen Sensor und mCherry signifikant an.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor ständig in hohem Maße über das Proteasom abgebaut wird und das deutlich stärker als mCherry.

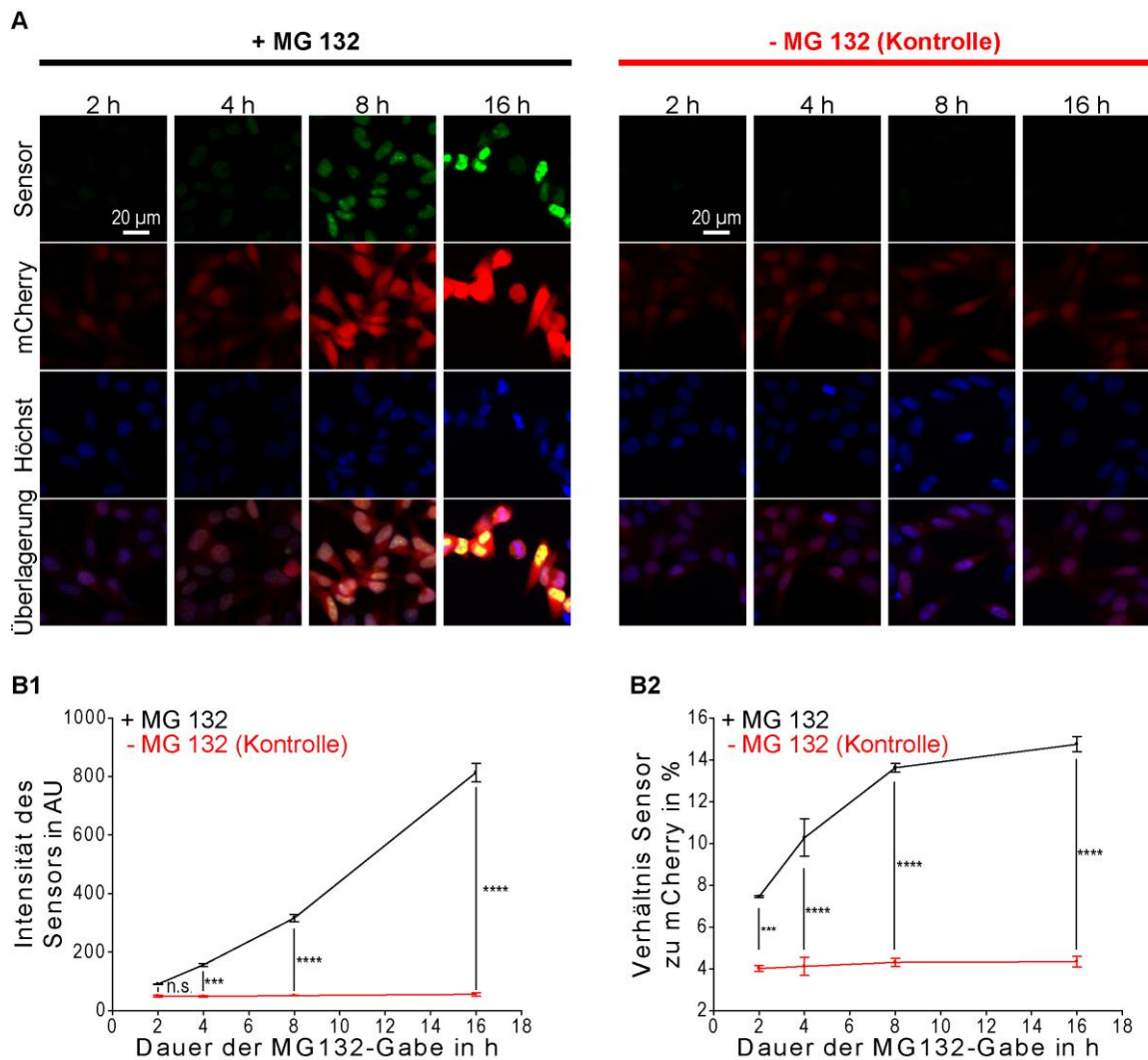


Abbildung 9: MG 132-Gabe über unterschiedliche Dauer. **A**: Gleich skalierte repräsentative Bilder. Man erkennt bei zunehmender Dauer der MG 132-Gabe einen zunehmenden Signalanstieg des Sensors. **B**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Jeder Punkt in der Analyse zeigt den errechneten Mittelwert \pm SEM. Pro Experiment und Kondition wurden mehr als 540 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt. **B1**: Analyse des ansteigenden Sensorsignals. **B2**: Analyse des Verhältnisses Sensor zu mCherry (Sensor/mCherry) in %.

3.3.3 Sensitivität des Sensors

Um zu schauen, ob der Sensor in Abhängigkeit von der Konzentration von α Syn stabilisiert wird und in diesem Fall nicht mehr über das Proteasom abgebaut wird, wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an *paSyn*-Plasmid transfiziert (2.6.8).

Das Sensorsignal nahm mit zunehmender *paSyn*-Plasmidmenge zu, bis es eine Sättigung bei ca. 40% erreichte. Bereits ab einer Plasmidmenge von 0,05 μ g zeigte sich ein stärkeres Sensorsignal (Abbildung 10), welches sich ab 0,2 μ g Plasmid signifikant von der Kontrolle unterschied.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor direkt abhängig von der α Syn-Konzentration in der Zelle stabilisiert wird.

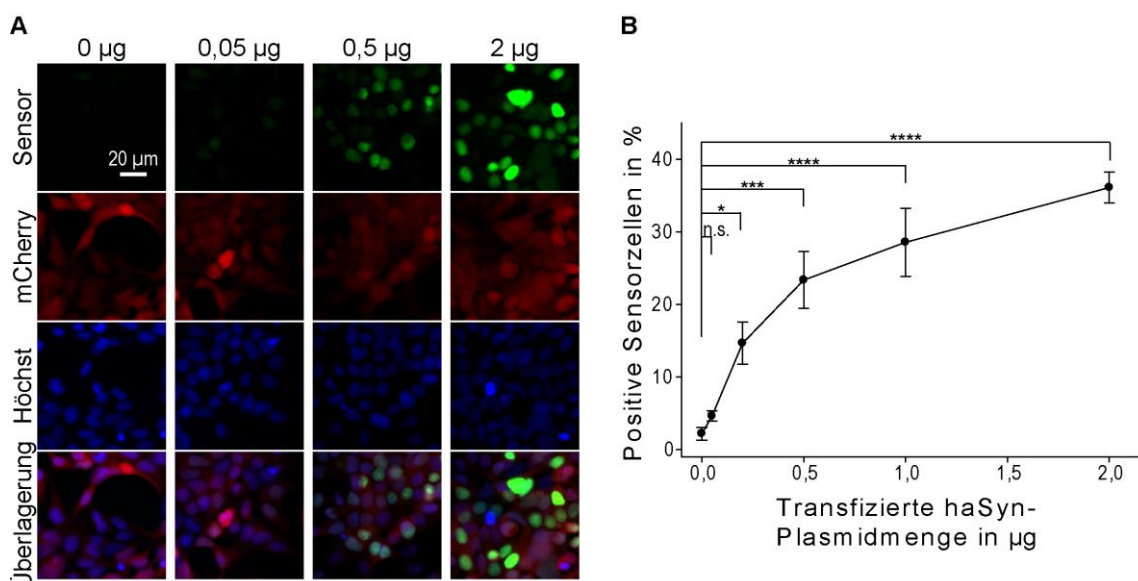


Abbildung 10: Sensitivität des Sensors. **A:** Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. Mit zunehmender α Syn-Plasmidmenge erkennt man ein zunehmendes Sensorsignal. **B:** Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 1.087 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt.

3.3.4 Biochemischer Nachweis des Sensors mittels *Western Blot*

Der Sensor sollte biochemisch nachgewiesen werden und hierbei seine Anreicherung in Abhängigkeit von α Syn überprüft werden.

Hierzu wurden die Sensorzellen mit unterschiedlichen Mengen an *paSyn*-Plasmid transfiziert. Wenn weniger als 2 µg *paSyn*-Plasmid transfiziert wurden, wurde die Plasmidmenge mit einer *backbone*-DNA (*pcDNA3.1(+)*) auf eine gleiche absolute Plasmidmenge von 2 µg aufgefüllt. Die Zellen wurden lysiert (2.8.4), ein BCA (2.8.5) zur Bestimmung der totalen Proteinkonzentration durchgeführt, eine SDS-PAGE (2.8.6) und ein *Western Blot* (2.8.7) durchgeführt. Ein anti-GFP- und anti- α Syn-Antikörper (Tabelle 3) wurde gegeben. Der Sensor sollte über einen anti-GFP-Antikörper nachgewiesen werden, da GFP Bestandteil des Sensors ist. Zusätzlich wurde auf einer identischen zweiten Membran ein anti- β -Actin-Antikörper gegeben, um so eine gleiche Proteinladungsmenge pro Tasche zu überprüfen, die durch das vorherige BCA bereits sichergestellt sein sollte.

In Abbildung 11 A erkennt man mit zunehmender transfizierter α Syn-Plasmidmenge ein zunehmendes Sensorsignal vergleichbar mit Abbildung 10, wobei die hier schlechtere Qualität durch Aufnahme der Bilder durch den Plastikboden einer 12-well-Platte hindurch zu erklären war. Somit konnte gezeigt werden, dass die Zellen erfolgreich transfiziert wurden und ein reproduzierbares Ergebnis des Sensitivitätstests liefern.

Der mit dem Zellysat durchgeführte *Western Blot* zeigte bei 45 kDa ein deutliches Signal (anti-GFP, Abbildung 11), welches dem Sensor entsprach. Dieses Molekulargewicht passt

gut mit einer theoretischen Größe von 45 kDa überein, die sich aus erstens ca. 30 kDa für das GFP und zweitens ca. 15 kDa für den *Nanobody* zusammensetzt, aus welchen der Sensor besteht. Auf der zweiten Membran zeigte sich bei 45 kDa ein gleich bleibendes β -Actin-Signal: somit ist die gleiche Proteinmenge geladen worden. Bereits ab einer transfizierten Plasmidmenge von 0,05 μg schien das Sensorsignal zuzunehmen, ab 0,5 μg erkannte man einen eindeutigen Unterschied zur Kontrolle. Die quantitative Analyse zeigte ebenso einen Anstieg des Sensors bei gleichbleibender Intensität des β -Actin. Interessanterweise erkannte man auch bei nicht *paSyn* transfizierten Sensorzellen ein schwaches GFP-Signal. Es wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor direkt abhängig von der αSyn -Konzentration in der Zelle stabilisiert wird und sich in den Zellen anreichert.

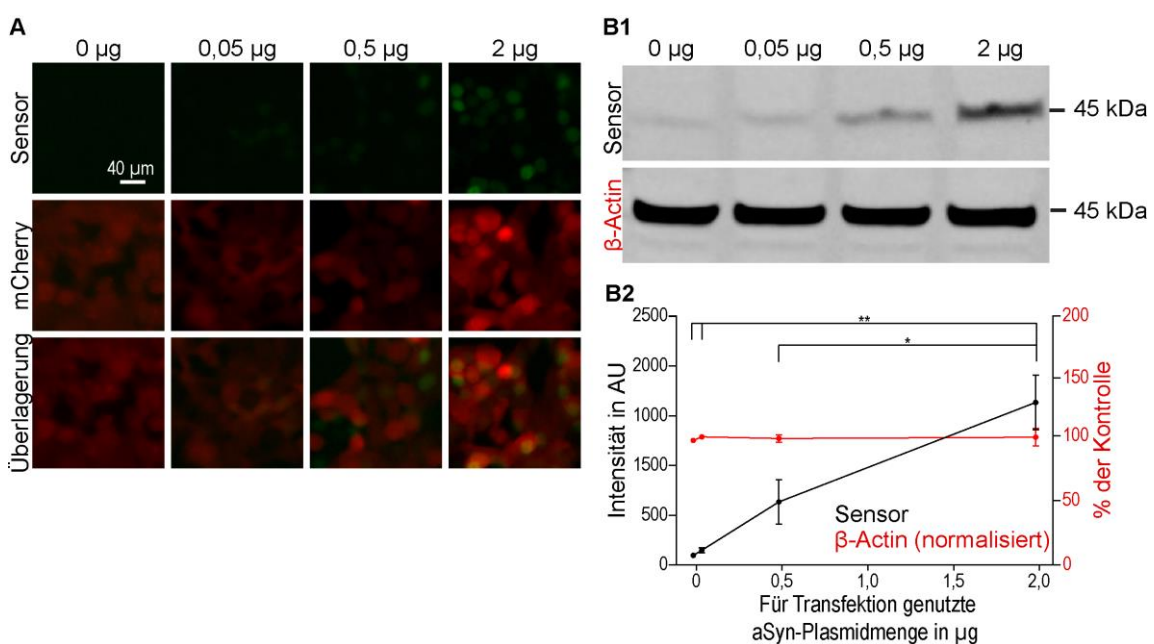


Abbildung 11: *Western Blot* des Sensors. **A**: Gleich skalierte repräsentative Bilder der Sensorzellen unmittelbar vor Lyse. Die Bilder wurden mit einem 10x-Objektiv aufgenommen. **B**: *Western Blot* der lysierten Sensorzellen. **B1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des *Western Blots*. Man erkennt mit zunehmender transfizierter *paSyn*-Plasmidmenge (0-2 μg) eine Zunahme der Bande mit Sensor, während die β -Actin-Banden gleich intensiv erscheinen. **B2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Die Sensorwerte sind aufgetragen als Hintergrund-korrigierte Intensität in AU. Die β -Actin-Werte wurden auf die Kontrolle normalisiert und sind somit in % der Kontrolle dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen αSyn eingesetzt, welcher – wie zu erwarten – zeigt, dass mit zunehmender transfizierter *paSyn*-Plasmidmenge auch zunehmend viel αSyn in den Zellen vorhanden ist (Abbildung 12), wobei auch hierfür die β -Actin-Kontrolle aus Abbildung 11 gilt, welche zeigt, dass die gleiche Menge an Gesamtprotein aufgetragen worden ist.

Zusätzlich zu dem Zellysate wurde aufgereinigtes α Syn (2.8.8) in verschiedenen Konzentrationen direkt auf das Gel aufgetragen, um so eine Eichkurve zu erstellen. Mithilfe der gemessenen Intensitäten je aufgetragenem α Syn (Abbildung 12 B1) wurde eine Regression berechnet ($f(x) = 23.484 * \left(1 - \frac{1}{(0,3417*x)}\right)$), welche im Anfangsbereich eine annähernde Linearität zeigt. Aus der in B1 gemessenen Intensität wurde über die Regression die in den lysierten Sensorzellen vorhandene α Syn-Menge in μ g berechnet (Abbildung 12 und Tabelle 15).

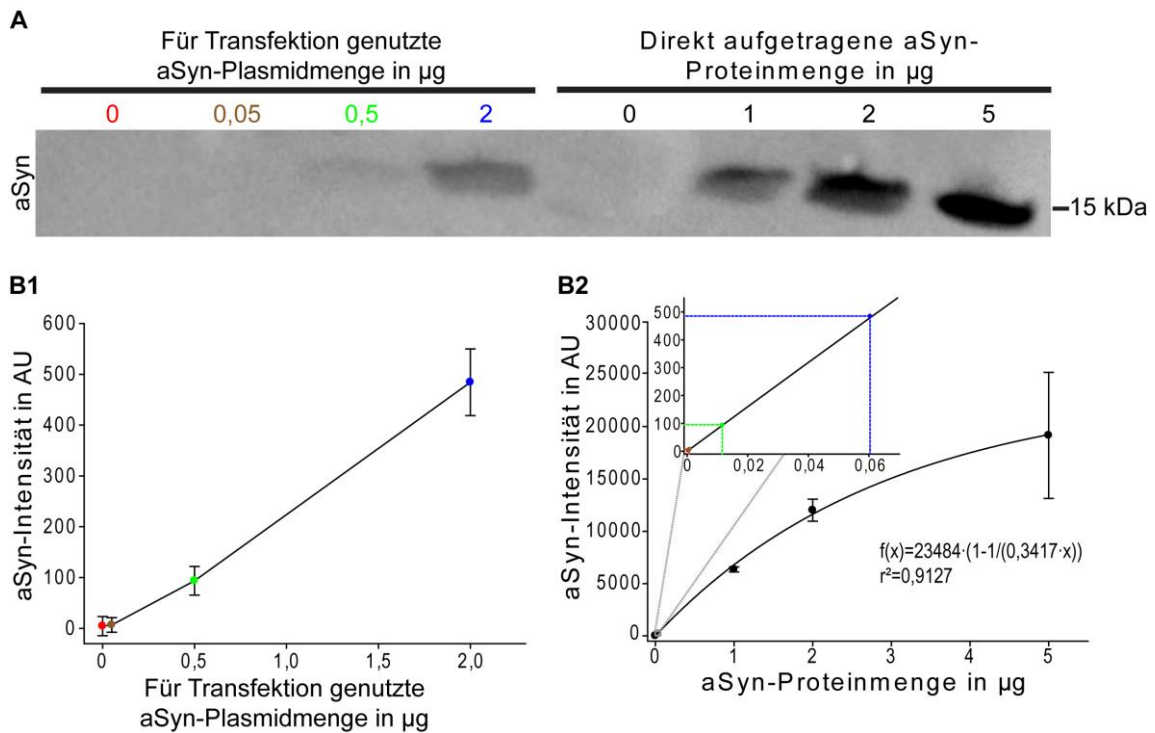


Abbildung 12: *Western Blot* α Syn. **A**: Repräsentatives Bild des gleichen *Western Blots* wie in Abbildung 11 mit anti- α Syn-Antikörper sowie des direkt aufgetragenen α Syn. **B**: Aufgetragen ist die Hintergrund-korrigierte Intensität in AU als Mittelwert \pm Standardabweichung. **B1**: Quantitative Analyse des α Syn in lysierten Zellen aus zwei unabhängigen Experimenten. **B2**: Quantitative Analyse des direkt aufgetragenen α Syn aus zwei unabhängigen Experimenten. Mithilfe des direkt aufgetragenen α Syn wurde eine Regression berechnet ($f(x) = 23.484 * \left(1 - \frac{1}{(0,3417*x)}\right)$), auf welche die Intensität aus B1 aufgetragen wurde und wober die in den lysierten Sensorzellen vorhandene α Syn-Menge in μ g berechnet wurde.

Tabelle 15: Berechnung der α Syn-Menge im Zellysate.

Transfizierte Plasmidmenge	$p\alpha$ Syn-	0 μ g	0,05 μ g	0,5 μ g	2 μ g
Intensität (Mittelwert aus technischer Duplikation)		4,4395 AU	6,7965 AU	93,6715 AU	484,388 AU

Transfizierte <i>pαSyn</i> - Plasmidmenge	0 µg	0,05 µg	0,5 µg	2 µg
$f(x) = a * \left(1 - \frac{1}{(b*x)}\right)$ mit $a=23.484$ und $b=0,3417$	$4,4395 = a * \left(1 - \frac{1}{(b*x)}\right)$	$6,7965 = a * \left(1 - \frac{1}{(b*x)}\right)$	$93,6715 = a * \left(1 - \frac{1}{(b*x)}\right)$	$484,388 = a * \left(1 - \frac{1}{(b*x)}\right)$
x (αSyn im Lysat) in g	$0,5532384 * 10^{-9}$	$0,84696139 * 10^{-9}$	$11,6730882 * 10^{-9}$	$60,3631183 * 10^{-9}$
x (αSyn im Lysat) in g (Hintergrund-korrigiert)	0	$0,29372295 * 10^{-9}$	$11,1198498 * 10^{-9}$	$59,8098799 * 10^{-9}$

Mithilfe der hier bestimmten Menge αSyn im Zellysat sollte eine ungefähre Annäherung als *educated guess* berechnet werden, wie viel M αSyn in den Zellen, g αSyn/l Zellen und wie viel g αSyn pro einzelner Zelle in den vier verschiedenen Konditionen vorhanden sind, um so einschätzen zu können, ab wie viel αSyn der Sensor positiv wird. Dies wurde mit folgender Formel berechnet (die Bedeutung der Variablen ist Tabelle 16 zu entnehmen):

$$y = \frac{\left(\frac{\alpha\text{Syn [g]}}{M[\alpha\text{Syn}] \left[\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right]} \right)}{(n [W] * n [Z] * (T) * (E) * \left(\frac{L [L]}{V (L) [l]} \right) * (V (Z) [l])}$$

Tabelle 16: Bedeutung und genaue Bestimmung der Variablen.

Variable	Bedeutung der Variablen	Zuordnung einer Zahl zur Variablen
αSyn	Mittels <i>Western Blot</i> gemessenes αSyn.	4 Konditionen, siehe Tabelle 15 letzte Zeile.
M [αSyn]	Molekulare Masse von αSyn.	<u>14.500 g/mol</u> (Wales <i>et al.</i> 2013).
n (W)	Anzahl der Wells pro Kondition.	<u>3</u> Wells wurden pro Kondition genutzt und beim Lysieren gepoolt.
n (Z)	Anzahl der Zellen pro Well, welche im eigentlichen Experiment 3.3.4 für den <i>Western Blot</i> lysiert wurden.	Durch drei unabhängige Experimente wurde die Zellzahl pro Well bestimmt. Hierzu wurden wie im eigentlichen Experiment 140000 Zellen pro Well ausgesät und nach 48 h transfiziert. 96 h nach Aussaat wurden die Zellen pro Well ausgezählt. Mittelwert: <u>724.667 Zellen/Well</u> .
T	Prozentanteil an transfizierten Zellen	Mindestens <u>36%</u> der Zellen wurden transfiziert, wie in 3.3.3 gezeigt.

Variable	Bedeutung der Variablen	Zuordnung einer Zahl zur Variablen
E	Prozentanteil an eingesammelten Zellen	Etwa <u>80%</u> der Zellen wurden eingesammelt: a. Etwa 10% blieben an Glas oder Zellschaber hängen. b. 10% wurden nicht eingesammelt, weil nur 135 μl (V(L)) von 150 μl genutztem Lysepuffer wieder eingesammelt wurden, d. h. 15 μl verblieben im Well.
L	Menge des auf SDS-Gel geladenes Zelllysates	<u>20 μl</u> von 135 μl eingesammelten Zelllysates (V(L)) wurden auf SDS-Gel aufgetragen.
V (L)	Volumen des eingesammelten Gesamt-Zelllysats	<u>135 μl</u> von 150 μl genutztem Lysepuffer wurden wieder eingesammelt.
V (Z)	Volumen einer einzelnen HEK293-Zelle	Zytoplasma-Volumen: <u>$2.664 \cdot 10^{-15} \text{l}$</u> ((<i>Ta et al.</i> 2015) <i>Supplementary Figure 10</i>)

Zur Bestimmung der M αSyn in den Zellen wurde folgende Formel verwendet:

$$y = \frac{\left(\frac{(x \text{ g})}{14.500 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} \right)}{\left(3 * 724.667 * 0,36 * 0,8 * \left(\frac{20 * 10^{-6} \text{l}}{135 * 10^{-6} \text{l}} \right) * (2.664 * 10^{-15} \text{l}) \right)} = z [\text{M}]$$

Zur Bestimmung der g αSyn /l Zellen wurde folgende Formel verwendet:

$$y = \frac{(x * 10^{-9} \text{g})}{\left(3 * 724.667 * 0,36 * 0,8 * \left(\frac{20 * 10^{-6} \text{l}}{135 * 10^{-6} \text{l}} \right) * (2.664 * 10^{-15} \text{l}) \right)} = z \left[\frac{\text{g}}{\text{l}} \right]$$

Zur Bestimmung der g αSyn pro einer einzelnen Zelle wurde folgende Formel verwendet:

$$y = \frac{(x * 10^{-9} \text{g})}{\left(3 * 724.667 * 0,36 * 0,8 * \left(\frac{20 * 10^{-6} \text{l}}{135 * 10^{-6} \text{l}} \right) \right)} = z \left[\frac{\text{g}}{\text{Zelle}} \right]$$

Zur Bestimmung der zur Aktivierung des Sensors benötigten Moleküle an αSyn pro Zelle bzw. der zur Aufleuchtung einer Zelle benötigten Moleküle GFP pro Zelle wurde folgende Formel verwendet:

$$y = x M * (2.664 * 10^{-1}) = x \frac{\text{mol}}{\text{l}} * 6,02214 * 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}} * (2.664 * 10^{-15})$$

$$= x * 1.604.298,096 \text{ Moleküle} = z \text{ Moleküle}$$

Tabelle 17: Vorhandene Menge an α Syn in einer einzelnen Zelle.

Transfizierte <i>paSyn</i> -Plasmidmenge (Hintergrund-korrigiert)	0 μg	0,05 μg	0,5 μg	2 μg
α Syn im Lysat in g	0	$0,29372295 * 10^{-9}$	$11,1198498 * 10^{-9}$	$59,8098799 * 10^{-9}$
mol α Syn pro l Zellen	0	$0,08197609 * 10^{-6}$	$3,10347495 * 10^{-6}$	$16,6925334 * 10^{-6}$
g α Syn pro l Zellen	0	0,00118865	0,04500039	0,24204173
g α Syn in einer Zelle	0	$3,17 * 10^{-15}$	$1,20 * 10^{-13}$	$6,45 * 10^{-13}$
Moleküle α Syn (oder GFP) in einer Zelle	0	$0,1315140851 * 10^6$	$4,978898953 * 10^6$	$26,77979955 * 10^6$

Da bereits ab einer Transfektion von 0,5 μg (bzw. bereits ab 0,2 μg) *paSyn* signifikant mehr Sensorzellen positiv waren (3.2.4) und auch im *Western Blot* hier bereits α Syn nachgewiesen werden konnte, wird dies als Grenze für positive Sensorzellen genommen. Somit sind, um eine Sensorzelle positiv werden zu lassen, maximal 3 μM α Syn notwendig. Dies entspricht in einer durchschnittlichen HEK293-Zelle ca. 120 fg α Syn oder ca. 5 Millionen Molekülen α Syn und damit GFP.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor sehr sensitiv ist und für die Zellkultur nutzbar ist.

3.3.5 Spezifität der Sensorzellen

Die Sensorzellen wurden mit humanem *paSyn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*), humanem *p β Syn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*), Ratten (*Rattus norvegicus*)-*praSyn*-Plasmid (in *pcDNA3.1(+)*) und einem leeren *pcDNA3.1(+)*-Plasmid als Kontrolle transfiziert (2.6.7). Durch das gleiche *backbone* wurden etwaige Unterschiede aufgrund unterschiedlicher Plasmide ausgeschlossen. Als Kontrolle, ob ein unterschiedliches Signal des Sensors zwischen den Konditionen auf eine Spezifität des Sensors für ein bestimmtes Protein zurückzuführen ist oder ob der Unterschied im Signal nur an unterschiedlicher Transfektionseffizienz liegt, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α Syn durchgeführt. Hierfür wurde ein Primärantikörper genutzt, welcher α - und β -Synuclein unterschiedlicher Spezies (einschließlich Mensch und Ratte) detektieren kann (anti- α/β Syn; Tabelle 3).

In der Immunfluoreszenzfärbung zeigten alle drei mit Synuclein transfizierten Konditionen hochsignifikant häufiger ein positives Signal als die Kontrolle (Abbildung 14). Der Anti-

körper hatte somit spezifisch gegen Synuclein gefärbt. Auch wenn die Signale sich zwischen den anderen Konditionen etwas unterschieden, zeigte sich zwischen *paSyn* und *pβSyn* sowie *paSyn* und *praSyn* kein signifikanter Unterschied. Somit waren alle diese drei Konditionen gleich effizient transfiziert. Mit α Syn-Plasmid transfizierte Sensorzellen zeigten hochsignifikant häufiger ein positives Sensorsignal als die anderen drei Konditionen, welche sich untereinander nicht signifikant voneinander unterschieden.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass der Sensor spezifisch für humanes α Syn ist. Beim Blick auf die Aminosäuresequenz lässt sich ein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Synuclein-Arten im Epitop des Sensors erkennen (Abbildung 13).

humanes αSyn	116	MPVDPDNEAYEMPSEEGY	133
Ratten-αSyn	116	MPVDFSSSEAYEMPSEEGY	133
humanes βSyn	111	-LMEPEGESYEDFPQEEY	127
Maus-αSyn	116	MPVDFGSEAYEMPSEEGY	133

Abbildung 13: Abschnitt der Aminosäuresequenz von humanem, Ratten- α Syn und humanem β -Syn sowie Maus (*Mus musculus*)- α Syn. Schwarz unterlegt ist das Epitop des Sensors (Aminosäuren 118-131). Grün unterlegt sind die übereinstimmenden Aminosäuren mit dem Epitop des Sensors.

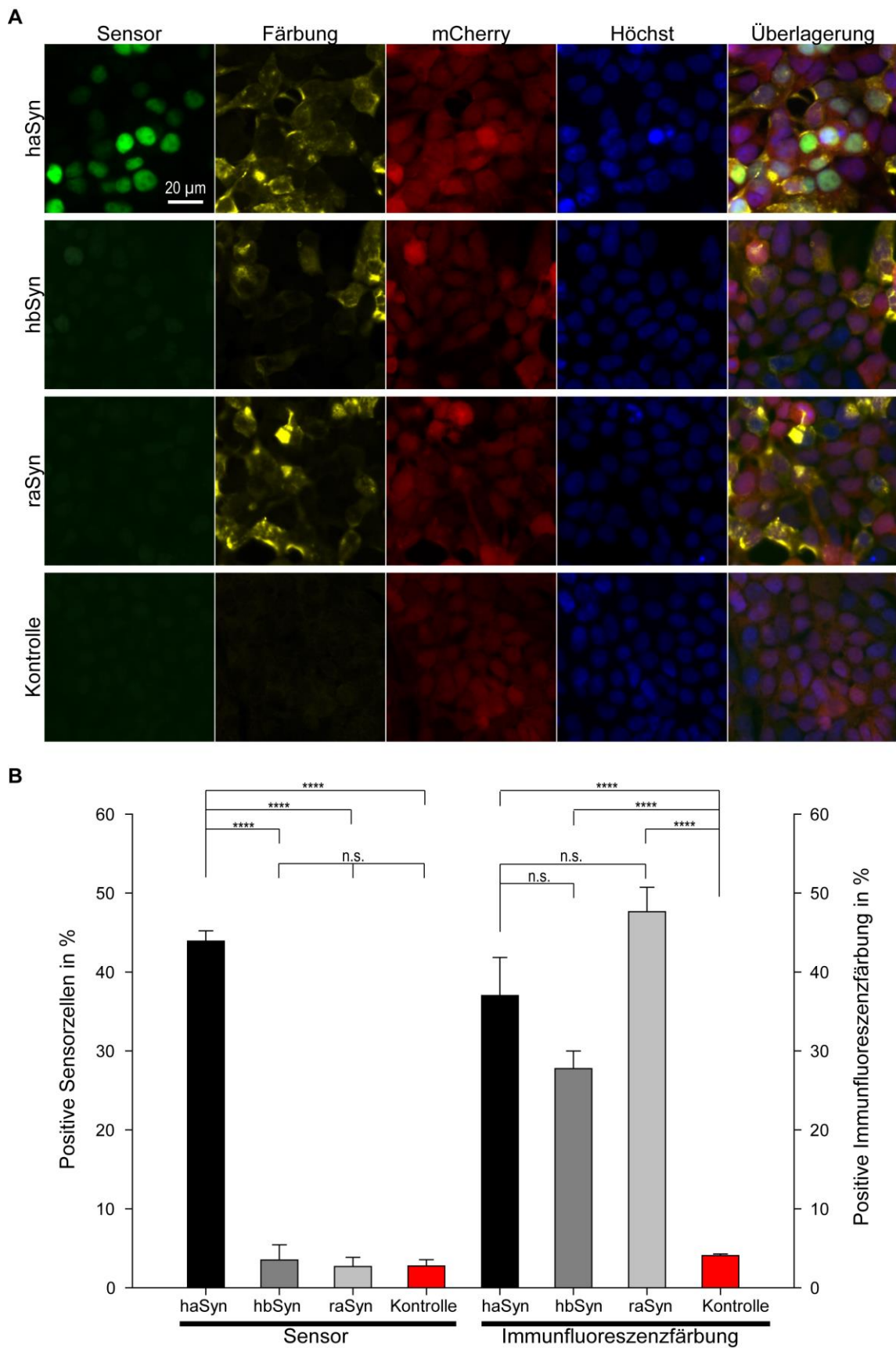


Abbildung 14: Spezifität des Sensors. **A:** Gleich skalierte repräsentative Bilder der Sensorzellen nach Transfektion mit humanem *paSyn*-, humanem *pβSyn*-, Ratten-*praSyn*- und *pcD-NA3.1(+)*-Plasmid als Kontrolle. **B:** Quantitative Auswertung aus drei unabhängigen Experimenten mit technischen Triplikationen. Links ist das Sensorsignal unter den vier Konditi-

onen (dazu zugehörig die y-Achse links) und rechts die Immunfluoreszenzfärbung unter den vier Konditionen (dazu gehörig die y-Achse rechts) aufgetragen. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal bzw. Immunfluoreszenzsignal in AU über Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 6.200 Zellen analysiert. Für die Immunfluoreszenz wurde nur ein Experiment ausgewertet mit mindestens 2.500 analysierten Zellen pro Kondition. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.4 Übertragung von α -Synuclein

Nachdem die Funktionsweise des Sensors charakterisiert worden ist, sollte anschließend mithilfe des Sensors überprüft werden, ob und dann in welcher Form α Syn in Zellen gelangen könnte.

3.4.1 Nachweis einer Aufnahme von (-30)GFP in Zellen

Zunächst sollte eine von Zuris *et al.* (Zuris *et al.* 2015) beschriebene Methode, Proteine in das Zytosol von Zellen zu bringen, überprüft werden. Hierbei wurden stark negativ geladene Proteine mit einem kationischen lipidhaltigen Stoff (RNAimax) umgeben und konnten so in Zellen gebracht werden. Dazu wurde GFP mit 30 negativen Ladungen ((-30)GFP) auf HEK293-Zellen gegeben (2.6.10). Zellen, die das Protein aufnehmen, sollten ein gleichmäßiges (zytosolisches) Signal an GFP zeigen.

Gibt man (-30)GFP allein auf die Zellen, so kann man keine Änderung in der GFP-Intensität erkennen (Abbildung 15). Gibt man hingegen (-30)GFP zusammen mit RNAimax, so erkennt man einen deutlichen Anstieg in der GFP-Intensität. Erstens erkennt man viel punktförmiges GFP mit starker Intensität, welches nicht in allen Fällen mit Zellen assoziiert ist und eher für Präzipitat spricht. Zweitens erkennt man auch gleichmäßig zytosolisch angefärbte Zellen, in welche tatsächlich Protein aufgenommen worden scheint.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die Methode funktioniert und erfolgreich nachvollzogen wurde.

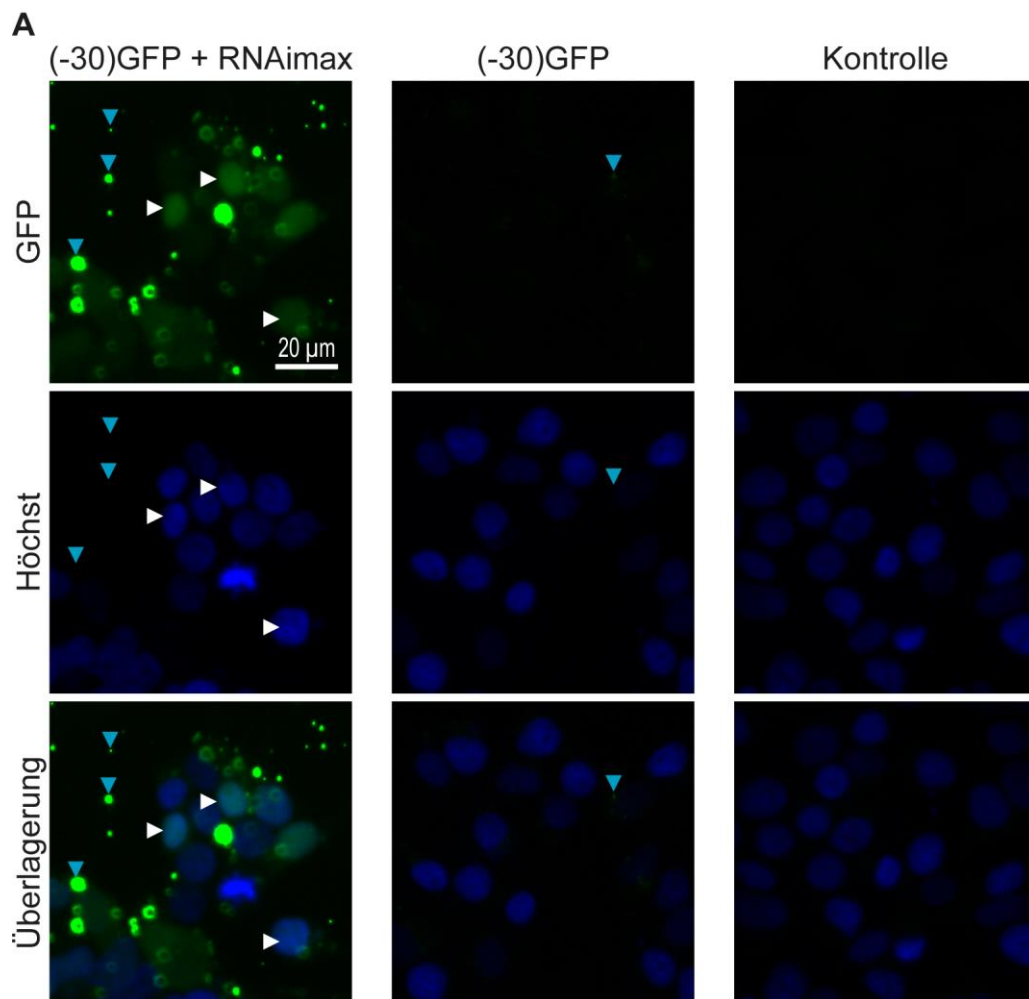


Abbildung 15: Proteingabe (-30)GFP. Es wurden (-30)GFP mit RNAimax auf Zellen gegeben, (-30)GFP allein und als Kontrolle kein Protein. **A:** Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes, welches in technischer Triplikation durchgeführt wurde. Erstens erkennt man viele kleine Punkte mit starker Intensität (blaue Pfeilköpfe), entweder ohne Assoziation zu Zellen oder vor allem im Bereich der Zellmembran. Zweitens erkennt man gleichmäßig zytosolisch angefärbte Zellen (weiße Pfeilköpfe), allerdings nur in der Kondition mit (-30)GFP und RNAimax.

3.4.2 Nachweis einer Aufnahme von α -Synuclein in Zellen

Die in 3.4.1 überprüfte Methode wurde nun an α Syn angewandt. Dazu wurde α Syn mit und ohne RNAimax auf Sensorzellen gegeben (2.6.10). Als Kontrollen wurde einmal β Syn mit RNAimax (um zu kontrollieren, ob RNAimax an sich zu einer Fluoreszenzsteigerung führt) und einmal PBS mit Opti-MEM gegeben.

Wird α Syn in niedriger Konzentration von 2,8 μ M gegeben, so zeigt sich kein positives Sensorsignal. Zu den Kontrollen gibt es keinen signifikanten Unterschied. In höherer Konzentration von 22 μ M hingegen zeigen sich in der Kondition mit α Syn und RNAimax mehr positive Sensorzellen im Vergleich zu den anderen Konditionen.

Der Unterschied zwischen α Syn mit RNAimax und allen anderen drei Konditionen ist signifikant, wohingegen α Syn allein zu keinem signifikantem Unterschied im Vergleich zur

Kontrolle führt. RNAimax an sich als auch α Syn allein führen nicht zu einer signifikanten Veränderung.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass eine Hülle aus kationischen Lipiden den Transport von α Syn ins Zytosol deutlich effizienter macht, beziehungsweise überhaupt ermöglicht.

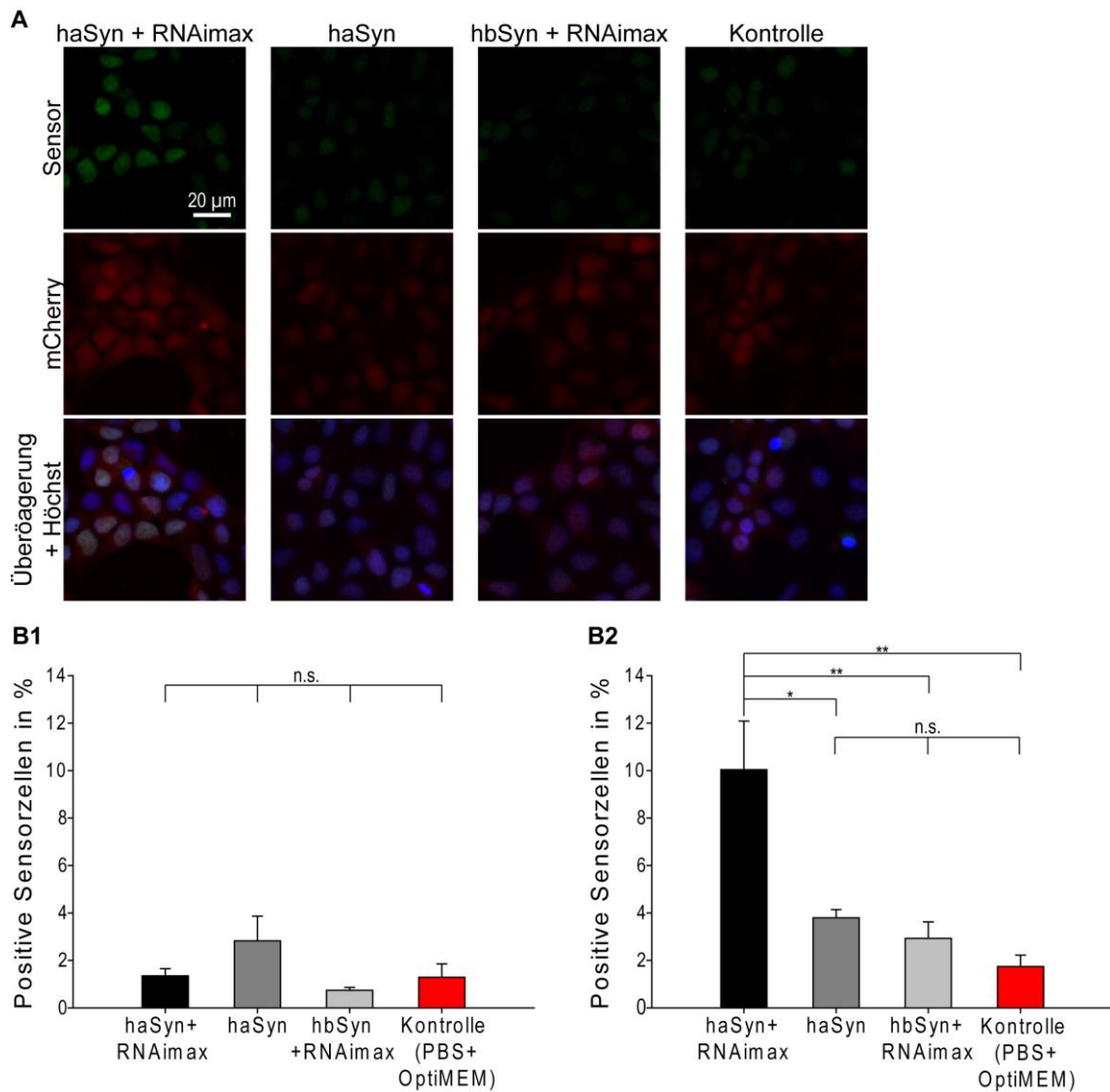


Abbildung 16: Proteinaufnahme in Sensorzellen. Es wurde humanes α Syn zusammen mit RNAimax ($h\alpha$ Syn+RNAimax), allein ($h\alpha$ Syn), humanes β Syn mit RNAimax ($h\beta$ Syn+RNAimax) oder PBS mit Opti-MEM als Kontrolle gegeben. **B**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt. **B1**: 2,8 μ M Protein. Pro Replikation und Kondition wurden je mehr als 2.200 Zellen ausgewertet. **B2**: 22 μ M Protein. Pro Replikation und Kondition wurden je mehr als 2.300 Zellen ausgewertet.

3.5 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen

Als Nächstes sollte die Übertragung von α Syn zwischen Zellen überprüft werden.

3.5.1 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Kokultur

Es wurde eine Kokultur aus transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen angesetzt. Dazu wurden HEK293-Zellen 12 h nach Aussaat mit *paSyn-HA* transfiziert, als Kontrolle wurden die HEK293-Zellen nicht transfiziert. 24 h später wurde in einer Kondition mit transfizierten HEK293-Zellen (+DNase) DNase für 30 min hinzugegeben als Kontrolle, ob Plasmid und nicht nur Protein übertragen wird. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen und Sensorzellen wurden in neuem Transfektionsmedium zu den HEK293-Zellen hinzugegeben. Nach 36 h wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt (2.6.12.1).

In Abbildung 17 A erkannte man mehr positive Sensorzellen in der Kokultur aus transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen, in der Kondition ohne DNase zeigte sich auch ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Dies deutete darauf hin, dass Protein von den transfizierten HEK293-Zellen auf die Sensorzellen übertragen wird und so zu einem positiven Signal führte, jedoch verwunderte der Unterschied zwischen den Konditionen mit und ohne DNase.

3.5.2 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Mediumtransfer ohne Mediumwechsel

Hierzu wurden HEK293-Zellen mit *paSyn-HA* transfiziert und nach 24 h das Medium eingesammelt, in welchem sie gewachsen sind. Nach halbstündiger DNase-Behandlung zur Eliminierung von Plasmid, welches noch nicht in die HEK293-Zellen aufgenommen wurde und somit frei im Medium wäre und auf Sensorzellen übertragen werden würde, wurde das Medium auf Sensorzellen gegeben. Um eine Übertragung von transfizierten HEK293-Zellen auszuschließen, wurde das Medium vor Gabe zentrifugiert und nur der Überstand gegeben (2.6.11). 36 h Stunden nach Mediumtransfer auf die Sensorzellen wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt.

In Abbildung 17 B erkannte man mehr positive Sensorzellen, wenn das Medium von mit *paSyn-HA* transfizierten HEK293-Zellen auf Sensorzellen übertragen wurde, als wenn es von nicht transfizierten HEK293-Zellen übertragen wurde.

Dies deutete darauf hin, dass Protein von den transfizierten HEK293-Zellen auf die Sensorzellen übertragen wird und so zu einem positiven Signal führte.

3.5.3 Bestätigung der Wirksamkeit von DNase mittels Gelelektrophorese

Da sowohl bei der Kokultur als auch beim Mediumtransfer die Kondition ohne DNase-Gabe etwas mehr positive Sensorzellen aufwies als mit DNase-Gabe, sollte überprüft wer-

den, ob die DNase-Menge ausreicht, um das evtl. noch freie Plasmid im Medium zu schneiden. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass das positive Signal nicht durch Plasmidübertragung im Medium verursacht wurde. Dazu wurden Agarosegelelektrophoresen durchgeführt (Abbildung 17 C).

Zuerst wurde DNase (2 µg/ml) für eine halbe Stunde zu unterschiedlich viel DNA in 1 ml Medium gegeben und anschließend eine Agarosegelelektrophorese (2.8.1) durchgeführt (Abbildung 17 C1). Als Plasmid wurde hierfür *pSensor* (2.9.1) verwendet. Es war deutlich zu erkennen, dass die DNase sämtliche DNA in allen Konditionen geschnitten hat. Da die Zellen sowohl in der Kokultur als auch im Mediumtransfer mit 1 µg/ml transfiziert wurden, betrug die theoretisch höchstmögliche Menge an freier DNA in diesen beiden Experimenten 1 µg. In dieser Agarosegelelektrophorese wurde DNase u. a. zu 3, 2 und 1 µg DNA gegeben und demnach die DNase sogar an höheren als theoretisch möglichen Mengen DNA getestet.

Um zu testen, ob das für die Transfektion genutzte Lipofectamine2000 einen Einfluss auf die Effektivität der DNase hatte, wurde DNase an Plasmid mit Lipofectamine2000 getestet. Hierfür wurde *pTOM70-EGFP* (2.9.1 und 3.5.4) genutzt. Dazu wurden 1 µg DNA mit Lipofectamine2000 komplexiert (2.6.6) und in 1 ml Medium gegeben. Darauf wurde DNase (2 µg/ml) für eine halbe Stunde hinzugefügt und anschließend eine Agarosegelelektrophorese (2.8.1) durchgeführt (Abbildung 17 C2). Auch hier war deutlich zu erkennen, dass die DNase sämtliche DNA geschnitten hat. Allerdings war nicht geklärt, ob vielleicht nur nicht komplexierte freie DNA im Gel zu erkennen war und die DNase somit trotzdem nicht mit Lipofectamine2000 komplexierte DNA schneiden kann.

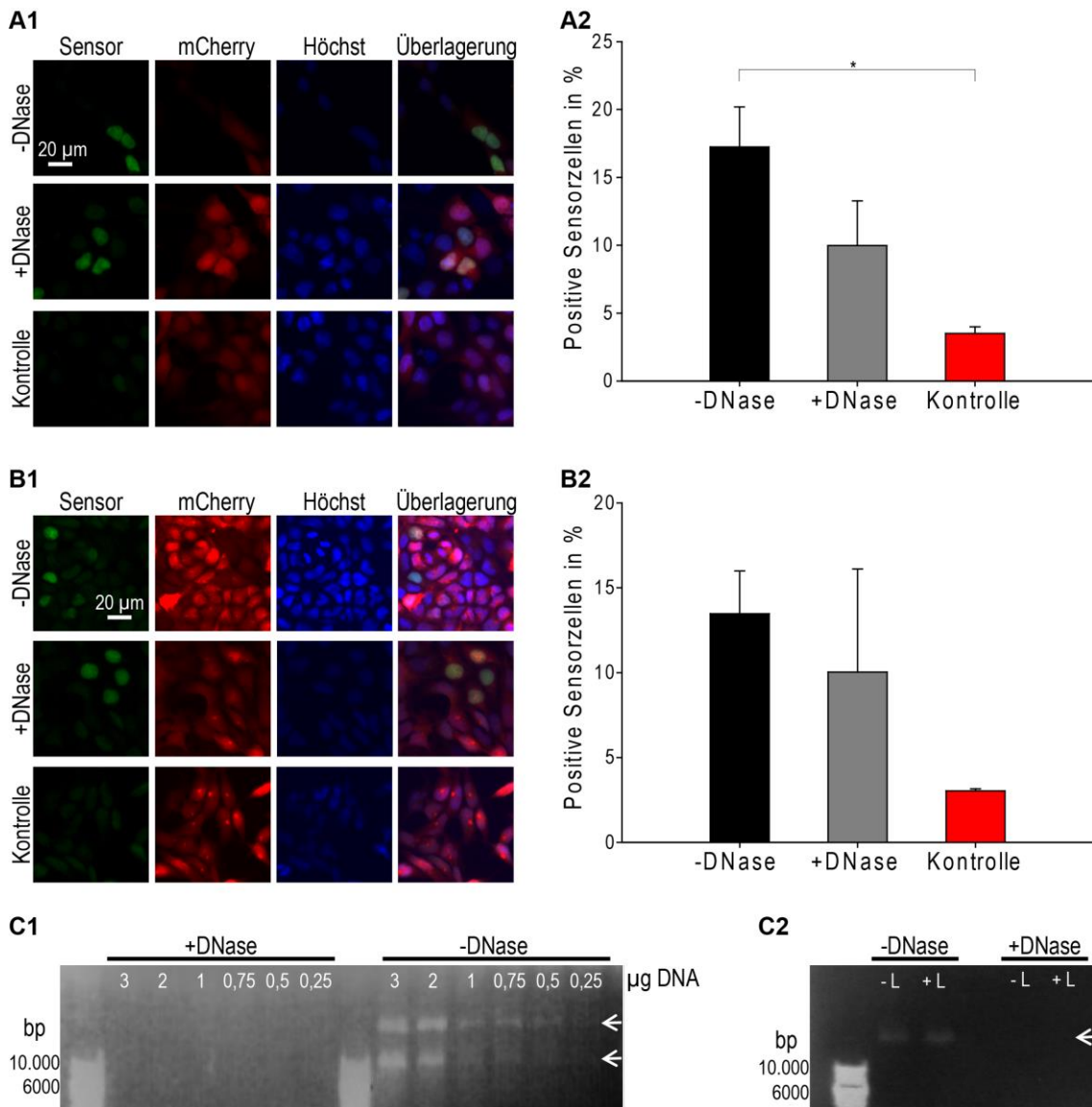


Abbildung 17: α Syn-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen. **A:** Kokultur. **A1:** Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **A2:** Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 2.100 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt. **B:** Mediumtransfer. **B1:** Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **B2:** Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 1.400 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt. **C:** DNase-Überprüfung mittels Gelelektrophorese. Bp=Basenpaare. **C1:** Es wurde Medium mit *pSensor* aufgetragen (weiße Pfeile), einmal mit zugefügter DNase, einmal ohne DNase. In der Kondition mit DNase erkennt man kein Plasmid. **C2:** Es wurde ohne (- L) und mit (+ L) Lipofectamine2000 komplexiertes *pTOM70-EGFP* in Medium aufgetragen (weißer Pfeil), einmal ohne DNase, einmal mit zugefügter DNase. In beiden Konditionen mit DNase erkennt man kein Plasmid.

3.5.4 Exkurs: Überprüfung einer Plasmidübertragung beim Mediumtransfer mithilfe von *pTOM70-EGFP*

Durch den DNase-Test war somit nicht geklärt, ob tatsächlich nur Protein übertragen wird und nicht auch noch Plasmid, was den Sensor positiv werden lässt.

Aus diesem Grund wurde der Mediumtransfer wiederholt, allerdings wurde ein Kontrollplasmid verwendet, bei welchem sichergestellt war, dass eine Proteinübertragung nicht stattfinden kann und somit nur eine Plasmidübertragung zu positiven Empfängerzellen (Zellen, welche das Medium von den transfizierten HEK293-Zellen empfangen) führen könnte. Es wurde *pTOM70-EGFP* (2.9.1) als Kontrollplasmid verwendet, welches an die *translocase of the outer membrane* (TOM)70 des Mitochondriums bindet. Mitochondrien werden zwischen Zellen nicht (oder nur in extrem geringem Maße) übertragen und somit konnte auch das gebildete und hieran gebundene EGFP nicht übertragen werden.

Das Einzige, was zu einem mitochondrialen GFP-Signal in Empfängerzellen führen konnte, war somit ein durch Übertragung von Plasmid in den Empfängerzellen neu gebildetes Protein. Positive Empfängerzellen sprächen damit eindeutig für eine Plasmidübertragung und würden damit ein methodisches Problem aufzeigen. Bei negativen Empfängerzellen wäre eine Plasmidübertragung ausgeschlossen und diese Methode könnte dann mit *paSyn* durchgeführt werden, um eine reine Proteinübertragung mit sicher ausgeschlossener Plasmidübertragung durchzuführen.

3.5.4.1 Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Mediumtransfer ohne Mediumwechsel mit *pTOM70-EGFP*

Hierzu wurden HEK293-Zellen mit *pTOM70-EGFP* transfiziert oder als Kontrolle nicht transfiziert und nach 24 h das Medium eingesammelt, in welchem sie gewachsen sind. Nach halbstündiger DNase-Behandlung in einer Kondition (+DNase) zur Eliminierung noch frei im Medium schwimmenden Plasmids, welches noch nicht in die HEK293-Zellen aufgenommen wurde und somit frei im Medium wäre und auf Empfängerzellen übertragen werden würde, wurde das Medium auf Empfängerzellen (Sensorzellen, welche das Medium der Spenderzellen empfangen) gegeben. Um eine Übertragung von transfizierten HEK293-Zellen auszuschließen, wurde das Medium vor Gabe zentrifugiert und nur der Überstand gegeben (2.6.11). 36 h Stunden nach Mediumtransfer auf die Empfängerzellen wurden die Zellen fixiert und mit Höchst 33342 gefärbt.

Die Spenderzellen konnten erfolgreich transfiziert werden, wie Abbildung 18 A zeigt. In Abbildung 18 B erkannte man mehr positive Empfängerzellen, wenn das Medium von mit *pTOM70-EGFP* transfizierten HEK293-Zellen auf Empfängerzellen übertragen wurde, als wenn es von nicht transfizierten HEK293-Zellen übertragen wurde.

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Plasmid von den transfizierten HEK293-Zellen auf die Empfängerzellen übertragen wurde und so zu einem positiven Signal führte.

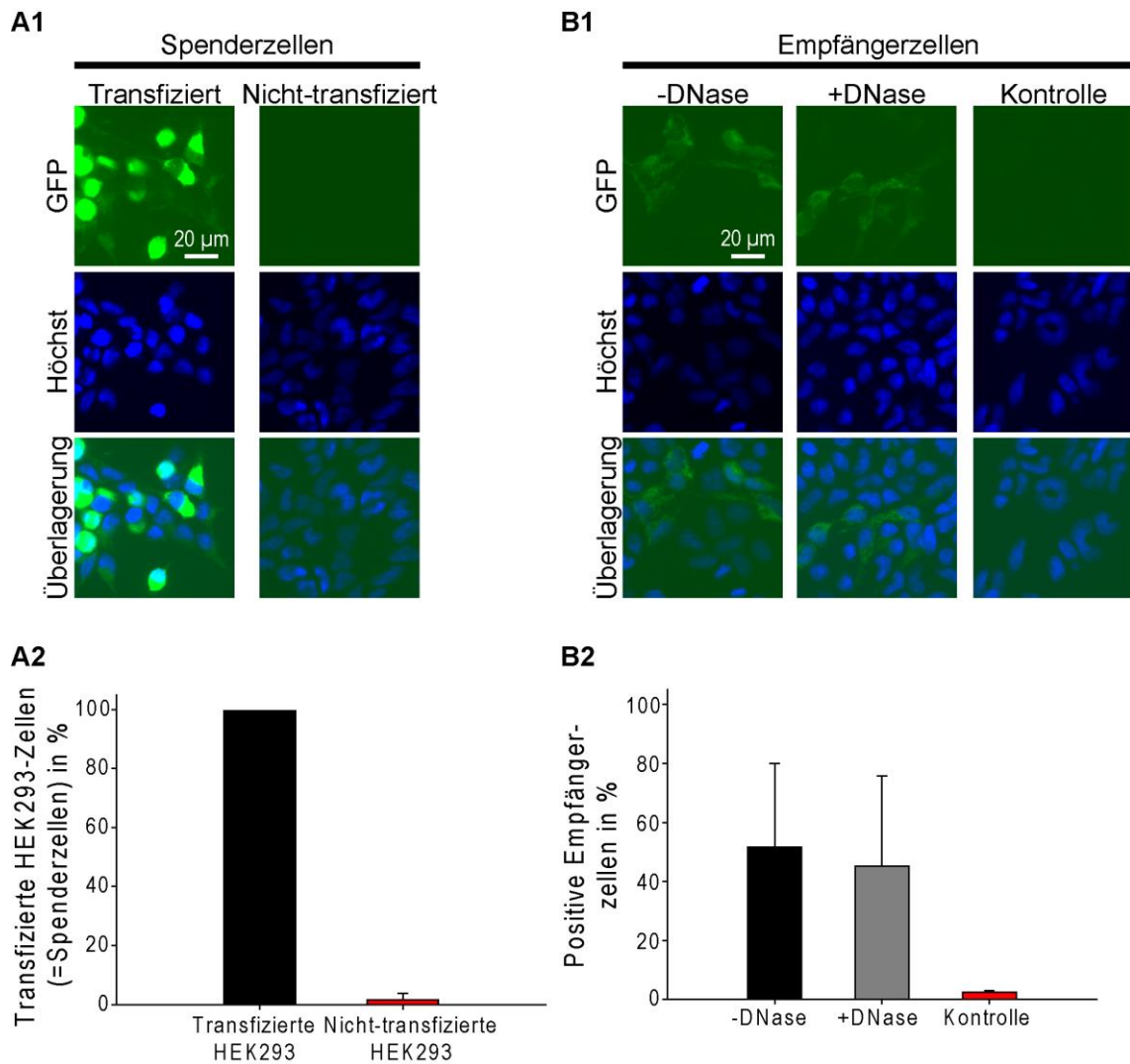


Abbildung 18: Mediumtransfer ohne Mediumwechsel mit *pTom70-EGFP*. **A**: Spenderzellen, d. h. mit *pTOM70-EGFP* transfizierte und nicht-transfizierte HEK293-Zellen, von welchen das Medium eingesammelt wurde. **A1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **A2**: Quantitative Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigten. **B**: Empfängerzellen, d. h. Zellen, welche das Medium von den Spenderzellen erhalten haben. **B1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **B2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle (Empfängerzellen, welche das Medium von nicht-transfizierten Spenderzellen erhielten) zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.5.4.2 Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Mediumtransfer mit Mediumwechsel mit *pTOM70-EGFP*

HEK293-Zellen wurden mit *pTOM70-EGFP* transfiziert. Im Gegensatz zum Mediumtransfer ohne Mediumwechsel wurde das Medium 8 h nach Transfektion durch frisches

Medium ausgetauscht. Dadurch sollte überprüft werden, ob sich so eine Plasmidübertragung verhindern lässt. Darauf wurde wie beim Mediumtransfer ohne Mediumwechsel verfahren.

Die Spenderzellen konnten erfolgreich transfiziert werden, wie Abbildung 19 A zeigt. In Abbildung 19 B erkannte man keinen Unterschied mehr zwischen den Empfängerzellen, egal ob das Medium von mit *pTOM70-EGFP* transfizierten HEK293-Zellen oder nicht-transfizierten HEK293-Zellen auf Empfängerzellen übertragen wurde.

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass die Gefahr einer Plasmidübertragung durch einen Mediumwechsel nach Transfektion effizient beseitigt werden konnte.

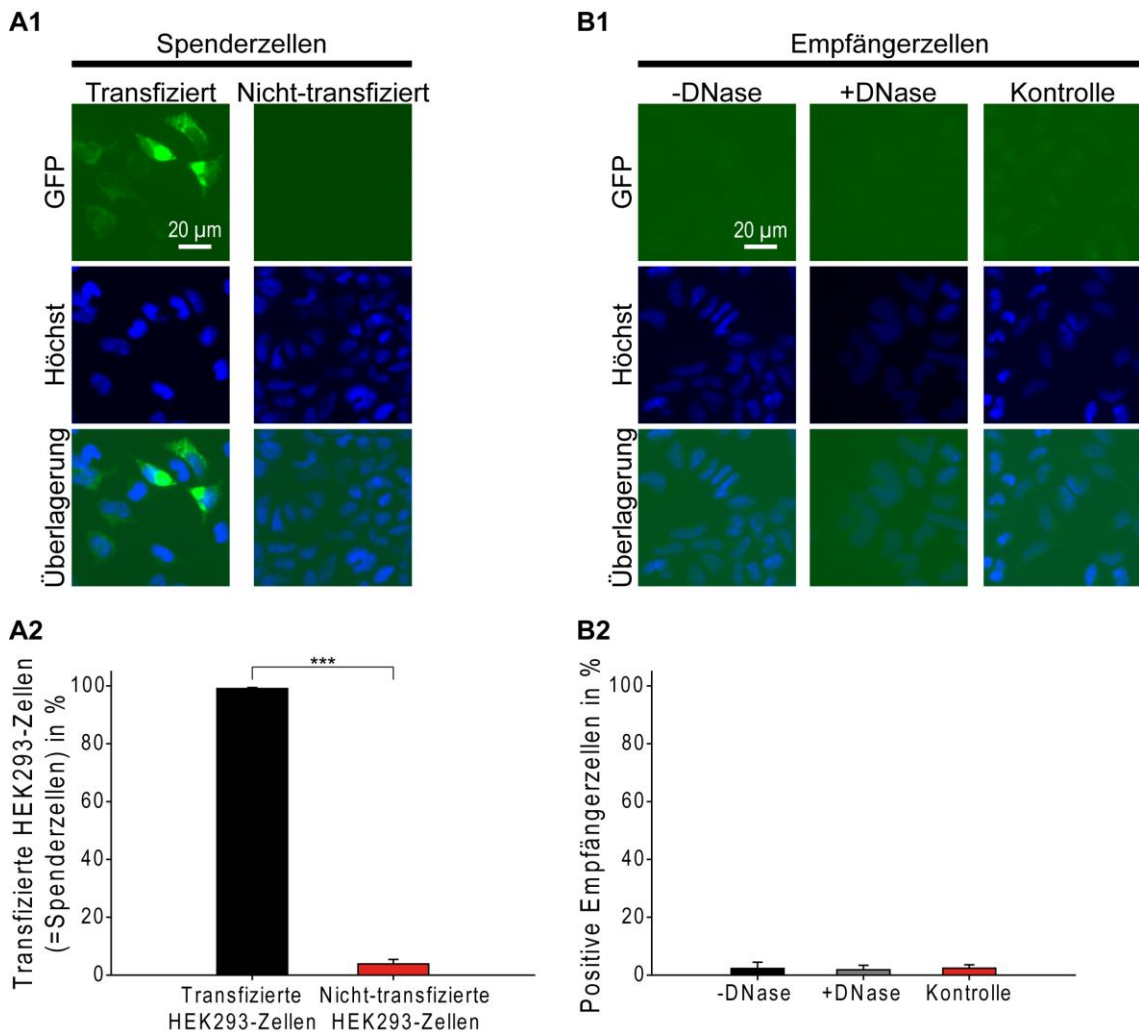


Abbildung 19: Mediumtransfer mit Mediumwechsel mit *pTom70-EGFP* transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen). **A**: Spenderzellen, d. h. mit *pTOM70-EGFP* transfizierte und nicht-transfizierte HEK293-Zellen, von welchen das Medium eingesammelt wurde. **A1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **A2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigten. **B**: Empfängerzellen (Sensorzellen), welche das Medium von den Spenderzellen erhalten haben. **B1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **B2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle (Empfängerzellen, welche das Medium von nicht-transfizierten Spenderzellen erhielten) zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.5.5 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Mediumtransfer mit Mediumwechsel

HEK293-Zellen wurden mit α Syn transfiziert. Im Gegensatz zum Mediumtransfer ohne Mediumwechsel wurde das Medium 8 h nach Transfektion durch frisches Medium ausgetauscht. Dadurch wurde verhindert, dass *paSyn-HA* mit dem Medium auf die Sensorzellen

übertragen wurde. Es wurde damit ausgeschlossen, dass es zu einem fälschlich positiven Sensorsignal kommt, welches nicht durch übertragenes Protein, sondern durch übertragenes Plasmid und daraufhin in Sensorzellen selbst gebildetes Protein zustande kommt.

Das Medium wurde 24 h nach Mediumwechsel auf die Empfängerzellen übertragen. Hier zeigte sich kein Unterschied im Sensorsignal zwischen den Sensorzellen, egal ob das Medium von mit *paSyn-HA* transfizierten HEK293-Zellen oder nicht-transfizierten HEK293-Zellen auf Empfängerzellen übertragen wurde (nicht dargestellt).

Das Experiment wurde wiederholt und das Medium erst 48 h nach Mediumwechsel auf die Empfängerzellen übertragen. Dadurch sollte den transfizierten HEK293-Zellen mehr Zeit gegeben werden, α Syn ins Medium abzugeben. Jedoch zeigte sich auch hier kein Unterschied im Sensorsignal (Abbildung 20).

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass kein Protein übertragen wird.

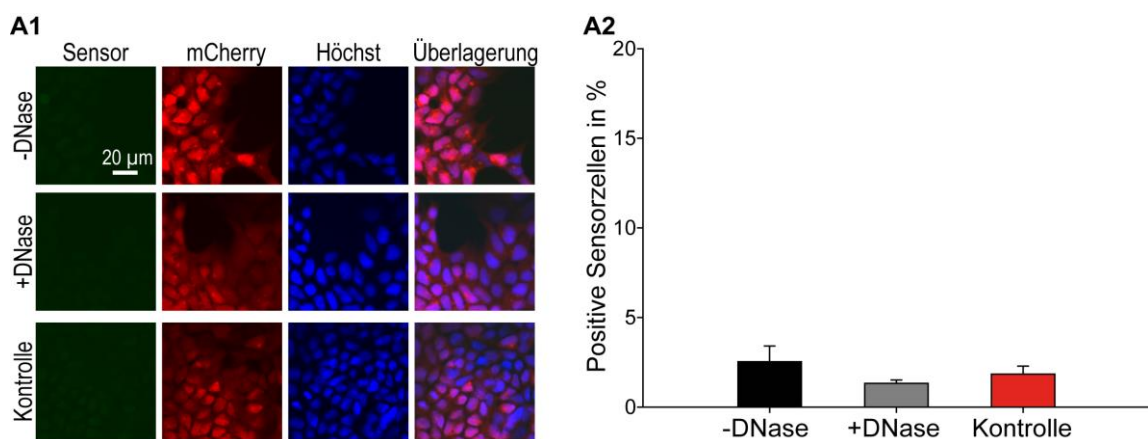


Abbildung 20: α Syn-Übertragung zwischen transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen: Mediumtransfer 48 h nach Mediumwechsel. **A1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder des Experimentes. **A2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein Sensorsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 2.300 Zellen analysiert. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.6 Exkurs: Plasmidübertragung zwischen Zellen in einer Kokultur

Bei der Kokultur von mit *paSyn-HA* transfizierten HEK293-Zellen und Sensorzellen wurde das Medium ausgetauscht, sodass wie in 3.5.4.2 gezeigt kein Plasmid mehr über das Medium übertragen werden dürfte. Somit sollte das Ergebnis in 3.5.1 eigentlich valide sein, da in dieser Kokultur auch mit PBS gewaschen wurde. Jedoch sollte überprüft werden, ob nicht doch eine Plasmidübertragung stattfinden könnte (z. B. durch an dem Well anhaftendes Plasmid, welches nicht durch Mediaustausch zu beseitigen ist), die zu positiven Sensorzellen geführt hat.

Diese Kontrolle wurde wie bereits in 3.5.4 beschrieben mit dem Plasmid *pTOM70-EGFP* durchgeführt, ein mitochondriales Protein. Zwar wurden in diesen Experimenten dünne, die Zellen verbindende Strukturen gesehen, in welchen sich geringe Mengen an Mitochondrien befinden (Abbildung 21). Es ist aber extrem unwahrscheinlich, dass Zellen eine größere Menge an Mitochondrien untereinander austauschen, und eine kleine Anzahl an übertragenen Mitochondrien führt nur sehr unwahrscheinlich zu einem messbaren Unterschied an EGFP (4.3.3). Somit sollten positive Empfängerzellen sicher für eine Plasmidübertragung sprechen.

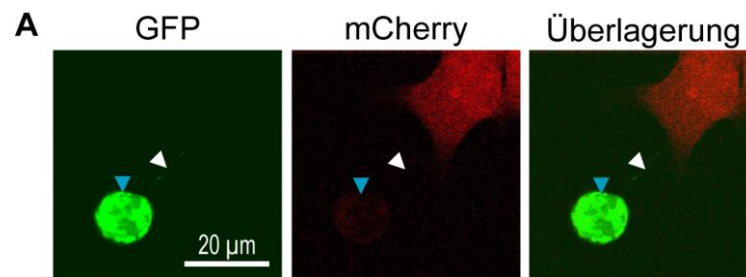


Abbildung 21: Zellverbindung. Konfokale Bilder einer länglichen, im Durchmesser einige nm dicken Struktur (weißer Pfeil) zwischen transfizierter HEK293-Zelle (blauer Pfeil) und Sensorzelle.

3.6.1 Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Mediumwechsel und PBS-Waschung

Es wurde eine Kokultur durchgeführt zwischen mit *pTOM70-EGFP* transfizierten HEK293-Zellen (sog. Spenderzellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen) wie in 2.6.12.1 beschrieben.

Die Spenderzellen wurden erfolgreich transfiziert (Abbildung 22 A). Die Empfängerzellen machten in der Kokultur bei allen drei Konditionen einen Anteil von ca. 50% aus (Abbildung 22 B2). Die Empfängerzellen zeigten sowohl ohne Zugabe als auch mit Zugabe von DNase signifikant häufiger als die Kontrolle (Kokultur zwischen nicht-transfizierten Spenderzellen und Empfängerzellen) ein positives GFP-Signal (Abbildung 22 B3). Um diese Auswertung durch qualitative Bilder zu überprüfen, wurden konfokale Bilder angefertigt. Damit wurde geschaut, ob die Empfängerzellen im Epifluoreszenzmikroskop nur durch eine Überlagerung von Spenderzellen über Empfängerzellen positiv scheinen. Auch in den konfokalen Bildern erkennt man mitochondriales GFP und somit positive Empfängerzellen (Abbildung 22 B1).

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass hier trotz Mediumwechsels und Waschen der Zellen mit PBS eine Plasmidübertragung stattgefunden hat.

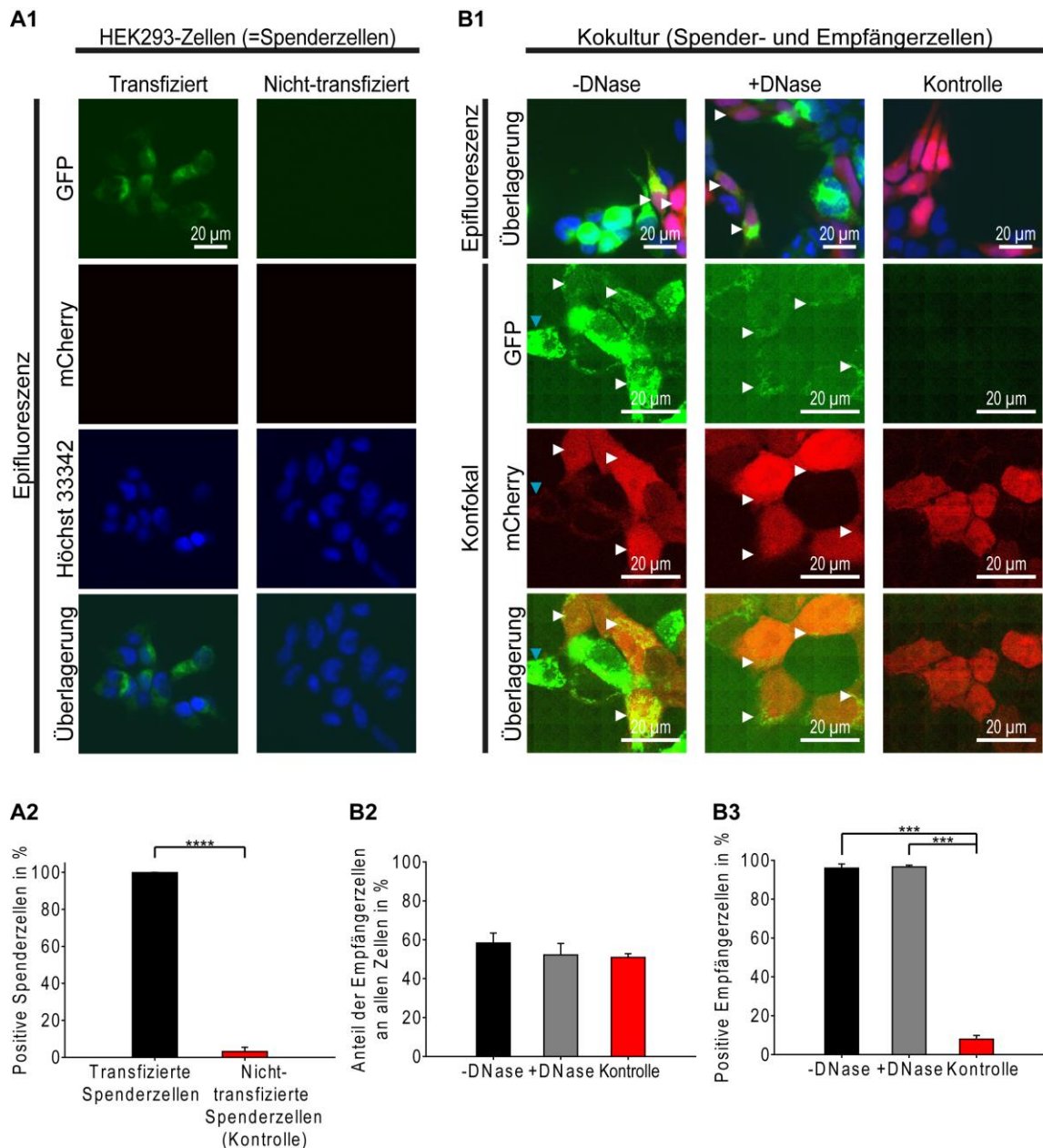


Abbildung 22: Kokultur zwischen mit *pTOM70-EGP* transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen). **A**: Spenderzellen. **A1**: Gleich skalierte repräsentative Bilder der Spenderzellen. **A2**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigten. **B**: Kokultur aus Spenderzellen und Empfängerzellen, d. h. Zellen, welche erst nach Transfektion der Spenderzellen zugegeben wurden. **B1**: Gleich skalierte repräsentative Epifluoreszenzbilder (Überlagerung=GFP- + mCherry- + Höchst33342-Signal) und gleich skalierte repräsentative konfokale Bilder der Kokultur aus Spenderzellen (blaue Pfeilköpfe) und Empfängerzellen (weiße Pfeilköpfe), welche mitochondriales GFP-Signal zeigen. **B2**: Quantitative Analyse des Anteils der Empfängerzellen an allen Zellen in %. Als Empfängerzellen wurden Zellen mit einem mCherry-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der transfizierten HEK293-Zellen (für +DNase und -DNase) oder der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (für Kontrolle) gewertet. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*

Test ermittelt. **B3:** Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle (Empfängerzellen, in Kokultur mit nicht-transfizierten Spenderzellen) zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.6.2 Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Mediumwechsel, PBS-Waschung und DMSO- oder Ethanol- Gabe

Um zu schauen, ob eine Übertragung von Plasmid auch stattfindet, wenn die Spenderzellen abgetötet werden, wurden zwei Kokulturen durchgeführt zwischen getöteten, mit *pTOM70-EGFP* transfizierten HEK293-Zellen (sog. Spenderzellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen) wie in 2.6.12.2 beschrieben. Dazu wurden die Spenderzellen einmal mit DMSO und einmal mit Ethanol getötet.

Die Spenderzellen wurden für beide Experimente erfolgreich transfiziert (Abbildung 24 A1). Die Empfängerzellen machten in der Kokultur bei beiden Experimenten und bei allen drei Konditionen einen Anteil von nahezu 100% aus (Abbildung 23 A2 und B2). Dies ist durch das Abtöten der Spenderzellen zu erklären, welche anschließend nicht mehr mit Höchst33342 angefärbt werden konnten und so in der Analyse nicht berücksichtigt wurden (2.11). Die Empfängerzellen zeigten sowohl ohne Zugabe als auch mit Zugabe von DNase signifikant häufiger als die Kontrolle (Kokultur zwischen nicht-transfizierten Spenderzellen und Empfängerzellen) ein positives GFP-Signal (Abbildung 22 B3). Dies konnte durch konfokale Bilder bestätigt werden, in denen man mitochondriales GFP und somit positive Empfängerzellen erkennt (Abbildung 22 B1). Das etwas schwächere GFP-Signal in den qualitativen Bildern bei Ethanol-Gabe lässt sich vermutlich durch eine Veränderung der Fluoreszenz durch Ethanol erklären.

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass trotz Mediumwechsels, Waschen der Zellen mit PBS und Tötung der Spenderzellen eine Plasmidübertragung stattgefunden hat und eine Plasmidübertragung auch ohne lebendige Spenderzellen stattfindet. Es findet also eine passive Plasmidübertragung statt.

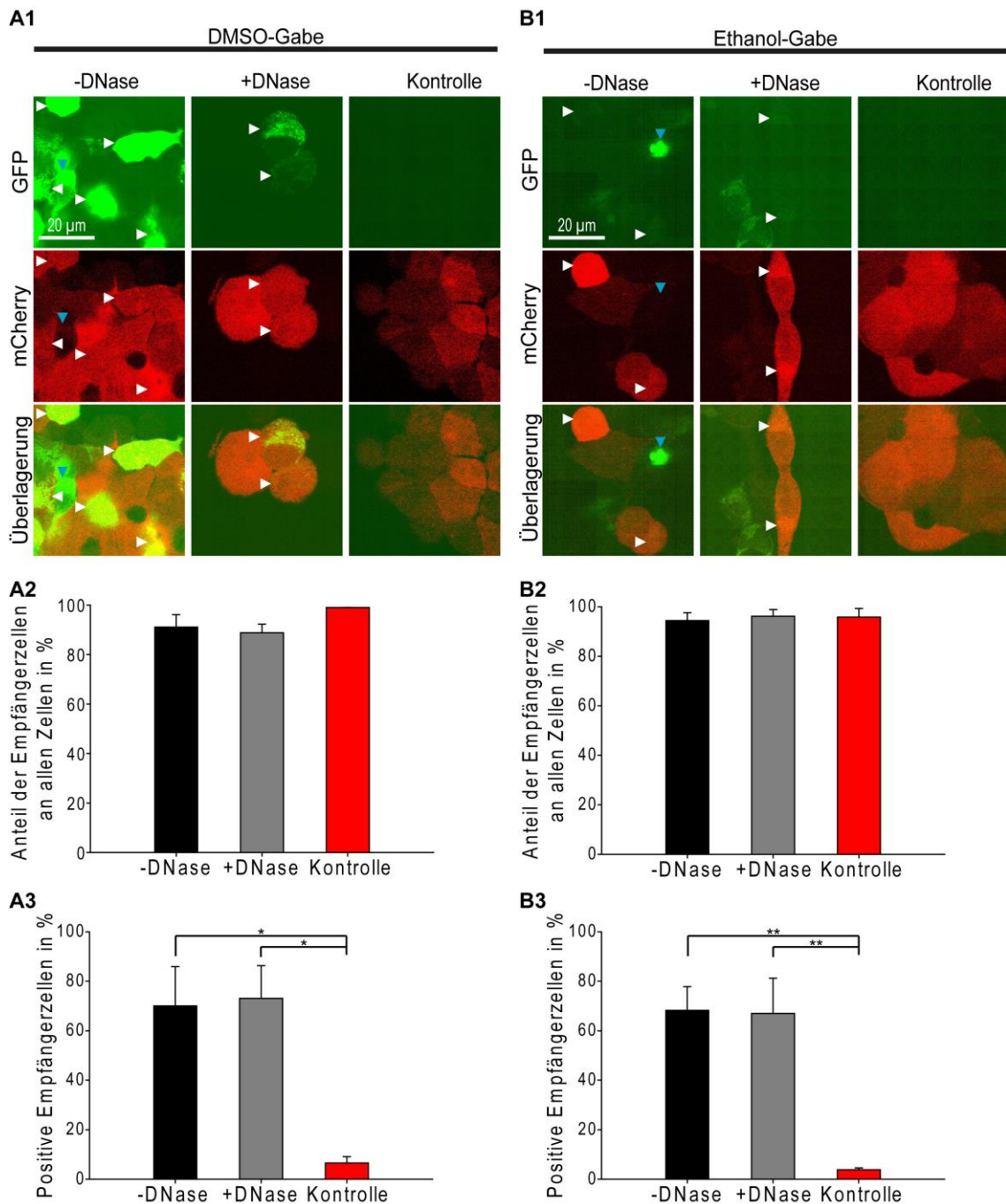


Abbildung 23: Kokulturen zwischen getöteten, mit *pTOM70-EGP* transfizierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) und Empfängerzellen (Sensorzellen). **A**: Kokultur aus mit DMSO getöteten Spenderzellen und Empfängerzellen, d. h. Zellen, welche erst nach Transfektion der Spenderzellen zugegeben wurden. **B**: Kokultur aus mit Ethanol getöteten Spenderzellen und Empfängerzellen, d. h. Zellen, welche erst nach Transfektion der Spenderzellen zugegeben wurden. **A1 + B1**: Gleich skalierte repräsentative konfokale Bilder der Kokultur aus Spenderzellen (blaue Pfeilköpfe) und Empfängerzellen (weiße Pfeilköpfe), welche mitochondriales GFP-Signal zeigen. **A2 + B2**: Quantitative Analyse des Anteils der Empfängerzellen an allen Zellen in % aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als Empfängerzellen wurden Zellen mit einem mCherry-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der transfizierten HEK293-Zellen (für +DNase und -DNase) oder der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (für Kontrolle) gewertet. Das Signi-

fikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt. **A3 + B3:** Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt.

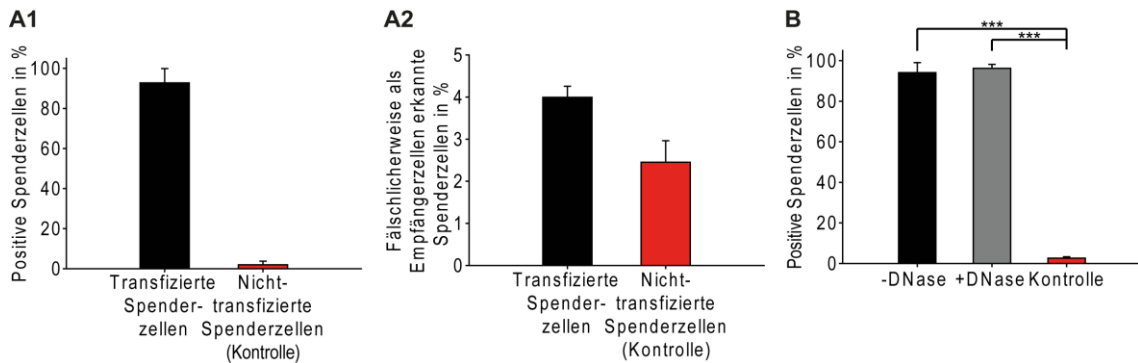


Abbildung 24: Spenderzellen. **A:** Spenderzellen der Kokultur mit Mediumwechsel, PBS-Waschung und DMSO- oder Ethanol-Gabe. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. **A1:** Quantitative Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigten. **A2:** Quantitative Analyse aus zwei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation der fälschlicherweise als Empfängerzellen erkannten Spenderzellen. Als Empfängerzellen wurden Zellen mit einem mCherry-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der transfizierten HEK293-Zellen (für +DNase und -DNase) oder der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (für Kontrolle) gewertet. **B:** Spenderzellen der Kokultur mit Trypsinisierung sowie der Kokultur mit Trypsinisierung und Ethanol-Gabe. Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation der für die verschiedenen Konditionen genutzten Spenderzellen. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (Kontrolle) zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test* ermittelt.

3.6.3 Überprüfung einer Plasmidübertragung mittels Kokultur mit Trypsinisierung sowie mit Trypsinierung und Ethanolgabe

Es sollte überprüft werden, ob ausschließlich eine passive Plasmidübertragung die Empfängerzellen positiv werden lassen hat oder ob zusätzlich Plasmid aktiv durch Zellen übertragen wird.

Dazu sollte eine passive Plasmidübertragung ausgeschlossen werden, indem die Spenderzellen nun in einem separaten Gefäß transfiziert, anschließend mittels Trypsin herausgelöst und in eine neue 12-Well-Platte zu den Empfängerzellen hinzugegeben wurden (2.6.12.4) und nicht mehr wie vorher die Empfängerzellen zu den transfizierten Spenderzellen hinzugegeben wurden.

Nach Trypsinisierung der Spenderzellen und anschließender Aussaat in einer 12-Well-Platte zusammen mit Empfängerzellen, machten die Empfängerzellen einen hohen Anteil und somit die Spenderzellen einen geringen Anteil von 20-30% aller Zellen aus (Abbildung 25 A2). Man erkannte sowohl ohne als auch mit DNase-Behandlung mehr positive Empfängerzellen (Abbildung 25 A) als in der Kontrolle, mit DNase auch signifikant mehr positive Empfängerzellen als in der Kontrolle.

Um zu überprüfen, ob diese positiven Empfängerzellen nur durch aus abgestorbenen Spenderzellen freigesetztes Plasmid transfiziert wurden, wurden als nächstes alle Spenderzellen nach Trypsinisierung mit Ethanol abgetötet. Durch die Tötung der Spenderzellen mit Ethanol wurde Plasmid in Zellen nicht zerstört sondern erhalten. Sollte also die Transfektion der Empfängerzellen nur durch freigesetztes Plasmid aus im Well sterbenden Spenderzellen erfolgen, so würden auch hierbei noch positive Empfängerzellen zu beobachten sein. Nach Tötung der Spenderzellen mit Ethanol machten die Empfängerzellen bei allen drei Konditionen einen Anteil von nahezu 100% aus, wie bei 3.6.2., und es ließ sich keine Plasmidübertragung beobachten (Abbildung 25 B).

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass Plasmid aktiv durch lebendige Zellen übertragen wurde.

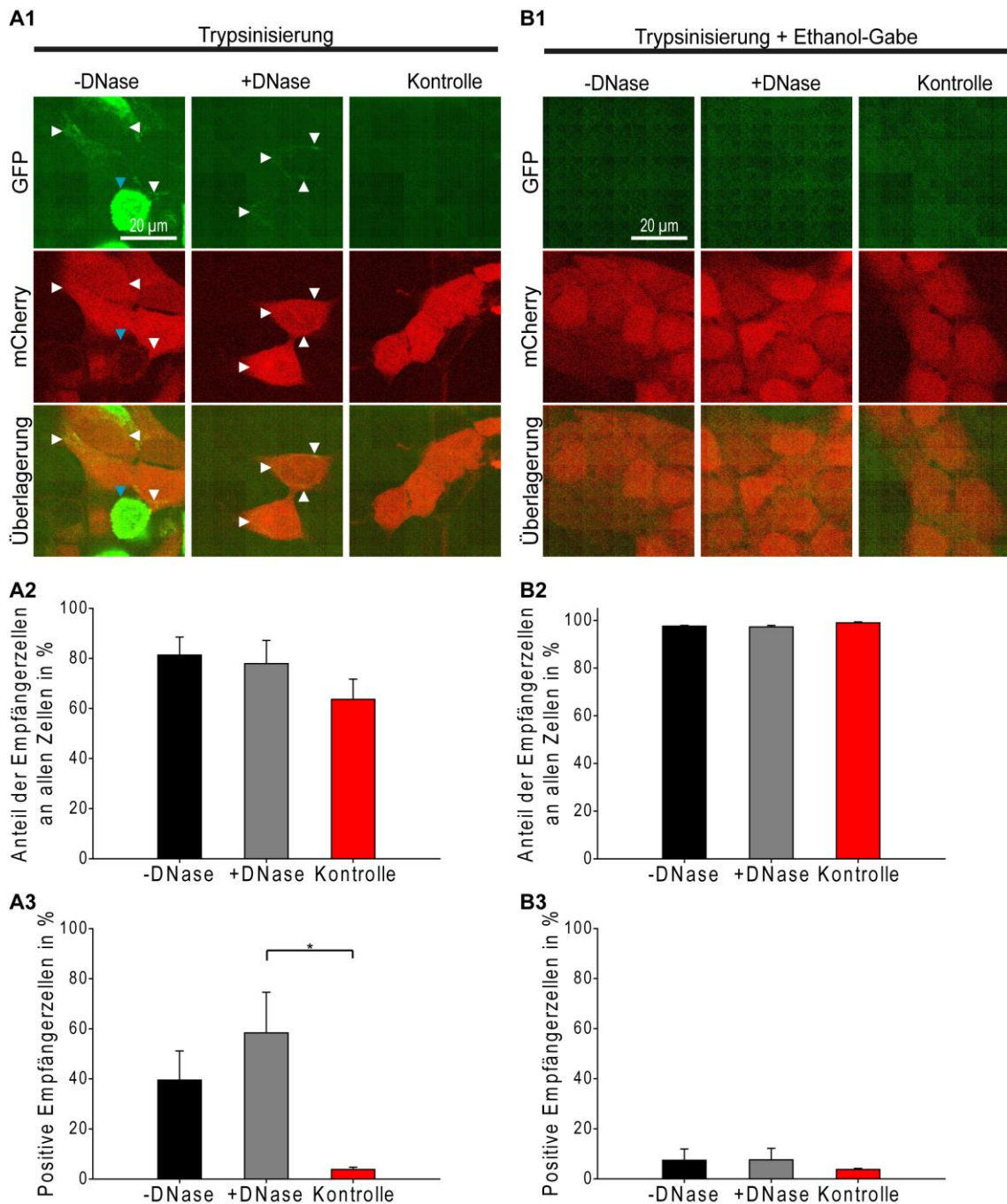


Abbildung 25: Kokulturen zwischen mit *pTOM70-EGP* transfizierten und anschließend trypsinisierten Spenderzellen (HEK293-Zellen) sowie Empfängerzellen (Sensorzellen). **A**: Kokultur aus trypsinisierten Spenderzellen und Empfängerzellen. **B**: Kokultur aus trypsinisierten und anschließend mit Ethanol getöteten Spenderzellen sowie Empfängerzellen. **A1** + **B1**: Gleich skalierte repräsentative konfokale Bilder der Kokultur aus Spenderzellen (blaue Pfeilköpfe) und Empfängerzellen (weiße Pfeilköpfe). **A2** + **B2**: Quantitative Analyse des Anteils der Empfängerzellen an allen Zellen in % aus drei unabhängigen Experimenten mit technischer Duplikation. Als Empfängerzellen wurden Zellen mit einem mCherry-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der transfizierten HEK293-Zellen (für +DNase und -DNase) oder der nicht-transfizierten HEK293-Zellen (für Kontrolle) gewertet. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt. **A3** + **B3**: Quantitative Analyse aus drei unabhängigen Experimenten mit

technischer Duplikation. Als positiv wurden Zellen gewertet, welche ein GFP-Signal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle zeigten. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc*-Test ermittelt.

3.7 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Kokultur aus α -Synuclein-Zellen und Sensorzellen

Um die soeben beschriebene Plasmidübertragung in einer Kokultur auszuschließen und somit nur die Proteinübertragung von α Syn zu überprüfen, wurde eine Kokultur aus stabil transfizierten α Syn-Zellen (stabil transfizierte HEK293-Zellen, 2.6.3) und Sensorzellen angesetzt.

Zunächst wurde die Induktion der α Syn-Zellen überprüft. α Syn-Zellen wurden mit Doxycyclin induziert oder nicht induziert und anschließend wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Induzierte α Syn-Zellen zeigten eine signifikant stärkere Intensität der Immunfluoreszenzfärbung und signifikant häufiger eine positive Immunfluoreszenzfärbung (Abbildung 26 C).

Als Experiment wurde eine Kokultur aus α Syn-Zellen und Sensorzellen angesetzt. Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen zusammen mit Sensorzellen angesetzt. Die Zellen wurden entweder 2 d oder 5 d nach Induktion fixiert und mit anti- α/β -Syn und Höchst 33342 gefärbt.

Im Experiment zeigten sich in der Kokultur mit α Syn-Zellen erfolgreich induzierte α Syn-Zellen (mCherry-negative, Immunfluoreszenz-positive Zellen) sowie Sensorzellen (mCherry-positive Zellen; mit einem Anteil der Sensorzellen von $18,994 \pm 1,683\%$) (Abbildung 26 A). Im Vergleich dazu zeigten sich in der Kontroll-Kokultur die HEK293-Zellen (mCherry- und Immunfluoreszenz-negativ) sowie die Sensorzellen (mCherry-positive Zellen; mit einem Anteil der Sensorzellen von $20,807 \pm 1,112\%$). Als Sensorzellen wurden dabei Zellen mit einem mCherry-Signal über 300 AU gewertet.

Bei den Sensorzellen (mCherry-positive Zellen) gab es sowohl nach 2 d als auch nach 5 d keinen Unterschied des Sensorsignals im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 26 B).

Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass keine Proteinübertragung stattgefunden hat.

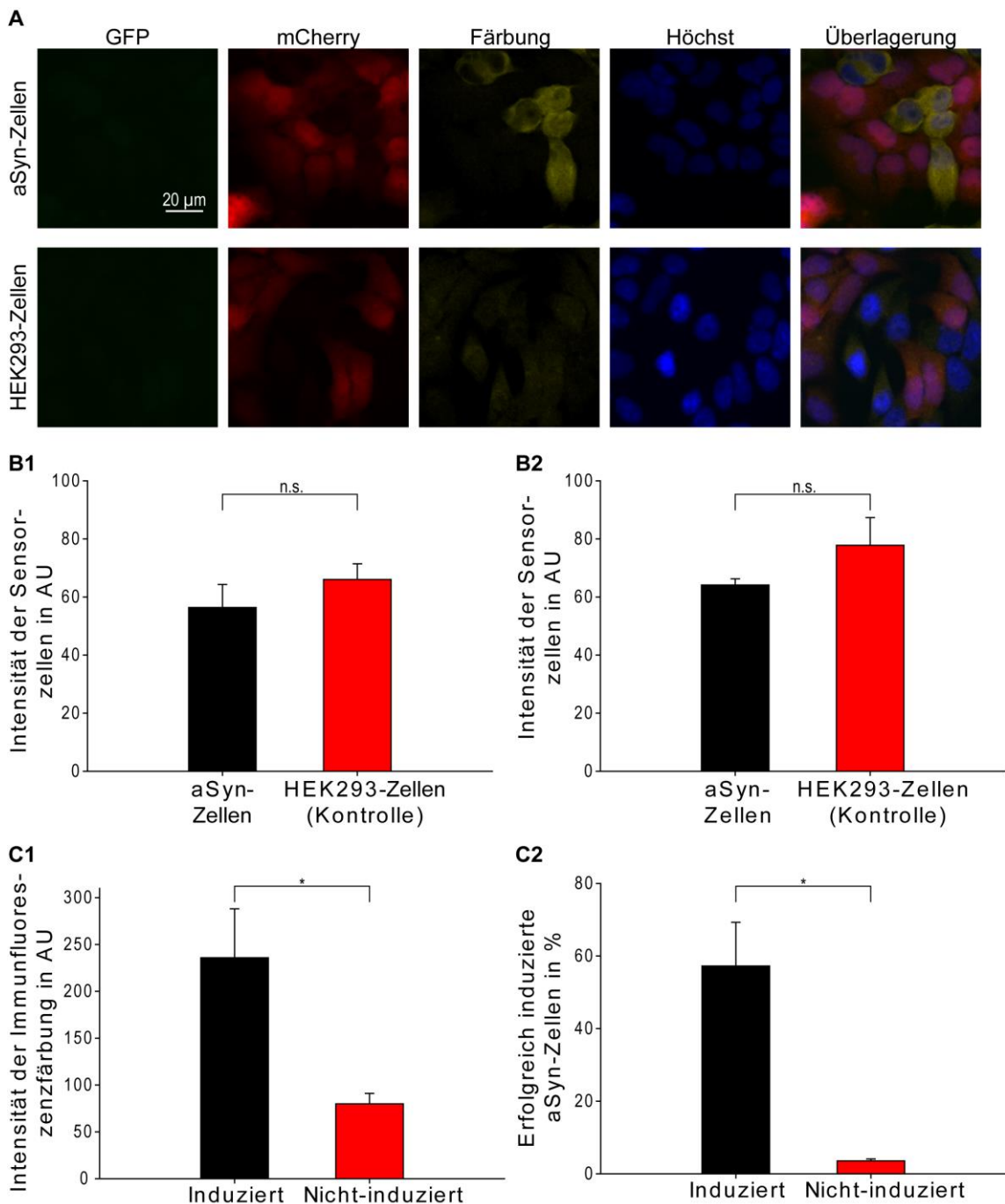


Abbildung 26: Kokultur aus α Syn-Zellen und Sensorzellen. **A**: Gleich skalierte repräsentative Bilder der Kokulturen nach 2 d aus α Syn-Zellen und Sensorzellen sowie als Kontrolle HEK293-Zellen und Sensorzellen. Die Immunfluoreszenzfärbung ist gegen α Syn gerichtet. **B**: Quantitative Auswertung des Sensorsignals in AU aus drei unabhängigen Experimenten mit technischen Triplikationen. **B1**: Kokultur nach 2 d. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 1.990 Zellen analysiert. **B2**: Kokultur nach 5 d. Pro Experiment und Kondition wurden je mehr als 570 Zellen analysiert. **C**: Überprüfung der Induktion der α Syn-Zellen. Quantitative Auswertung aus technischer Triplikation. Pro Replikation und Kondition wurden je mehr als 760 Zellen analysiert. **C1**: Es wurde die Intensität der Immunfluoreszenzfärbung in AU ermittelt. **C2**: Quantitative Auswertung aus technischer Triplikation. Es wurde der Anteil erfolgreich induzierter Zellen ermittelt. Als erfolgreich

induziert wurden Zellen mit einem Immunfluoreszenzsignal in AU über dem Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle gewertet.

3.8 Überprüfung einer α -Synuclein-Übertragung mittels Zellfusion von α -Synuclein-Zellen und Sensorzellen

Da sich in der Kokultur kein Unterschied in Hinblick auf das Sensorsignal zeigte, sollte eine positive Kontrolle durchgeführt werden. Hierzu wurde eine Zellfusion aus induzierten α Syn-Zellen und Sensorzellen bzw. aus HEK293-Zellen und Sensorzellen als Kontrolle durchgeführt (2.6.13).

Man erkannte in den beiden Experimenten, in denen eine Zellfusion induziert wurde, mehrere große Zellen, welche mCherry-positiv waren (Abbildung 27). In diesen zeigten sich große, teils gelappte Zellkerne, welche vermutlich fusionierte Zellen repräsentieren. Beim Sensorsignal war kein Unterschied zwischen der Fusion von α Syn-Zellen und HEK293-Zellen zu sehen.

Als Kontrollen wurden zudem Fusionen zwischen den einzelnen Zelltypen allein durchgeführt, d. h. nur zwischen α Syn-Zellen, nur zwischen HEK293-Zellen und nur zwischen Sensorzellen (hier nicht dargestellt). Dabei erkannte man, dass HEK293-Zellen und Sensorzellen die Fusion überlebten, die α Syn-Zellen jedoch bei einer Fusion starben. Wurde keine Zellfusion induziert, überlebten alle Zelltypen das Prozedere. Dieses Experiment wurde mehrfach durchgeführt, jedoch konnte es nicht so weit optimiert werden, dass die α Syn-Zellen überlebt hätten.

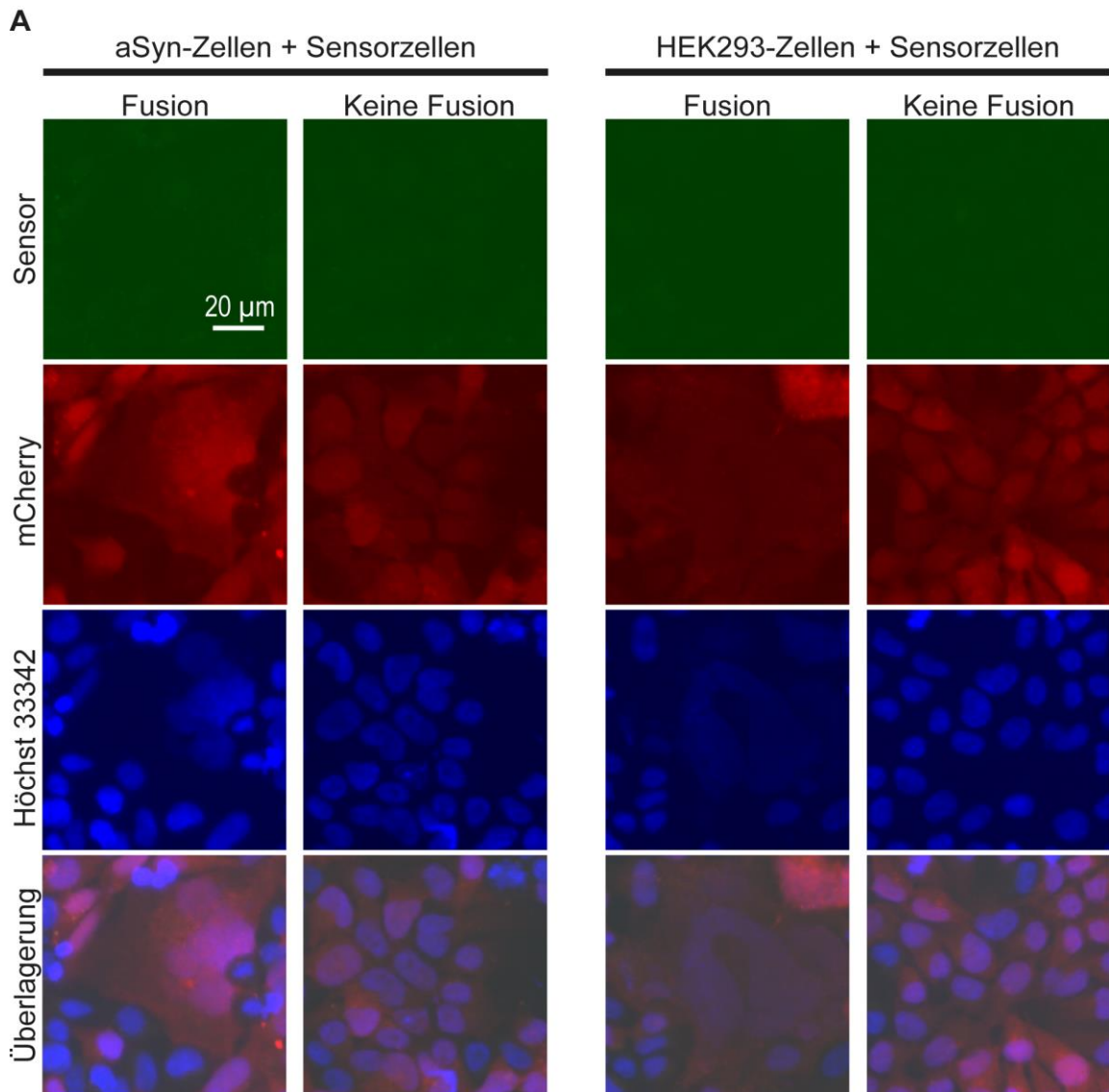


Abbildung 27: Zellfusion von α Syn-Zellen und Sensorzellen. **A:** Gleich skalierte repräsentative Epifluoreszenzbilder der Zellfusion aus induzierten α Syn-Zellen und Sensorzellen (links) bzw. aus HEK293-Zellen und Sensorzellen als Kontrolle (rechts).

3.9 Überprüfung von Liquor auf α -Synuclein

Ziel des Experimentes war es, zu testen, ob α Syn aus Liquor ins Zytosol von Zellen eindringen kann und ob Sensorzellen zwischen Patienten mit MP und ohne MP unterscheiden können und somit eventuell als diagnostisches Mittel genutzt werden können.

Der Liquor wurde wie unter 2.7.1 beschrieben am Morgen von nüchternen Patienten mittels Lumbalpunktion gewonnen und die in 2.7.2 aufgelisteten Liquorproben genutzt. Der Liquor wurde 24 h nach Aussaat zu den Zellen hinzugegeben und Bilder nach Fixierung nach weiteren 24 h akquiriert (2.7.3).

MP-Patienten waren im Mittel $72,12 \pm 1,16$ Jahre alt (Mittelwert \pm SEM), davon 23 weiblich, 37 männlich. Lewy-Körper-Demenz-Patienten waren im Mittel $67,80 \pm 2,35$ Jahre alt, davon 3 weiblich und 2 männlich. Die Multisystematrophie-Patientin war 70,00 Jahre alt.

Kontroll-Patienten (Patienten ohne MP oder einer anderen Synucleinopathie, aber mit einer anderen nicht assoziierten neurologischen Erkrankung) waren im Mittel $70,95 \pm 1,52$ Jahre alt, davon 23 weiblich, 19 männlich. Die Patientengruppen unterschieden sich somit nicht signifikant (*One-Way-ANOVA* mit *Tukey's Post-hoc-Test*) in Hinblick auf ihr Alter.

Als Kontrolle, ob Liquor an sich eine Änderung der GFP-Fluoreszenz und somit des Sensorsignals hervorruft, wurde Liquor (sowohl von MP-Patienten (Parkinson-Liquor) als auch Kontroll-Patienten (Kontroll-Liquor)) auf HEK293-Zellen gegeben. Man erkannte keinen Unterschied zwischen HEK293-Zellen, welche keinen Liquor erhalten hatten, und jenen, welche Liquor erhalten hatten (Abbildung 28 A1 und B1). Der leichte Unterschied in den repräsentativen Bildern lässt sich durch die Autofluoreszenz des Mediums erklären, welche bei Liquorgabe weniger vorhanden ist. Dieses Problem wird jedoch durch Abziehen des Hintergrunds in der Analyse eliminiert (6.2).

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Liquor selbst keine Fluoreszenzänderung der Zellen hervorruft.

Um zu testen, ob α Syn aus Liquor in Zellen eindringen kann, wurde Liquor auf Sensorzellen gegeben. Als Kontrolle wurde kein Liquor gegeben. Es zeigte sich ein geringer, aber eindeutiger und signifikanter Unterschied, dass mehr mit Liquor inkubierte Zellen ein positives Signal zeigen. Der signifikante Unterschied war dabei unabhängig davon, ob MP-Liquor, Kontrollliquor oder Liquor von Patienten mit Lewy-Körper-Demenz gegeben wurde (Abbildung 28 A2 und B1). Auch bei der Patientin mit Multisystematrophie (nicht abgebildet) zeigten sich mehr positive Zellen (0,8433 % der Zellen positiv) im Vergleich zu der Kontrolle, da es aber nur eine Patientin war, konnte die Signifikanz nicht errechnet werden.

Daraus wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass α Syn aus dem Liquor in das Zytosol von Zellen eindringen kann.

Zudem sollte überprüft werden, ob Sensorzellen zwischen Patienten mit MP und ohne MP unterscheiden können und eventuell als diagnostisches Mittel genutzt werden können. Dazu wurden Sensorzellen verglichen, welche entweder mit MP-Liquor oder mit Kontroll-Liquor inkubiert worden sind. Sensorzellen mit MP-Liquor hatten häufiger ein positives Sensorsignal als Sensorzellen mit Kontrollliquor. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Teilte man diese Patienten nach Geschlecht auf, so erkannte man, dass es zwischen männlichen MP-Patienten und männlichen Kontroll-Patienten einen Unterschied gab, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 28 B2).

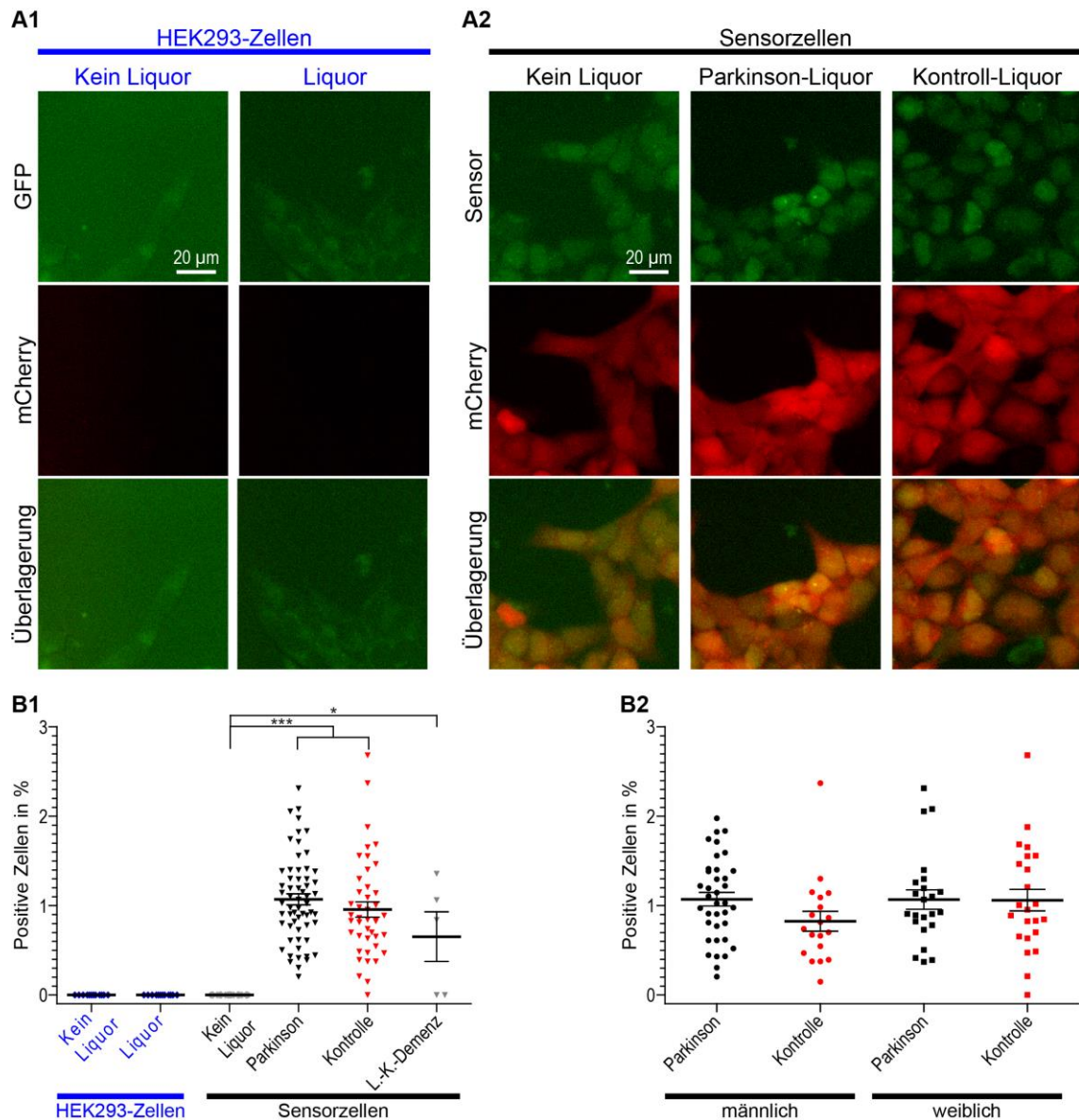


Abbildung 28: Überprüfung von Liquor auf α Syn. **A**: Gleich skalierte repräsentative, mit einem Biotek Cytation 3 Imaging Reader akquirierte Bilder der Zellen. **A1**: HEK293-Zellen ohne und mit Liquor. **A2**: Sensorzellen ohne Liquor und Sensorzellen mit Liquor von Patienten ohne MP (Kontroll-Liquor) und mit Liquor von Patienten mit MP (Parkinson-Liquor). **B**: Quantitative Auswertung des Anteils der positiven Sensorzellen oder HEK293-Zellen (B1 in blau) in Prozent. Als positiv wurden Zellen mit einem normalisierten Sensor-signal (GFP) über 400 AU gewertet. **B1**: Auswertung der HEK293-Zellen (in Grafik in blau geschrieben) ohne (12 ‚Proben‘ in technischer Triplikation, somit 36 Wells; insgesamt wurden 5.886 Zellen analysiert) und mit Liquor (12 Liquores in technischer Triplikation; insgesamt wurden 7.316 Zellen analysiert) sowie der Sensorzellen ohne Liquor (34 ‚Proben‘ in technischer Triplikation, somit 102 Wells; insgesamt wurden 84.625 Zellen analysiert) und Sensorzellen mit Liquor von Patienten ohne MP (42 Liquores in technischer Triplikation, somit 126 Wells) mit Liquor von Patienten mit MP (60 Liquores in technischer Triplikation, somit 180 Wells) und mit Liquor von Patienten mit Lewy-Körper-Demenz (L.-K.-Demenz, 5 Liquores in technischer Triplikation). Eine Normalverteilung wurde mittels Jarque-Bera-Test bestätigt. Das Signifikanzniveau wurde per *One-Way-ANOVA* mit *Tukey's*

Post-hoc-Test ermittelt. **B2**: Auswertung der Sensorzellen mit Liquor von Kontroll-Patienten und mit Liquor von MP-Patienten nach Geschlecht aufgeteilt.

Zudem sollte überprüft werden, ob eine positive Familienanamnese eine Änderung in der α Syn-Übertragung hervorruft (Abbildung 29). Dazu wurden alle Patienten, für die die Information vorlag, mit positiver Familienanamnese für MP unabhängig von ihrer Diagnose als eine Gruppe gewertet (17 Patienten) und als andere Gruppe alle Patienten mit negativer Familienanamnese für MP unabhängig von ihrer Diagnose (58 Patienten). Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit mehr positiven Sensorzellen in der Gruppe mit positiver Familienanamnese. Nach Geschlecht aufgetrennt erkannte man den gleichen Trend.

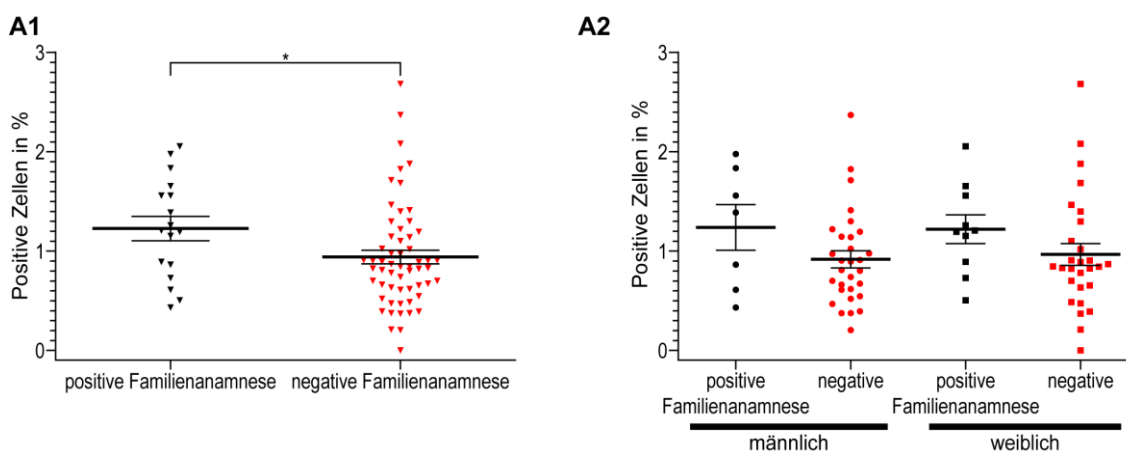


Abbildung 29: Überprüfung von Liquor auf α Syn in Verbindung mit der Familienanamnese. **A**: Quantitative Auswertung des Anteils der positiven Sensorzellen. Als positiv wurden Zellen mit einem normalisierten Sensorsignal (GFP) über 400 AU gewertet. **A1**: Die Patienten wurden nach positiver oder negativer Familienanamnese aufgeteilt. **A2**: Die Patienten wurden nach positiver oder negativer Familienanamnese und nach Geschlecht aufgeteilt.

Außerdem wurde eine Korrelation zwischen Sensorsignal (und damit übertragbarem α Syn) und Erkrankungsdauer, Alter bei Diagnose, MMSE-Punkten, UPDRS-Level und Hoehn&Yahr-Stadium getestet (Tabelle 9; Daten nicht dargestellt). Für die Erkrankungsdauer ergab sich eine positive Korrelation, d. h. je länger die Erkrankung bestand, desto höher war das Sensorsignal. Für das Alter bei Diagnose hingegen ergab sich eine negative Korrelation, d. h. je jünger der Patient bei Diagnose war, desto höher war das Sensorsignal. Zwischen Sensorsignal und MMSE-Punkten ergab sich ebenfalls eine negative Korrelation, d. h. je niedriger der *Score*, desto höher war das Sensorsignal. Für das UPDRS-Level ergab sich ebenso wie für das Hoehn&Yahr-Stadium eine positive Korrelation, d. h. je höher das Stadium, desto höher war das Sensorsignal. Jedoch zeigte keine einzige Korrelation Signifikanz, die r^2 -Werte waren stets $<0,05$.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik und Limitierungen der Studie

Hier sollen kurz allgemeine Limitierungen der Arbeit diskutiert werden, die spezielle Methodenkritik findet sich im jeweiligen Abschnitt der Diskussion.

Ein entscheidender Faktor, welcher die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit einschränkt, ist die Wahl der Zelllinie. Die Untersuchungen wurden an HEK293-Zellen durchgeführt. Da die Pathophysiologie von MP jedoch zu einem entscheidenden Teil im Gehirn abläuft, wäre eine Untersuchung an Neuronen ein weiterer Schritt, denn negative Ergebnisse bezüglich einer Übertragung von α Syn könnten am ausgewählten Zelltyp liegen. Jedoch wurde für ein stabiles Sensorsystem, welches hier etabliert werden sollte, eine Zelllinie benötigt. Hierbei wurden bereits vor meiner Zeit im Labor HEK293-Zellen als der beste Zelllinientyp ausgewählt.

Zudem sind diese Experimente nur *in vitro* durchgeführt. Hierdurch könnten entscheidende Interaktionen zwischen verschiedenen Zelltypen außer Acht gelassen worden sein, weshalb eine Untersuchung *in vivo* eine nächste Option wäre.

Eine weitere Limitierung der Aussagekraft dieser Arbeit liegt in der Verwendung von aufgereinigtem oder nativem Protein. In der Forschung werden derzeit insbesondere Oligomere und Fibrillen in der Pathophysiologie von MP diskutiert (1.3.2), weshalb sich bei der Untersuchung dieser α Syn-Spezies neue Aspekte bieten könnten.

Bei der Untersuchung von Liquor auf α Syn liegt eine entscheidende Einschränkung der Studie darin, dass die (klinische) Diagnose nicht zu 100% gesichert ist und somit eventuell teilweise falsche Diagnosen zum Liquor vorliegen, was das Ergebnis der Untersuchung verändern könnte (Rizzo *et al.* 2018). Jedoch wurden international anerkannte, standardisierte Verfahren zur Diagnosestellung genutzt, sodass sich der Trend der Ergebnisse auch bei hoher Fehl diagnoserate nicht ändern sollte.

Bei fast allen Experimenten wurde zur quantitativen Analyse der Grenzwert zu positiven Sensorzellen beim Mittelwert + 2 Standardabweichungen der Kontrolle gesetzt. Hierdurch wurde ein strenger Grenzwert gewählt, bei dem bei einer Gauß-Normalverteilung nur ca. 2% der Zellen in der Kontrollkondition als positiv gewertet werden sollten. Durch diesen strengen Grenzwert sollte sichergestellt werden, dass auch wirklich nur Zellen als positiv gewertet wurden, welche ein außergewöhnlich starkes Sensorsignal aufwiesen.

4.2 Funktionsweise des *Nanobody*-basierten Sensors

Im Labor von Professor Rizzoli wurde eine *Nanobody*-basierte Sensorzelllinie HEK293-mCherry-T2a-NbSyn87 (Sensorzellen, Sirion Biotech GmbH) entwickelt, welche das Pro-

tein α Syn nachweisen kann. Die Sensorzelllinie produziert ein Sensorprotein. Dieses besteht aus einem *Nanobody*, welcher α Syn binden kann, einem daran gekoppelten GFP und einem Kernlokalisierungssignal. Der Sensor wurde auf Basis des *Nanobodies* NbSyn87 entwickelt, welcher von Guillams *et al.* beschrieben wurde (Guilliams *et al.* 2013). Zu Beginn meiner Forschungstätigkeit stand folgende Hypothese: Ist α Syn vorhanden, bindet es den *Nanobody* und führt so zu einer Stabilisierung des Sensors. Der Sensor akkumuliert somit in Zellen mit viel α Syn. Durch das angekoppelte GFP ist eine Anreicherung des Sensors in Zellen mit dem Mikroskop zu erkennen (durch das Kernlokalisierungssignal wird das GFP im Kern konzentriert). Ist kein α Syn vorhanden, könnte der Sensor über das Proteasom durch Bindung an die proteasomale Untereinheit Rpn10 abgebaut werden (Abbildung 2).

4.2.1 Der Sensor wird in Abwesenheit von α -Synuclein über das Proteasom abgebaut

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde zuerst eine Bindung des *Nanobodies* an Rpn10 getestet, welche durch eine mit BLAST durchgeführte Suche wahrscheinlich erschien. Insbesondere der N-terminale Teil des Epitops inklusive der Aminosäuren ¹¹⁸VD¹¹⁹ von α Syn, die für die Bindung des *Nanobodies* essentiell sind (Guilliams *et al.* 2013), sind auch bei Rpn10 vorhanden. Mittels *Dot Blot* wurde gezeigt, dass NbSyn87 an die proteasomale Untereinheit Rpn10 bindet (3.2.1).

Ein *Dot Blot* bietet den Vorteil, dass es eine einfache, leicht reproduzierbare Methode ist. Der an NbSyn87 gekoppelte Fluoreszenzfarbstoff (Alexa647) führt nur sehr unwahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Bindung zwischen NbSyn87 und den Proteinen. Ein Nachteil der Methode ist, dass sie keine Aussage über die absolute Stärke einer Bindung erlaubt.

Mithilfe eines Nanotemper Monolith NT.115 sollte diese Bindung bestätigt werden und die Dissoziationskonstante K_d ermittelt werden (3.2.2). Der Nanotemper ist eine sensitive Methode, bei welcher automatisiert unterschiedliche Kontrollen durchgeführt werden. Ein Nachteil könnte sein, dass die Proteine durch Autofluoreszenz selbst zu der Gesamtfluoreszenz beitragen könnten und so mit steigender Proteinkonzentration an sich eine steigende Fluoreszenz auftritt. Dies wird allerdings dadurch kontrolliert, dass das Gerät überprüft, ob die Glaskapillaren eine gleiche Ausgangsfluoreszenz haben. Hierdurch werden auch Pipettierfehler vermieden, welche das Ergebnis verfälschen könnten. Ein weiteres Problem könnte sein, dass Proteine am Glas ‚kleben‘ bleiben und somit im Kapillarlumen eine niedrigere Proteinkonzentration vorherrscht als ursprünglich pipettiert. Dies wird jedoch auch vom Gerät kontrolliert.

Hiermit konnte eine Bindung zwischen NbSyn87 und Rpn10 bestätigt werden, wobei die K_d zwischen NbSyn87 und Rpn10 ca. 15 μ M beträgt (freundlicherweise von Natalia Waal, B. Sc., zur Verfügung gestellt). Somit konnte zusätzlich zu der im Original-Zeitschriftenaufsatz über den *Nanobody* NbSyn87 von Guillams (Guilliams *et al.* 2013) gezeigten Bindung an α Syn eine Bindung des *Nanobodies* an Rpn10 nachgewiesen werden.

Fraglich bleibt nur, ob ein Abbau über das Proteasom auch in Zellen stattfindet oder diese Ergebnisse auf den *Nanobody* beschränkt sind.

Um dies zu überprüfen – ob der Sensor in Zellen tatsächlich über das Proteasom abgebaut wird, wie der *Nanobody* vermuten lässt – wurde das Proteasom mit MG 132 inhibiert (3.3.1 und 3.3.2). Bei Hemmung des Proteasoms reichert sich der Sensor an. Im Vergleich zu mCherry reichert er sich stärker an. Dies zeigt, dass der Sensor über das Proteasom abgebaut wird und das stärker als mCherry, beweist allerdings nicht einen spezifischen Abbau über das Proteasom.

Betrachtet man jedoch nun die Ergebnisse aus den Experimenten mit *Nanobody* und Zellen zusammen, so lässt sich folgende Schlussfolgerung ableiten: Da der Sensor in Zellen über das Proteasom abgebaut wird und eine spezifische Bindung des *Nanobodies* an das Proteasom gezeigt worden ist, kann man auch in Zellen eine spezifische Bindung des Sensors an das Proteasom und somit einen spezifischen Abbau annehmen.

Dieser spezifische Abbau kann einen eventuell schon ohnehin vorkommenden Abbau über das Proteasom verstärken und so zu Zellen mit einem extrem niedrigen Grundlevel an Sensor führen. Ohne einen solchen spezifischen Abbau wäre das GFP-Signal vermutlich deutlich höher und es gäbe auch in Abwesenheit von α Syn GFP-positive Zellen, was sie als Sensorzellen unbrauchbar machen würde.

Das 26S-Proteasom ist ca. 2,5 MDa groß und besteht aus einer proteolytischen 20S- und einer regulatorischen 19S-Untereinheit (Schreiber und Peter 2014). Die 19S-Untereinheit wiederum besteht aus einem *lid* und einer *base*. Dass der Sensor bei zielgerichteter Bindung an Rpn10 degradiert wird, ergibt im Hinblick auf die Struktur des Proteasoms durchaus Sinn, da sich Rpn10 an dem *lid* des Proteasoms befindet (Ding *et al.* 2017). Rpn10 scheint dabei an der Verbindung zwischen *lid* und *base* essentiell beteiligt zu sein (Keren-Kaplan *et al.* 2016). Neben dieser Lokalisation, an welche der *Nanobody* bindet und welche eine Degradation über das Proteasom wahrscheinlich macht, ist Rpn10 außerdem der erste identifizierte intrinsische Ubiquitin-Rezeptor des Proteasoms (Elsasser *et al.* 2004). Es besitzt eine N-terminale von-Willebrand-Faktor-Typ-A-Domäne, welche mit proteasomalen Untereinheiten interagieren kann, während der C-Terminus an Ubiquitin binden kann (Keren-Kaplan *et al.* 2016). Eine Proteindegradation über das Ubiquitin-26S-Proteasom-System ist extrem verbreitet. Eine Bindung des *Nanobodies* an einen essentiellen Bestandteil desselben lässt einen Abbau über das Proteasom noch wahrscheinlicher erscheinen.

4.2.2 Der Sensor wird in Zellen durch α -Synuclein stabilisiert

Zunächst wurde die Bindung zwischen *Nanobody* und α Syn überprüft. Ein *Dot Blot* zeigte eine Bindung zwischen NbSyn87 und α Syn (3.2.1). Die mittels Nanotemper Monolith NT.115 gemessene K_d zwischen NbSyn87 und α Syn von $13,9362 \pm 5,8425$ nM bei 25 °C stimmt gut mit der von Williams (Williams *et al.* 2013) beschriebenen K_d von $14,2 \pm 8,4$ nM bei 25 °C überein, was NbSyn87 zu einem sehr guten Detektor für Protein macht (3.2.2). Eine so gute Bindung ist für *Nanobodies* nicht ungewöhnlich, denn trotz Verringe-

rung der Fab um die L-Ketten werden bei *Nanobodies* häufig Dissoziationskonstanten im niedrigen nanomolaren bis picomolaren Bereich erreicht (Muyldermans 2013).

Bei zunehmender Transfektion mit α Syn reicherte sich der Sensor zunehmend an, was durch ein stärkeres GFP-Signal nachgewiesen wurde (3.3.3). Um etwaige Einflüsse des Plasmids an sich und Lipofectamine2000 (z. B. Zelltoxizität) auf den Sensor auszuschließen, wurde in jeder Kondition sowohl die gleiche Gesamtmenge an Lipofectamine2000 als auch Plasmid durch Auffüllung der Plasmidmenge mit einem leeren *backbone*-Plasmid sichergestellt (2.6.8).

Auch im *Western Blot* zeigte sich eine Anreicherung des Sensors bei höherer α Syn-Transfektion (3.3.4). Diese Anreicherung hätte auch auf ungleichmäßiger Auftragung von Proben auf das Gel liegen können. Jedoch wurde erst ein BCA durchgeführt. Dadurch wurde sichergestellt, dass bei allen Experimenten und Konditionen die gleiche absolute Proteinmenge pro Tasche in exakt gleichem Volumen in eine SDS-PAGE aufgetragen wird. Durch die Verwendung eines anti- β Actin-Antikörpers wurde dies zusätzlich überprüft. Somit beruhte die Sensoranreicherung im *Western Blot* auf einer tatsächlichen Anreicherung des Sensors in den Zellen. Interessanterweise erkennt man auch bei nicht transfizierten Sensorzellen ein sehr schwaches GFP-Signal (in Zellen und im *Western Blot*), was bedeuten könnte, dass der Sensor, welcher bei Induktion laufend neu gebildet wird, zwar größtenteils über das Proteasom abgebaut wird, aber ein wenig Sensor immer vorhanden ist.

α Syn scheint also einen Abbau des Sensors über das Proteasom zu verhindern und führt zu einer Akkumulation des Sensors. Der Grund hierfür ist, dass der Sensor α Syn gegenüber Rpn10 bevorzugt. Dies konnte im *Dot Blot* für den *Nanobody* gezeigt werden, bei dem man für α Syn auch bei niedrigeren Konzentrationen schon ein deutlich stärkeres Signal erkennt (3.2.1). Der *Nanobody* bindet gleich viele Rpn10- wie α Syn-Epitope, wenn Rpn10 in 10-fach höherer Konzentration als α Syn vorliegt. Durch die K_d -Bestimmung konnte gezeigt werden, dass der *Nanobody* ca. 1000-fach besser an α Syn als an Rpn10 bindet (3.2.2.2). An α Syn bindet er somit verständlicherweise besser, was durch eine *Alignment*-Analyse erklärt werden kann, bei der das Epitop des *Nanobodies*, welches die Aminosäuren 118-131 von α Syn darstellen (Guilliams *et al.* 2013), nur teilweise mit der Rpn10-Sequenz übereinstimmt (Abbildung 6).

4.2.3 Der Sensor weist α -Synuclein ab ca. 120 fg im Zytosol nach

Mittels quantitativen *Immunoblots* konnte berechnet werden, dass in einer einzelnen Sensorzelle ca. 120 fg α Syn notwendig sind, um den Sensor zu aktivieren, dies entspricht ca. 3 μ M α Syn oder ca. 5 Millionen Molekülen α Syn und damit GFP in einer durchschnittlichen HEK293-Zelle (3.3.4). In einer durchschnittlichen Synapse kommt α Syn in ca. 22 μ M vor (Wilhelm *et al.* 2014), sodass der Sensor in Synapsen sogar endogenes α Syn nachweisen können müsste.

Quantifizierung von Proteinen mittels *Western Blot* ist eine schon seit langem genutzte Technik (Schiavini *et al.* 1989), die noch heute trotz neuer Techniken genutzt wird (Wil-

helm *et al.* 2014). Der Unterschied zu einem rein qualitativen Nachweis von Protein liegt in der zusätzlichen Nutzung eines Proteinstandards, der parallel durchgeführt wird, um die absolute Proteinmenge einer Probe zu ermitteln (Taylor und Posch 2014). Dies führt zu mehreren methodischen Problemen in diesem Experiment. Erstens könnte sich das Standardprotein vom endogenen Probenprotein durch posttranslationale Modifikationen unterscheiden. Dies könnte zu einer Beeinträchtigung der Antikörper-Spezifität führen. Der in diesem Experiment genutzte Antikörper kann allerdings α Syn verschiedener Spezies mit leicht unterschiedlicher Aminosäuresequenz nachweisen, sodass er nicht hochspezifisch für eine einzige Aminosäuresequenz zu sein scheint und dieses Problem eventuell vernachlässigt werden kann. Zweitens kann ein Problem sein, dass das Protein nicht vollständig vom Gel auf die Membran übertragen wird. Im Experiment erkennt man eine Sättigung der Standardproteinkurve bei 5 μ g, was entweder an einer nicht vollständigen Übertragung an Protein liegen könnte; oder aber daran, dass bereits bei weniger als 5 μ g aufgetragenem Protein die Proteine so dicht liegen, dass die Antikörper nicht mehr alle freien Bindungsstellen binden können, weil sie sich gegenseitig räumlich behindern, was aber durch die Verwendung eines *Nanobodies* von ca. 15kDa Größe eher unwahrscheinlich ist. Dieses Problem ist allerdings irrelevant, da im relevanten Bereich unter 1 μ g ein linearer Anstieg der Standardproteinkurve zu erkennen ist, welche zudem als eine Sättigungskurve berechnet wurde, was dieses Problem beheben sollte. Nebenbei können noch weitere Probleme auftreten, diese wurden durch verschiedene Qualitätssicherungen kontrolliert, z. B. durch BCA sichergestellte gleichmäßige Auftragung von Protein in den Proben.

Die aus diesem Experiment erfolgte Rechnung (Tabelle 16, Tabelle 17) ist natürlich nur als ungefähre Überlegung und nicht als absolute Zahl gedacht, um abschätzen zu können, ob die Nachweisgrenze in einem plausiblen Bereich liegt und die Zellen als Detektor für α Syn dienen können. Dabei wurden alle in der Formel vorhandenen Variablen durch Experimente ermittelt, bis auf den Schätzwert, wie viel Prozent der Zellen von der Platte gelöst werden konnten. Hierbei wurde mit 80% (ca. 80% der im Well gewachsenen Zellen wurden eingesammelt) ein eher niedriger Wert gewählt, um sicher zu gehen, dass man den Sensor nicht zu sensitiv einschätzt. Zudem wurde für die Berechnung die Kondition mit 0,5 μ g genutzt, was auch sehr vorsichtig berechnet ist, weil vorher gezeigt werden konnte, dass bereits 0,2 μ g Plasmid zu positiven Sensorzellen führen (3.3.3). Somit war in den Sensorzellen schon mehr α Syn vorhanden, als eigentlich notwendig ist, um den Sensor positiv werden zu lassen. Die Grenze, ab wann der Sensor positiv ist, wurde demnach sehr vorsichtig geschätzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Sensor sensitiv genug zu sein scheint, um in der Zellkultur genutzt zu werden.

4.2.4 Der Sensor ist spezifisch für humanes α -Synuclein

Verschiedene Arten von Synuclein wurden transfiziert (3.3.5). Eine Immunfluoreszenzfärbung zeigte, dass die verschiedenen Proteine zu einem ungefähr gleichen Level in den un-

terschiedlichen Sensorzellen exprimiert wurden. Der Sensor wurde jedoch nur bei humanem α Syn positiv. Bei Ratten- α Syn und humanem β Syn blieb er negativ. Daraus lässt sich schließen, dass der Sensor – zumindest im Hinblick auf die hier getesteten Synuclein-Arten – spezifisch ist.

Dies lässt sich mit Blick auf die Aminosäuresequenz erklären, welche einen Unterschied zwischen den unterschiedlichen Synuclein-Arten im Epitop des Sensors zeigt (Abbildung 13). Bei humanem β Syn, welches im Epitop des Sensors von humanem α Syn sehr stark abweicht, lässt sich dies leicht nachvollziehen. Bei Ratten- α Syn hat schon die kleine Abweichung der zwei Aminosäuren $^{121}\text{DN}^{122}$ des Epitops zu $^{121}\text{SS}^{122}$ in Ratten- α Syn den Verlust der Bindungsfähigkeit des Sensors zur Folge. Sie scheinen also zusätzlich zu den Aminosäuren $^{118}\text{VD}^{119}$ (Guilliams *et al.* 2013) essentiell für die Bindung des *Nanobodies* zu sein. Stellt man sich nun die Frage, weshalb der Sensor an humanes Rpn10 bindet, so zeigt sich erstens, dass hier nur eine Abweichung der Aminosäuren zu $^{348}\text{NN}^{349}$ vorliegt und somit zumindest eine der beiden für die Bindung essentiellen Aminosäuren übereinstimmt. Zweitens ist auch die Bindung von Rpn10 deutlich schlechter als von humanem α Syn. Somit könnte es durchaus sein, dass der Sensor an Ratten- α Syn noch bindet, aber deutlich schlechter als an humanes α Syn und zu schlecht, als dass der Sensor positiv werden könnte. α Syn der Maus kann der Sensor – obwohl es hier nicht getestet wurde – höchstwahrscheinlich auch nicht nachweisen, da die Aminosäuresequenz des Maus- α Syn ebenfalls an den Aminosäuren $^{121}\text{DN}^{122}$ vom Epitop zu $^{121}\text{GS}^{122}$ abweicht.

4.2.5 Sensorzellfunktionsweise

Ein *Nanobody*-basierter Sensor in Zellen hat den Vorteil, dass eindeutig überprüft werden kann, ob ein Protein im Zytosol vorliegt oder nicht. Dies ist essentiell für die α Syn-Übertragung, da im Zytosol das endogene α Syn vorliegt (Grozdanov und Danzer 2018). Die Detektionsgrenze für α Syn liegt in einem plausiblen Bereich, um hiermit Proteinübertragung in Zellkulturen zu untersuchen. *Nanobodies* sind sehr attraktiv für die Nutzung in Zellkulturen, denn sie sind sehr stabil: Inkubationen bei 37 °C über mehrere Wochen scheinen toleriert zu werden (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997). Das Prinzip *Nanobodies* in Zellen zur Detektion intrazellulärer Proteine zu nutzen, wurde erstmals 2006 angewandt. An fluoreszente Proteine gekoppelte *Nanobodies* wurden hierfür in Zellen exprimiert, um mit diesen sogenannten *chromobodies* intrazelluläre Antigene nachzuweisen (Rothbauer *et al.* 2006). Zudem wurden *Nanobodies* genutzt, um Strukturveränderungen von Proteinen per *ratio imaging* nachzuweisen oder Proteininteraktionen zu detektieren (Muyldermans 2013). Außerdem wurden *Nanobodies* beschrieben, die ihr Zielprotein über proteasomale Degradation abbauen können, indem GFP-spezifische *Nanobodies* an eine F-Box Domäne gekoppelt werden, um so durch Polyubiquitinierung über das Proteasom abgebaut zu werden (Causinus *et al.* 2011). Bei einem ähnlichen Ansatz wurden *Nanobodies* an SPOP (*Speckle-type POZ protein*) gebunden, ein Adapterprotein des *Cullin-RING E3 ubiquitin ligase complex*, was ebenfalls durch Ubiquitinierung zum Abbau über das Proteasom führte (Shin *et al.* 2015). Für

den hier verwendeten *Nanobody* NbSyn87 wurde ein System beschrieben, welches ebenfalls durch Kopplung an ein Proteasomdegradationssignal zur Reduktion von intrazellulärem α Syn und Minderung der Zytotoxizität führte (Butler *et al.* 2016; Chatterjee *et al.* 2018). NbSyn87 führt bei Bindung an α Syn zu einer Veränderung der Sekundär- und Tertiärstruktur (El-Turk *et al.* 2016). Neben diesem Effekt auf die Struktur von α Syn wurde zudem beobachtet, dass NbSyn87 die Aggregation von α Syn verringert und das stärker als ein weiterer an α Syn bindender *Nanobody*, nämlich NbSyn2 (Iljina *et al.* 2017). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass dies daran liegt, dass NbSyn87 näher an der NAC-Region bindet als NbSyn2. Zudem führte eine Bindung der *Nanobodies* zu einer geringeren Formierung von Oligomeren und zu einer Konvertierung von toxischeren in weniger toxische Oligomere. Im Gegensatz zu dem bereits beschriebenen Abbau von Proteinen durch *Nanobodies* über das Proteasom, wurde hier ein System entwickelt, bei welchem zwar bei Abwesenheit des Zielantigens der *Nanobody* über das Proteasom abgebaut wird. Bei Expression des Zielantigens (α Syn) wird allerdings das Zielantigen durch Bindung an den *Nanobody* nicht abgebaut, sondern führt im Gegensatz zur Stabilisierung und Akkumulation des *Nanobodies*. Somit ist dieses System nicht als therapeutisches Mittel, sondern als potentiell diagnostisches Mittel und zum Nachweis zytosolischen α Syns gedacht. Dies ist meines Wissens die erste Beschreibung eines so funktionierenden Systems (Abbildung 30).

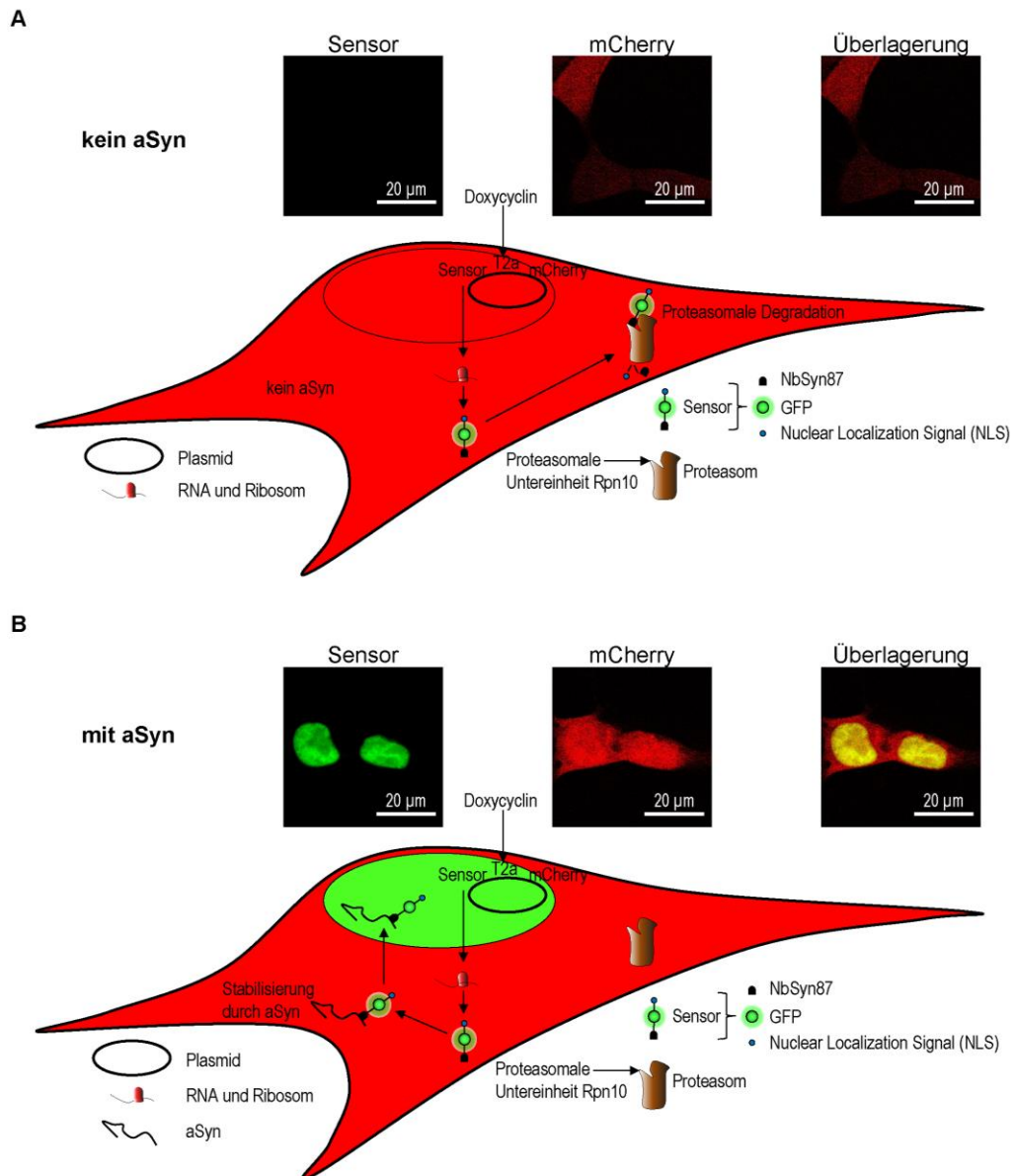


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Sensorzellen und repräsentative konfokale Bilder. Der Sensor wird zusammen mit mCherry nach Induktion durch Doxycyclin exprimiert. **A:** Bei Abwesenheit von α Syn wird der Sensor über das Proteasom spezifisch abgebaut. **B:** Bei Anwesenheit von α Syn bevorzugt der Sensor α Syn gegenüber dem Proteasom, wird ab ca. 120 fg humanem α Syn pro Zelle stabilisiert und führt zu einem GFP-reichen Zellkern.

4.3 Übertragung von α -Synuclein

Viele, insbesondere klinische Beobachtungen, deuten auf eine Übertragung von α Syn zwischen Zellen und eine Ausbreitung im Gehirn hin (1.3.3). Deshalb sollte das Sensorsystem zur Untersuchung einer möglichen Zell-zu-Zell-Übertragung von α Syn genutzt werden.

4.3.1 α -Synuclein wird *in vitro* bevorzugt mit einer lipidhaltigen Hülle ins Zytosol von Zellen aufgenommen

Nach Demonstration, dass stark negativ geladene Proteine wie (-30)GFP (ein Protein mit 30 negativen Ladungen), die normalerweise nicht ins Zytosol von Zellen eindringen können, mit einer kationischen Lipidhülle ins Zytosol von Zellen eingebracht werden können (3.4.1), wurde diese erstmals von Zuris *et al.* beschriebene Technik (Zuris *et al.* 2015) für α Syn angewandt (3.4.2). α Syn ist ein insbesondere am C-Terminus stark negativ geladenes Protein (Wales *et al.* 2013). Aus diesem Grund wurde die mit (-30)GFP demonstrierte Technik für α Syn durchgeführt. Dafür wurde das Medium der Sensorzellen auf 22 μ M α Syn gebracht, was zunächst exorbitant hoch erscheint. Jedoch kommt erstens α Syn in der Synapse in einer Konzentration von ca. 22 μ M vor (Wilhelm *et al.* 2014), was trotz dieser hohen Konzentration in einem kleinen Volumen wie der Synapse nur wenige Moleküle sind. Viele andere Moleküle kommen zumindest in der Synapse in ähnlichen oder höheren Konzentrationen vor (z. B. SNAP25 mit ca. 178 μ M). Zweitens werden zudem niemals alle α Syn-Moleküle aus dem Medium ins Zytosol der Zellen eindringen, sondern wenn überhaupt nur ein Bruchteil davon. Drittens wird in diesem Experiment innerhalb von 14 h ein Prozess untersucht, der sonst vermutlich Jahrzehnte dauert. Aus diesen Gründen sind solch hohe Konzentrationen gerechtfertigt. Es zeigte sich, dass α Syn allein („nacktes“ α Syn) nicht signifikant besser ins Zytosol von Zellen eindringen kann. In Kombination mit einem kationischen Lipid hingegen, welches sich an α Syn anlagert und vermutlich eine Art Hülle um α Syn bildet, dringt α Syn deutlich effizienter in das Zytosol von Zellen ein.

Trotzdem ist eine Aufnahme von „nacktem“ α Syn nicht ausgeschlossen, da in diesem Experiment – wie bereits erwähnt – innerhalb von 14 h ein Prozess untersucht wurde, der sonst vermutlich Jahrzehnte dauert. Somit könnte „nacktes“ α Syn von Zellen aufgenommen werden, wenn auch weniger effizient als α Syn mit Lipidhülle. Für eine Transmission von „nacktem“ α Syn gibt es in der Literatur einige Studien. Da im Liquor und in Zellkulturmedium extrazelluläres α Syn gefunden wurde (El-Agnaf *et al.* 2003), wobei die Menge an extrazellulärem α Syn mit der Menge an intrazellulärem α Syn korreliert (Reyes *et al.* 2015), ergibt sich die Frage nach der Art der Freisetzung. Passive Freisetzung in und aus Zellen durch Diffusion wurde für monomeres, aber nicht oligomeres α Syn beschrieben (Ahn *et al.* 2006) und ist vermutlich von einer Membrantranslokase abhängig, da α Syn nicht aus Vesikeln entkommen oder durch Lipiddoppelschichten dringen kann (Lee *et al.* 2005; Lee *et al.* 2008a). Dabei schien extrazellulär gegebenes α Syn durch die Zellmembran diffundieren zu können, während intrazelluläres α Syn nicht durch die Zellmembran diffundieren kann, evtl. aufgrund posttranslativ Modifikationen (Lee *et al.* 2008a). Eine passive Freisetzung durch zerstörte Membranen oder sogar Zelltod scheint nicht in großem Rahmen stattzufinden, denn es wurde *in vivo* gezeigt, dass für eine Transmission gesund funktionierende Neurone essentiell sind und nicht durch Zelltod stattfindet (Ulusoy *et al.* 2015). Dies stimmt gut mit der Beobachtung überein, dass sich α Syn-Pathologie entlang anatomischer Bahnen zwi-

schen Regionen, die miteinander verschaltet sind, ausbreitet und somit funktionelle Neurone notwendig sind (Braak *et al.* 2003).

Dieses freigesetzte ‚nackte‘ α Syn kann per Pinozytose – Clathrin-, Caveolae-, Actin-abhängig oder durch Rezeptor-vermittelte Endozytose – aufgenommen werden (Grozdanov und Danzer 2018). Eine Inhibierung der Endozytose durch Dynamin-Inhibierung oder eine Behandlung der Zellaußenseite mit Proteasen hatte eine Ansammlung von α Syn-Oligomeren und Aggregaten an der Zellmembran zur Folge (Lee *et al.* 2008a), was am ehesten eine Aufnahme per Rezeptor-vermittelter Endozytose impliziert, welche auch *in vivo* beobachtet worden ist (Hansen *et al.* 2011). Dafür spricht auch, dass α Syn-Ansammlungen auf der Zelloberfläche in Assoziation mit der α 3-Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase gefunden wurden (Lee *et al.* 2008b). Ein solcher Rezeptor könnte u. a. LAG3 (*lymphocyte activation gene*) sein, welches α Syn Fibrillen spezifisch bindet und dessen *knockout* zu verringerter Transmission und Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* führte (Mao *et al.* 2016).

Eine solche Endozytose von α Syn müsste zur erfolgreichen Übertragung von α Syn auch einen Weg beinhalten, wie α Syn aus den Endosomen heraus ins Zytosol entkommt. Denn wenn α Syn im Endosom bleibt, so würde es im Lysosom abgebaut und es fände keine tatsächliche Übertragung statt. Es wurde in der Tat gezeigt, dass aggregiertes α Syn dem endosomalen-lysosomalen System ins Zytosol entkommen kann und dann oxidativen Stress o.ä. induzieren kann (Freeman *et al.* 2013; Flavin *et al.* 2017). Dabei soll es zu einer Ruptur des Lysosoms kommen, was per fluoreszentelem Galectin-3 nachgewiesen wurde, ein Zucker bindendes Protein, welches β -Galactoside erkennt, die wiederum nur an der Zellmembranaußenseite oder Vesikelmembraninnenseite vorkommen und somit nur bei Vesikelruptur im Zytosol nachweisbar sind. Allerdings ist fraglich, wie und in welchem Umfang eine solche Lysosomruptur tatsächlich stattfindet.

In meinem Experiment jedoch zeigte sich, dass ‚nacktes‘ α Syn nicht effizient ins Zytosol von Zellen eindringen kann. α Syn mit einer Lipidhülle hingegen drang ins Zytosol von Zellen ein. Die Beobachtung, dass α Syn in einer Lipidhülle besser in Zellen als α Syn allein eindringen kann, ist konsistent mit einer vorherigen Studie (Luk *et al.* 2009). Strukturen, welche eine Lipidhülle um α Syn bilden, sind z. B. Exosomen. Auch wenn nur eine relativ geringe Menge an extrazellulärem α Syn mit Exosomen assoziiert ist, findet dessen Bedeutung in der Pathophysiologie von MP und als potentieller Biomarker größeres Interesse (Tofaris 2017). Exosomen sind extrazelluläre Vesikel von 40-120 nm Größe, die von unterschiedlichen Zellen wie HEK293 (Zheng *et al.* 2017) und Neuronen freigesetzt werden (Fauré *et al.* 2006). Exosomen werden aus einem endosomalen Kompartiment, den *multivesicular bodies*, freigesetzt, wobei diese Bildung durch Blockade des Lysosoms verstärkt werden kann. Sie können von Zellen über Endozytose oder Membranverschmelzung aufgenommen werden (Tofaris 2017). Sekretion von monomerem, oligomerem und aggregiertem α Syn in Assoziation mit Exosomen wurde bereits vor längerer Zeit beschrieben (Emmanouilidou *et al.* 2010; Alvarez-Erviti *et al.* 2011; Danzer *et al.* 2012). Exosomen allein, d. h. auch ohne α Syn-Inhalt, scheinen die Aggregation von α Syn zu beschleunigen (Grey *et al.*

2015). Des Weiteren führten Exosomen aus dem Liquor von MP-Patienten zu signifikant mehr α Syn-Aggregation in einer Reporter-Zelllinie als Exosomen aus dem Liquor von neurologischen Kontrollen (Stuendl *et al.* 2016).

Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen für monomeres α Syn wurde gezeigt, dass Neurone und Mikroglia α Syn-Oligomere mittels Exosomen deutlich effizienter als ‚nackte‘ α Syn-Oligomere aufnehmen (Danzer *et al.* 2012; Bliederhaeuser *et al.* 2016). Der Aufnahmeweg ist dabei noch umstritten. So wurde durch Bliederhaeuser *et al.* eine Aufnahme per Phagozytose nahegelegt, während eine andere Gruppe keine Minderung der α Syn-Aufnahme durch Exosomen bei Inhibierung der Phagozytose beobachtete (Delenclos *et al.* 2017). Interessanterweise wurde von dieser Gruppe eine Aufnahme ins Zytosol nur von α Syn in Exosomen, aber keine Aufnahme ins Zytosol von ‚nacktem‘ α Syn beobachtet, sondern nur eine Bindung an die Membranaußenseite. Dies stimmt gut mit meinem Ergebnis überein, da durch das Sensorsystem nur zytosolisches α Syn detektiert werden kann. Somit könnte es sein, dass bei meinem Experiment ‚nacktes‘ α Syn zwar an Zellen gebunden haben könnte, aber nicht effizient in das Zytosol von den Zellen aufgenommen wurde. α Syn in einer Lipidhülle hingegen scheint in das Zytosol von Zellen aufgenommen zu werden.

4.3.2 Keine Übertragung von α -Synuclein über das Medium von Zellen

Nachdem eine Aufnahme von künstlich zu Zellen gegebenem α Syn gezeigt worden war (3.4.2), wurde als nächstes eine Übertragung zwischen Zellen untersucht. Dazu sollte getestet werden, ob α Syn in irgendeiner Weise aus α Syn-produzierenden Zellen in das Medium gelangen kann und in andere Zellen eindringen kann. Das Medium wurde von α Syn-produzierenden Spenderzellen abgenommen und auf die Sensorzellen gegeben. Dadurch wurde sichergestellt, dass nur eine Übertragung durch das Medium, aber nicht durch direkten Kontakt der Zellen untersucht wird.

Ein Experiment, welches eine Übertragung von α Syn über das Medium zeigte, stellte sich als methodischer Fehler durch Plasmidübertragung und nicht Proteinübertragung heraus (3.5.2), obwohl DNase zur Plasmideliminierung hinzugegeben wurde (2.6.11). Durch ein Experiment mit Transfektion von HEK293-Zellen mit *pTOM70-EGFP* anstelle von α Syn konnte gezeigt werden, dass eine Plasmidübertragung durch das Medium (durch sorgfältiges Waschen der Zellen vor Mediumübertragung) eliminiert werden kann. Positive Sensorzellen würden dann eindeutig für eine Proteinübertragung über das Medium zwischen Zellen und nicht für eine Plasmidübertragung sprechen (3.5.4).

Bei Transfektion der HEK293-Zellen mit *paSyn-HA*, Waschen der Zellen und anschließender Übertragung des Mediums auf die Sensorzellen zeigten die Sensorzellen kein positives Signal im Vergleich zur Kontrolle (3.5.5). Somit hat keine Übertragung des Proteins α Syn zwischen Zellen durch das Medium stattgefunden. Durch dieses Experiment wurde eine Übertragung von ‚nacktem‘ α Syn oder α Syn in Exosomen zwischen HEK293-Zellen ausgeschlossen.

Das Ergebnis könnte aber auch dadurch zustande kommen, dass den Spenderzellen zu wenig Zeit gelassen wurde, α Syn in das Medium freizusetzen. Denn es wurde in diesem Experiment nicht überprüft, ob α Syn überhaupt in irgendeiner Form in das Medium freigesetzt worden ist. Allerdings wurden den Zellen 48 h für eine α Syn-Freisetzung gelassen, eine Zeitspanne, die auch von anderen Gruppen verwendet worden ist und mit der sich eine Übertragung von ‚nacktem‘ α Syn und α Syn in Exosomen nachweisen ließ (Danzer *et al.* 2012) und demzufolge die Zeitspanne ausreichen sollte. Ein anderer Grund könnte sein, dass keine Neuronen sondern HEK293-Zellen genutzt wurden. Übertragung von Exosomen hängt anscheinend vom Inhalt und den beteiligten Zellen ab (Mulcahy *et al.* 2014). Allerdings wurde für HEK293-Zellen schon eine Übertragung von amyloidogenem Protein in Exosomen beschrieben (Zheng *et al.* 2017), was nahelegt, dass der Zelltyp nicht der Grund für eine fehlende Übertragung ist.

Weil mit diesem Experiment jedoch eine Übertragung von α Syn zwischen HEK293-Zellen über direkten Kontakt nicht ausgeschlossen wurde, sollte als nächstes eine solche Übertragung mittels Kokultur überprüft werden.

4.3.3 Exkurs: Plasmidübertragung in Kokulturen

Ein Experiment, welches zunächst eine Übertragung von α Syn in der Kokultur zeigte, stellte sich als methodischer Fehler heraus (3.5.1). Trotz Waschen der Spenderzellen mit PBS nach Transfektion und DNase-Zugabe ins Medium (2.6.12.1) konnte Plasmid in Empfängerzellen nachgewiesen werden (3.6.1). Der Plasmidnachweis geschah indirekt durch *pTOM70-EGFP*, das für das Protein TOM70-EGFP kodiert, welches nicht in großem Maße zwischen Zellen ausgetauscht werden kann, da es ein mitochondriales ist. Da hierdurch die interzelluläre Übertragung von Protein ausgeschlossen ist, spricht somit ein Nachweis von TOM70-EGFP in Empfängerzellen für eine Plasmidübertragung und nicht Proteinübertragung. Der Plasmidnachweis in diesem Experiment könnte auf Plasmid beruhen, welches aktiv von Spenderzellen an Empfängerzellen weitergegeben wird oder aber auf Plasmid, welches von außen in die Zellen eindringt, weil es z. B. am Plastik des Wells anhaftet.

Auch nach Tötung der Spenderzellen mittels Ethanol oder DMSO (2.6.12.2) zeigte sich Plasmid in Empfängerzellen (3.6.2), was durch am Plastik des Wells anhaftendes Plasmid ausgelöst sein könnte, welches sich auch durch Waschen nicht entfernen lässt. Der Gehalt an Plasmid in Empfängerzellen schien aber im Vergleich zum Experiment ohne Tötung der Spenderzellen reduziert zu sein, weshalb eine aktive Übertragung weiter untersucht wurde. Dazu sollte sämtliche passive Übertragung entfernt werden. Wenn dann Empfängerzellen noch immer Plasmidaufnahme zeigten, würde dies eine aktive Plasmidübertragung bedeuten.

Deshalb wurde durch verschiedene methodische Schritte ausgeschlossen, dass Plasmid über andere Wege als aktiv durch die Zellen übertragen wird. Die Zellen wurden vom Plastik abgelöst, auf welchem sich noch Plasmid von der Transfektion befinden könnte, und

hierdurch eine direkte Transfektion der Sensorzellen durch am Glas anhaftende DNA verhindert. Die Übertragung frei oder im Komplex mit Lipofectamine2000 im Medium schwimmenden Plasmids wurde durch das Abnehmen des Mediums vor der Trypsinisierung, die Resuspension in neuem Medium, die Zentrifugierung, die erneute Resuspension in neuem Medium und die anschließende Gabe dieser Resuspension in neues Medium im Verhältnis von ca. 1:60 minimiert. Die Gabe von DNase vor der Trypsinisierung verringerte eine solche Übertragung ebenfalls und zusätzlich von an der Zellmembran der HEK293-Zellen anhaftenden, aber noch nicht gänzlich aufgenommenen Plasmids. Durch diese methodischen Schritte wurde ausgeschlossen, dass Plasmid über andere Wege als aktiv durch die Zellen übertragen wird. Nach Eliminierung der passiven Übertragung (2.6.12.3), zeigte sich noch immer eine Plasmidübertragung, was für eine aktive Plasmidübertragung spricht (3.6.3).

Um auszuschließen, dass diese positiven Empfängerzellen nur durch aus abgestorbenen Spenderzellen freigesetztes Plasmid transfiziert wurden, wurden die Spenderzellen nach Trypsinisierung mit Ethanol abgetötet. Nach Tötung der Spenderzellen durch Ethanol (2.6.12.4) verschwand dieser Effekt, was noch einmal unterstreicht, dass lebendige Zellen zur Plasmidübertragung notwendig sind. Theoretisch könnte aber auch das Ethanol zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals geführt haben.

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse jedoch für eine aktive Plasmidübertragung durch lebendige Zellen.

Plasmidübertragung im Sinne eines horizontalen Gentransfers ist ein seit langem bekanntes Phänomen. Bakterien können hierüber Plasmide in Form von Transformation, Konjugation oder Transduktion aufnehmen und darüber z. B. Resistenzplasmide austauschen (Sørensen *et al.* 2005). Zudem wurde Gentransfer zwischen Bakterien und Tieren beschrieben (Weiss und Chakraborty 2001; Waters 2001; Dunning Hotopp 2011). Sehr selten wurde horizontaler Gentransfer von Eukaryont zu Eukaryont beschrieben (Daniels *et al.* 1990; Engels 1997; Graham *et al.* 2008; Moran und Jarvik 2010; Hecht *et al.* 2010). Von Hecht *et al.* wurde z. B. die Integration von Genen von *Trypanosoma cruzi* ins menschliche Genom beobachtet. Dies ist allerdings ein Unterschied zu den in meinem Experiment künstlich in die Zellen eingebrachten Plasmiden. Jedoch zeigen diese Arbeiten, dass ein Gentransfer zwischen eukaryonten Zellen stattfinden kann.

Ein horizontaler Gentransfer könnte somit auch in einer künstlichen Situation wie einer Kokultur auftreten. Dort werden in eukaryonte Zellen Plasmide eingebracht, die übertragen werden könnten. Allerdings müssten dann Strukturen von eukaryonten Zellen ausgebildet werden, welche einen Plasmidtransfer ermöglichen. Diese Plasmidübertragung müsste über einen direkten Kontakt stattfinden, weil eine Plasmidübertragung in meinem Experiment durch Mediumübertragung ausgeschlossen worden ist (3.5.4.2). Was das für Strukturen sein könnten, ist spekulativ. In diesen Experimenten wurden im Durchmesser einige nm dicke, die Zellen verbindende Strukturen gesehen, in welchen sich geringe Mengen an Mitochondrien befinden (Abbildung 21). Dies könnten z. B. sogenannte *tunneling nanotubes*

sein, für welche bereits sehr viele Inhalte nachgewiesen wurden, welche übertragen wurden (Gerdes *et al.* 2007; Marzo *et al.* 2012). Darunter sind Organellen, wie Mitochondrien, oder Pathogene, wie HIV. Da von mir ein Plasmid genutzt wurde, welches ein mitochondriales Protein kodiert, wurde von mir eine Übertragung von Protein ausgeschlossen, weil dann Mitochondrien zwischen Zellen übertragen werden müssten. Eine Übertragung von Mitochondrien kann zwar über *tunneling nanotubes* stattfinden, aber in einem viel zu geringem Maße, als dass dadurch ein so starkes GFP-Signal wie in meinen Zellen nachweisbar wäre. Damit sollte die Nutzung des Plasmids zur Untersuchung einer Plasmidübertragung geeignet sein. Zudem könnten somit *tunneling nanotubes* theoretisch eine Plasmidübertragung zwischen eukaryonten Zellen ermöglichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Plasmidübertragung zwischen eukaryonten Zellen demnach stattzufinden scheint, über welchen Mechanismus ist jedoch unklar. Weitere Untersuchungen sind hierfür unumgänglich, eine direkte Beobachtung einer Plasmidübertragung, z. B. durch fluoreszent-markiertes Plasmid, würde einen letztendlichen Beweis einer solchen Übertragung erbringen.

Daher ist Plasmidübertragung ein großes Problem bei Kokulturen. Um dieses zu umgehen, sollten z. B. stabil transfizierte Zellen genutzt werden.

4.3.4 Keine Übertragung von α -Synuclein in Kokulturen von Zellen

Um eine Übertragung von α Syn zwischen Zellen weiter zu untersuchen, wurde eine Kokultur aus α Syn-exprimierenden Zellen und Sensorzellen angesetzt (3.7). Dafür wurden wegen der in 3.6 beobachteten Plasmidübertragung mit α Syn stabil transfizierte HEK293-Zellen genutzt (α Syn-Zellen), weil damit positive Sensorzellen eindeutig für eine Übertragung von Protein und nicht Plasmid stehen.

Sowohl nach 2 d als auch nach 5 d zeigte sich keine Übertragung von α Syn zwischen den Zellen. Somit wurde eine Übertragung von α Syn zwischen HEK293-Zellen ausgeschlossen. Dies widerspricht vielen bisherigen Studien, bei denen sich eine Übertragung von α Syn zwischen Zellen zeigte. Von daher könnte es an der Methode liegen, die zu diesem negativen Ergebnis führte. Erstens könnte von den α Syn-Zellen gar kein α Syn gebildet worden sein. Dies wurde jedoch überprüft und es zeigte sich eine hohe Expression von α Syn (Abbildung 26). Zweitens könnte es, wie bereits in 4.3.2 diskutiert, an den Zelltypen liegen. Drittens könnte eine zu kurze Zeit für die Kokultur gewählt worden sein, wie bereits in 4.3.2 diskutiert. Viertens könnte ein Verhältnis von zu wenigen α Syn-Zellen und zu vielen Sensorzellen zu einer α Syn-Übertragung unter Nachweisgrenze geführt haben. Jedoch lagen die Zellen in einem Verhältnis von ca. 4:1 (α Syn-Zellen:Sensorzellen) vor, was dieses Problem unwahrscheinlich macht. Fünftens wurde hier nur eine Überexpression von monomerem α Syn genutzt. Es scheinen insbesondere Oligomere an der Übertragung beteiligt zu sein, was in diesem Experiment nicht untersucht wurde.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Studien zur Übertragung von freiem α Syn oder α Syn in Exosomen, gab es Beobachtungen von α Syn-Übertragung durch direkten Kontakt.

So wurde eine Übertragung von α Syn in *tunneling nanotubes* zwischen Neuronen gezeigt, indem diese Lysosomen übertragen, welche α Syn enthielten (Abounit *et al.* 2016). Hierbei stellt sich jedoch wieder die Frage, ob α Syn ins Zytosol entkommen kann (4.3.1). Ähnliches wurde in einer Studie gezeigt, bei der sich *tunneling nanotubes* zwischen Perizyten von verstorbenen MP-Patienten zeigten (Dieriks *et al.* 2017). Das übertragene α Syn kommt jedoch auch hierbei nur punktförmig vor und es bleibt die Frage offen, ob eine Übertragung hierbei wirklich effizient ins Zytosol stattfindet. Da α Syn v. a. in der Synapse vorkommt und an der Vesikelexozytose beteiligt ist, liegt es nahe, dass es über die Synapse übertragen werden könnte. Eine Übertragung entlang synaptischer Bahnen wurde durch ein *in-vivo*-Experiment gezeigt, bei welchem Zellen der *Substantia nigra* mit einem α Syn-kodierenden Virus infiziert wurden, und α Syn-Pathologie im Striatum und in transplantierten embryonalen Zellen nachweisbar war, was jedoch auch auf einer Übertragung des Virus beruhen könnte (Angot *et al.* 2012). Eine andere Studie zeigt überzeugend eine trans-synaptische Übertragung mithilfe von injizierten α Syn-Fibrillen (Luk *et al.* 2012).

Eine Übertragung von α Syn zwischen Zellen wurde in meinem Experiment nicht beobachtet, kann durch mein Experiment aber sicherlich auch nicht widerlegt werden. Allerdings könnte es zeigen, dass die Übertragung von α Syn nicht so leicht passiert, wie durch viele Studien suggeriert wird. Die Übertragung von α Syn ist nicht unumstritten. So wird kritisiert, dass die meisten Studien bislang nicht endogen freigesetztes α Syn genutzt haben, weshalb eine Übertragung überbewertet werden könnte. So wurde α Syn durch Plasmide oder in transgenen Mäusen exprimiert, was eine Übertragung erleichtert haben könnte (Visanji *et al.* 2013). Auch eine Kopplung von α Syn an Fluoreszenzfarbstoffe könnte eine Übertragung erleichtern. Außerdem wird in einigen Studien eine Übertragung von α Syn berichtet, obwohl in den Empfängerzellen nur α Syn-positive, punktförmige Inklusionen ohne weitere Charakterisierung zu sehen sind (Reyes *et al.* 2015). Ob diese tatsächlich das Potenzial haben zu einer Verbreitung von α Syn und Neurodegeneration zu führen, ist fraglich. Durch Sastry *et al.* wurde keine Übertragung von α Syn *in vivo* beobachtet, was sie darauf zurückführen, dass bei anderen Studien häufig artifizielle Injektionen von α Syn-Fibrillen durchgeführt wurden (Luk *et al.* 2012), welche auch über andere Mechanismen, wie z. B. Entzündung, als Übertragung von α Syn zur Aggregation von α Syn führen könnten (Sastry *et al.* 2015). Außerdem wird sowohl der Zusammenhang zwischen α Syn-Pathologie und Klinik der MP-Patienten als auch die vorgeschlagene Progression von α Syn aus dem Enterischen Nervensystem ins Zentrale Nervensystem in Frage gestellt (Jellinger 2009; Angot *et al.* 2010; Visanji *et al.* 2013).

Jedoch ist eine Übertragung von α Syn nicht widerlegt. Viele Studien zeigen außerdem überzeugend eine Übertragung, und es gibt viele Hinweise für deren pathophysiologische Relevanz (1.3.3, 4.3.1). Insofern ist eine weitere Erforschung essentiell, um die teils widersprüchlichen Ergebnisse zu erklären.

4.3.5 Übertragung von α -Synuclein durch Liquor

In verschiedenen Körperflüssigkeiten, dabei insbesondere in Liquor, wurde α Syn nachgewiesen (El-Agnaf *et al.* 2003; Parnetti *et al.* 2019). Deshalb sollte, nachdem eine Übertragung von monomerem α Syn zwischen HEK293-Zellen nicht beobachtet wurde, das Verhalten von α Syn im Liquor von MP-Patienten untersucht werden (3.9).

Zunächst erfolgt eine theoretische Überlegung, ob das Sensorsystem für dieses Experiment überhaupt geeignet ist:

In einer Studie der gleichen Arbeitsgruppe, von welcher ich den Liquor erhalten habe, mit mehr als 350 Patienten, lag α Syn im Liquor bei MP in einer Konzentration von im Mittelwert 1,34 pg/ μ l vor, wobei die niedrigste Konzentration von allen Patienten bei einem MP-Patienten mit 0,14 pg/ μ l gemessen wurde (Mollenhauer *et al.* 2011). Wenn man sich an diesen Zahlen orientiert, kommt man zu folgender theoretischer Rechnung: In meinem Experiment wurden 50 μ l Liquor auf die Zellen gegeben und damit bei Verwendung von Liquor von MP-Patienten im Mittel ca. 67.000 fg α Syn/Well, im niedrigsten Fall 7.000 fg/Well. Da die Sensorzellen ab ca. 120 fg α Syn/Zelle positiv werden, können bei MP im Mittel 558 Sensorzellen/Well positiv werden. Bei neurologischen Kontrollen lag die α Syn-Konzentration bei im Mittel 2,22 pg/ μ l, damit wären es 111.000 fg α Syn/Well bei Verwendung von 50 μ l Liquor und es könnten theoretisch 925 Sensorzellen positiv werden. Würde das gesamte im Liquor vorhandene α Syn in die Zellen eindringen, so könnten ca. 3,9% der Zellen (558 Zellen positiv/14.000 ausgesäten Zellen (2.7.3)) bei Gabe von MP-Liquor positiv werden und ca. 6,6% (925 Zellen positiv/14.000 ausgesäten Zellen (2.7.3)) bei Kontroll-Liquor. Sicherlich dringt nur ein Teil des α Syn in die Zellen ein und teilt sich zudem auf mehrere Zellen auf. Dennoch sollte das Sensorsystem erstens das α Syn im Liquor und zweitens einen Unterschied zwischen Kontroll-Liquor und Parkinson-Liquor detektieren können, falls es einen Unterschied zwischen MP und Kontrolle gibt. Auch abgesehen von dieser sehr theoretischen Überlegung, sollte das Sensorsystem für dieses Experiment geeignet sein.

Bei meinem Experiment, in dem mehr als 100 Patientenliquores getestet wurden, waren nach Liquorgabe signifikant mehr Sensorzellen positiv im Vergleich zu Sensorzellen ohne Liquorgabe (3.9). Eine Beeinflussung der Zellen durch Eigenschaften des Liquors wie Autofluoreszenz oder andere Störfaktoren wurde durch ein Experiment mit HEK293-Zellen ausgeschlossen, bei denen sich kein Unterschied zwischen HEK293-Zellen mit oder ohne Liquorgabe fand. Deshalb musste der positive Sensor auf α Syn beruhen und es wurde somit eine Übertragung von α Syn aus dem Liquor in Sensorzellen beobachtet. Dabei war es egal, ob der Liquor von MP-, Lewy-Körper-Demenz- oder Kontroll-Patienten stammte. Daraus wird die Schlussfolgerung gezogen, dass α Syn auch bei (mit Blick auf MP) gesunden Menschen zwischen Zellen übertragen wird. Die Übertragung von α Syn scheint also nicht nur ein pathologischer Vorgang, sondern ein physiologischer Prozess zu sein, was auch das Vorhandensein von α Syn im Liquor von gesunden Individuen vermuten lässt. Damit ergibt sich die Frage nach der Funktion einer Sekretion von α Syn von Zellen. Wäh-

rend die Sekretion von pathologischem α Syn Schutz vor Toxizität bilden könnte, kann bei monomerem α Syn eine physiologische Funktion angenommen werden, wie z. B. eine Verstärkung des Vesikelrecyclings (Grozdanov und Danzer 2018).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen fand sich nicht (Abbildung 28). Trennte man die Patientengruppen nach Geschlecht auf, so gab es ein höheres Sensorsignal bei männlichen MP-Patienten im Vergleich zu männlichen Kontroll-Patienten, jedoch nicht signifikant. Bei Frauen gab es keinen signifikanten Unterschied. Die Prävalenz und Inzidenz für MP ist bei Männern um den Faktor von ca. 1,5 höher als bei Frauen (Moisan *et al.* 2016). Dies kann einerseits an einem anderen Lebensstil mit Aussetzung gegenüber anderen Risikofaktoren im Vergleich zu Frauen liegen, obwohl klassische Risikofaktoren wie Rauchen und Alkohol das Risiko, an MP zu erkranken, senken (Noyce *et al.* 2012). Es könnte andererseits auch durch endogene Faktoren erklärt werden, was bei einem Teil der Männer zu einem leichter übertragbaren α Syn führen könnte, sodass diese Männer eher MP entwickeln. Allerdings ist in meinem Experiment das Sensorsignal bei männlichen MP-Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten nicht erhöht, sondern die männlichen Kontroll-Patienten zeigen ein geringeres Sensorsignal als die männlichen und weiblichen MP-Patienten sowie als die weiblichen Kontroll-Patienten. Dies macht eine Veränderung des α Syn bei männlichen MP-Patienten unwahrscheinlich. Weitere Experimente sind notwendig, um die hier gefundenen Ergebnisse weiter zu untersuchen, z. B. mithilfe einer größeren Patientengruppe.

MP-Liquor scheint bei Betrachtung aller Patienten etwas mehr übertragbares α Syn als Kontroll-Liquor zu enthalten, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ist. Laut einer Metaanalyse aus 17 Studien, die teilweise sehr widersprüchlich sind, ist im Liquor von MP-Patienten eine geringere Konzentration an α Syn vorhanden als im Liquor von neurologischen Kontrollen (Gao *et al.* 2015). Dies widerspricht auf den ersten Blick meinem Ergebnis. Allerdings ergaben erstens die Studien teilweise auch erhöhtes α Syn bei MP und zweitens wurde in den bisherigen Studien nur die Menge an α Syn untersucht. Bei meinem Experiment wird jedoch untersucht, aus welchem Liquor mehr α Syn in die Zellen eindringen kann. Somit könnte mein Ergebnis bedeuten, dass α Syn bei MP in einer leichter übertragbaren Form vorliegt, auch wenn die absolute Konzentration von α Syn bei neurologischen Kontrollen höher ist. Das hier beschriebene System wäre damit das erste, welches pathophysiologisch übertragbares α Syn misst.

Eine solche Form könnten Oligomere sein, welche erhöht im Liquor von MP-Patienten vorkommen (Hansson *et al.* 2014). Dass α Syn in übertragbarer Form bei MP erhöht vorliegt, ergibt auch mit Blick auf bisherige Studien Sinn. Die Sekretion von α Syn wird durch Konditionen, welche eine Aggregation von α Syn fördern – wie Stress, lysosomale, mitochondriale und proteasomale Dysfunktion – gesteigert (Lee *et al.* 2005; Jang *et al.* 2010). Außerdem ist die α Syn-Sekretion von α Syn mit familiären MP-Mutationen *in vitro* erhöht (Lazaro *et al.* 2014). Somit könnte die Sekretion ein Versuch der Zellen sein, sich vor Aggregation zu schützen. Die Sekretion von aggregiertem α Syn könnte die Neurone vor Toxi-

zität schützen und darauf abzielen, dass dieses α Syn durch Phagozyten oder extrazelluläre Proteasen abgebaut wird (Grozdanov und Danzer 2018), denn Mikroglia können α Syn abbauen (Lee *et al.* 2008b) und im Gehirn von MP-Patienten wurden Proteasen gefunden, die extrazelluläres α Syn degradieren können (Ogawa *et al.* 2000).

Eine andere Form an leichter übertragbarem α Syn könnte in Exosomen vorliegendes α Syn sein. Während α Syn in freier Form bei MP im Liquor im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt zu sein scheint, liegt α Syn in Exosomen im Liquor von MP-Patienten in gleicher Menge wie bei Kontroll-Patienten vor. Auch wenn α Syn in Exosomen nur einen kleinen Teil des Gesamt- α Syn im Liquor ausmacht, könnte es eine entscheidende pathologische Form von α Syn sein, denn Exosomen aus dem Liquor von MP-Patienten führten zu signifikant mehr α Syn-Aggregation als aus Liquor von neurologischen Kontrollen (Stuendl *et al.* 2016).

Ähnliches konnte für Exosomen bei Lewy-Körper-Demenz gezeigt werden (Ngolab *et al.* 2017). Bei meinem Experiment zeigte sich bei Lewy-Körper-Demenz jedoch weniger α Syn als bei neurologischen Kontrollen. Dies liegt aber vermutlich an der geringen Patientenzahl ($n=5$) von Lewy-Körper-Demenz-Patienten und beruht nicht auf einem echten Unterschied. Aufgrund der geringen Patientenzahl wird hier nicht näher auf dieses Ergebnis eingegangen, es zeigte sich lediglich, dass auch in diesem Liquor übertragbares α Syn vorliegt.

Insgesamt waren die Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen aber nicht signifikant, deshalb zeigt mein Ergebnis, dass sich α Syn zwischen den Patienten in seinem Übertragungspotenzial nicht unterscheidet.

Ein Biomarker für die Diagnostik von MP ist erstrebenswert, auch wenn die klinische Diagnostik relativ präzise ist. In einer Studie wurde in einem *follow-up* nach 7,6 Jahren festgestellt, dass die MP-Diagnose durch MP-Spezialisten bei frühen MP-Patienten bei 8,1% der Patienten falsch war (Jankovic 2000). Somit waren >90% der Diagnosen korrekt. Dies ist ein gutes Ergebnis, jedoch gibt es auch Studien mit einer deutlich niedrigeren Spezifität (Hughes *et al.* 2001). So wurden in einer anderen Studie anfangs 43 von 65 Patienten mit Parkinson-Syndrom als MP diagnostiziert, wobei es bei 28 (65%) durch Autopsie bestätigt wurde (Rajput *et al.* 1991). Von daher ist eine Verbesserung der Diagnostik wünschenswert, indem diese durch weitere Techniken unterstützt wird, um so eine genauere und frühere Diagnosestellung und damit Therapie zu ermöglichen. Dadurch könnte ein Fortschreiten der Erkrankung und ein Auftreten von Symptomen weiter hinausgezögert werden. Des Weiteren könnte man evtl. Aussagen über die Progression der Erkrankung treffen.

α Syn im Liquor könnte ein solcher Biomarker sein (Maass *et al.* 2019; Parnetti *et al.* 2019). Die Sensorzellen sind in dieser Form jedoch nicht in der Diagnostik nutzbar, weil sich die Patientengruppen erstens nicht signifikant unterscheiden und sie sich zweitens sehr stark überschneiden (3.9). Allerdings wurde die als Grundlage genutzte Diagnose klinisch gestellt und nicht pathologisch, sodass das Ergebnis hierdurch verzerrt sein kann, weil die Diagnosen vermutlich nicht zu 100% stimmen.

Verschiedene α Syn-Arten treten im Liquor, Blut und Speichel auf (Simonsen *et al.* 2016). Auf Liquor wurde bereits ausführlich eingegangen. Im Plasma von MP-Patienten zeigte

sich eine erhöhte Anzahl von α Syn-enthaltenden Exosomen. Es konnte gezeigt werden, dass ^{125}I -gemarkertes α Syn, welches in das Gehirn injiziert wurde, in Plasmaexosomen detektiert werden kann, welche das neuronale Adhäsionsmolekül L1CAM (*L1-cell adhesion molecule*) exprimieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass L1CAM-aufweisende und somit ZNS (Zentrales Nervensystem)-abstammende, α Syn-enthaltende Exosomen bei MP-Patienten erhöht im Vergleich zu neurologischen Kontroll-Patienten vorkommen (Shi *et al.* 2014).

Jedoch kann bislang nicht sicher zwischen MP und anderen Erkrankungen unterschieden werden und es gibt – wie bereits erwähnt – starke Widersprüche in den bisherigen Studien. Somit muss ein solcher Biomarker für MP und andere Synucleinopathien weiter erforscht und optimiert werden (Llorens *et al.* 2016; Shahnawaz *et al.* 2017; Akhtar *et al.* 2018). Aus diesen Gründen ist Liquor bislang als diagnostisches Mittel für MP in der Leitlinie ausgeschlossen (Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016).

Bei meinem Experiment wurde keine signifikante Korrelation zwischen Sensorsignal (und damit übertragbarem α Syn) und Dauer der Erkrankung, Alter bei Diagnose, MMSE-Punkten, UPDRS-Level oder Hoehn und Yahr-Stadium gefunden (Tabelle 9; 3.9). Dies stimmt mit einigen Studien überein (Hong *et al.* 2010; van Dijk *et al.* 2014), andere wiederum haben eine Korrelation zwischen niedrigem α Syn-Level und Hoehn und Yahr-Stadium (Tokuda *et al.* 2006) oder posturaler Instabilität (Kang *et al.* 2013) beobachtet. Insofern ist auch der Zusammenhang zwischen α Syn und Krankheitsschwere und -verlauf umstritten.

In meinem Experiment zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten – ungeachtet ihrer Diagnose – mit positiver Familienanamnese im Vergleich zu Patienten mit negativer Familienanamnese (Abbildung 29). Dieser Trend zeigte sich auch bei Aufteilung der Patienten nach Geschlecht, allerdings war der Unterschied dann nicht mehr signifikant, was sich durch die dadurch geringere Anzahl an eingeschlossenen Patienten erklären lässt. Somit scheint bei positiver Familienanamnese eine leichter übertragbare Form an α Syn vorzuliegen. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da eine positive Familienanamnese ein sehr starker Risikofaktor für die Entwicklung eines MP ist. Eine große Metaanalyse (Noyce *et al.* 2012) zeigte, dass bei positiver Familienanamnese (irgendeines Verwandten) die *Odds Ratio* 4,45 für Entwicklung eines MP beträgt. Bei positiver Familienanamnese bei Verwandten ersten Grades beträgt die *Odds Ratio* 3,23. Die Risikoerhöhung durch eine positive Familienanamnese lässt eine genetische Prädisposition vermuten. Durch genomweite Assoziationsstudien konnte – wie bereits erwähnt – gezeigt werden, dass polymorphe Varianten im SNCA-Gen einen Risikofaktor für die Entwicklung des idiopathischen MP bilden (Satake *et al.* 2009; Simón-Sánchez *et al.* 2009; Edwards *et al.* 2010). Somit könnte die Risikoerhöhung für MP bei positiver Familienanamnese durch die Vererbung solcher Suszeptibilitätsloci erklärt werden, welche zu vermehrt leichter übertragbaren Formen an α Syn führen.

4.4 Ausblick

Mit dem Sensorsystem könnte man weitere Aspekte von α Syn untersuchen. So wäre ein nächster logischer Schritt, den Sensor in Neuronen zu exprimieren, was man über eine Virusinfektion mit dem Sensor erreichen könnte. Dadurch könnte man untersuchen, ob die in 3.5.5 und 3.7 nicht beobachtete α Syn-Transmission tatsächlich nicht stattfand oder am Zelltyp lag. Zudem könnte man verschiedene Fibrillen und Oligomere am Sensor testen, um zu prüfen, ob und welche Art am leichtesten ins Zytoplasma von Neuronen eindringen kann. Außerdem könnte man überprüfen, ob α Syn, wenn es mit einem kationischen Lipid gegeben wird, in Zellen mit positivem Sensor tatsächlich zytosolisch lokalisiert ist und ob α Syn allein in Zellen mit negativem Sensor wie vermutet nicht im Zytosol vorliegt, sondern z. B. in Verbindung mit endosomalen oder lysosomalen Markern. Zudem könnte man untersuchen, welche Bedingungen eine Aggregation von α Syn fördern, da der Sensor an Fibrillen etwas schlechter bindet als an monomeres α Syn und somit bei gleicher Expression von α Syn eine Aggregation zu leicht niedrigerem Sensorsignal führen müsste (Guilliams *et al.* 2013).

Auch der Zelltyp, in welchem der Sensor stabil transfiziert ist, könnte variiert werden; so könnten z. B. Neuroblastom-Zellen genutzt werden.

Außerdem könnte man den Sensor für die Untersuchung einer α Syn-Übertragung *in vivo* nutzen. Dabei könnte man entweder Tiere mit Virus infizieren oder aber transgene Tiere generieren (*Knock-in*-Mäuse), die den Sensor exprimieren. Nach Gabe von α Syn entweder durch direkte Injektion von α Syn ins Gehirn oder aber ebenfalls durch Virusinfektion könnte man eine Übertragung entlang anatomischer Bahnen untersuchen. Zudem könnte man den Sensor auch als induzierbaren Sensor gestalten, um so die natürliche Entwicklung der Tiere möglichst wenig zu beeinträchtigen.

Neben Experimenten zur Übertragbarkeit von α Syn, könnte man versuchen, den Sensor weiter zu optimieren, um ihn so für eine Diagnostik von MP nutzbar zu machen. Bislang überschneiden sich die Gruppen zwischen MP- und Kontroll-Liquor. Dies könnte an einer tatsächlichen Übereinstimmung der Gruppen in Bezug auf α Syn liegen oder aber an einer Ungenauigkeit des Sensors. Deshalb könnte man versuchen, das Hintergrundsignal des Sensors weiter zu senken oder die Sensitivität weiter zu steigern.

Neben neuen Anwendungen des Sensors könnte man auch den Sensor verändern. So könnte man versuchen, das Prinzip des Sensors auf neue Proteine zu übertragen. Dies ist allerdings relativ schwierig, weil ein solcher Sensor gleichzeitig sowohl das *protein of interest* als auch bestimmte Regionen des Proteasoms als Ziel haben müsste. Jedoch könnte man den Sensor theoretisch für jedes beliebige Protein nutzen, indem man an das *protein of interest* das Epitop des Sensors koppelt und dieses dadurch nur minimal modifiziert.

Somit gibt es noch viele weitere Untersuchungen, die man mit dem hier beschriebenen Sensorsystem durchführen könnte.

5 Zusammenfassung

α -Synuclein (α Syn) ist ein Protein, welches eine entscheidende Rolle bei Morbus Parkinson (MP) zu spielen scheint. Es soll an der Pathologie und Entstehung von MP beteiligt sein. Neuere Hinweise lassen eine Ausbreitung von α Syn zwischen Zellen vermuten, welche zur Progredienz der Erkrankung beitragen könnte. Eine solche Zell-zu-Zell-Übertragung von α Syn sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Dazu wurde zunächst ein *Nanobody*-basiertes Sensorsystem etabliert, welches aus dem an α Syn-bindenden *Nanobody* NbSyn87, einem daran gekoppelten *Green Fluorescent Protein* und einem Kernlokalisationsignal besteht. Dieser Sensor wird nach Induktion in einer Sensorzelllinie exprimiert. Aufgrund eines bei Abwesenheit von α Syn extrem niedrigen Levels an Sensor in Zellen und einer partiellen Übereinstimmung des *Nanobody*-Epitops mit der proteasomalen Untereinheit Rpn10 wurde ein Abbau des Sensors über das 26S-Proteasom angenommen. Ein spezifischer Abbau konnte durch Nachweis einer spezifischen Bindung des *Nanobodies* an Rpn10 mittels *Dot Blot* und Dissoziationskonstantenbestimmung mithilfe eines Nanotemper Monolith NT.115 sowie durch eine Anreicherung des Sensors bei Inhibierung des Proteasoms mithilfe von MG 132 veranschaulicht werden. Mittels *Dot Blot* und Nanotemper Monolith NT.115 wurde gezeigt, dass der *Nanobody* bevorzugt an α Syn bindet. Bei Abwesenheit von α Syn wird der Sensor daher über das Proteasom abgebaut, bei Anwesenheit von α Syn wird der Sensor stabilisiert, was durch ein zunehmendes Sensorsignal bei zunehmender Transfektion der Zellen mit α Syn dargestellt wurde. Zudem weist der Sensor spezifisch humanes α Syn nach und das ab einer Grenze von ca. 120 fg, was durch einen quantitativen *Western Blot* soweit möglich ermittelt wurde. Somit war der Sensor geeignet für eine Zellkultur und die Überprüfung einer Zell-zu-Zell-Übertragung.

Bei Gabe von α Syn mit einem kationischen Lipid wurde α Syn deutlich effizienter aufgenommen als α Syn allein. Dies könnte auf eine Übertragung von α Syn in Exosomen hindeuten. Eine Übertragung von α Syn über Wege ohne direkten Kontakt zwischen HEK293-Zellen konnte ausgeschlossen werden, indem das Medium von α Syn-exprimierenden Zellen auf die Sensorzellen gegeben wurde. Eine Übertragung von α Syn durch direkten Kontakt wurde durch eine Kokultur ausgeschlossen. Dies könnte jedoch daran liegen, dass keine Neurone genutzt wurden. Bei einer Kokultur von transfizierten Zellen trat als Problem Plasmidübertragung zwischen Zellen auf, welche anscheinend aktiv durch Zellen erfolgt.

Schließlich wurde Liquor von über 100 Patienten mit MP, Lewy-Körper-Demenz, MSA oder als Kontrolle mit anderen neurologischen Erkrankungen mithilfe der Sensorzellen auf α Syn untersucht. Bei allen Patienten zeigte sich α Syn im Liquor, bei MP-Patienten mehr als bei Kontroll-Patienten (dies erreichte jedoch nicht das Signifikanzniveau) und bei Patienten mit positiver Familienanamnese für MP mehr als bei negativer. Dies könnte bedeuten, dass α Syn bei MP vermehrt in leichter übertragbarer Form vorliegt. Zudem könnte auch bei positiver Familienanamnese eine solche Form von α Syn häufiger vorkommen.

6 Anhang

6.1 Matlab Script für die Analyse von mit Olympus IX71 erstellten Bildern

```
function vesan

global movi rr xx yy filename chol b2 Movi3 pixel_size image_matrix
positioner pixel_size limits

global list mapname b rows cols A q s ijj jjj r1 firstred olds
inner_radius outer_radius matrix backmatrix old_movi

global alignsx alignsy rect fused not_fused sh hex hey rrl imagenr
filename sub_back

cd 'E:\Olympus\Specifity';

q=1; s=4;

positioner=0;

imagenr=1;

[stat, mess]=fileattrib('*_0.tif');

dir *.tif;
pr= input('The first confocal file      ','s');
%rr1= input('The STED file      ','s');
pixel_size=20.20; %input('What is the pixel size ?');

%if rr1=='1'
%   name=strcat(rr(1:numel(rr)-4),'.mat');
%   load(name);
%else
rr=mess(imagenr).Name;

r1=strcat(rr(1:numel(rr)-6),'_0.tif');
```

```
r2=strcat(rr(1:numel(rr)-6),'_1.tif');

r3=strcat(rr(1:numel(rr)-6),'_2.tif');

r4=strcat(rr(1:numel(rr)-6),'_3.tif');

filename=strcat(rr(1:numel(rr)-4),'.txt');

movi=[];

movi(:,:,1)=imread(r1);
movi(:,:,2)=imread(r2);
movi(:,:,3)=imread(r3);
movi(:,:,4)=imread(r4);
%a=movi(:,:,1); a=a(1:5000,1:5000);
%b=movi(:,:,2); b=b(1:5000,1:5000);
%c=movi(:,:,3); c=c(1:5000,1:5000);

%movi(:,:,1)=a; movi(:,:,2)=b; movi(:,:,3)=c;

old_movi=movi;

sizz=size(movi);

chol=[];
inner_radius=10;
outer_radius=30;
image_matrix=[];
zz=[];
iii=0;jjj=1;
ijj=4;
backmatrix=[];
alignsx=[]; alignsy=[];
xx=[]; yy=[]; zz=[];
hex=[]; hey=[];

fused=[];sub_back=[];
not_fused=[];
```

```
% Mim = figure('toolbar','figure'); colormap(hot(255));
% scrsz=get(0, 'ScreenSize');
% set(Mim, 'Position', [300 500 scrsz(3)/3 scrsz(4)*2/3]);
% fsize=get(Mim,'Position');
ijj=0; step;
%STED=image(movi(:, :, sizz(3)), 'tag', 'him', 'cdatamapping', 'scaled');
axis square;

b=uicontrol('tag','ddd','style','pushbutton','callback','sroi_undo',...
.
            'position',[100 31 100 30],...
            'string','Undo');

%m=uicontrol('style','pushbutton', 'callback','sroi_align',...
%           'position',[0 0 50 30],'string','align');
%
dd=uicontrol('string','Step',...
            'style','pushbutton','callback','step',...
            'position',[100 0 50 30]);
ee=uicontrol('string','Stepback',...
            'style','pushbutton','callback','stepback',...
            'position',[150 0 50 30]);
%m=uicontrol('style','pushbutton', 'callback','sroi_hand_align',...
%           'position',[300 0 70 30],'string','Manual align');

m=uicontrol('style','pushbutton', 'callback','sroi_next',...
            'position',[400 0 70 30],'string','Next');

%   sh=uicontrol('Style',      'slider','Callback',@lut,'Max',      255,
'Min',0,'Value',255,...
% 'SliderStep',[0.025 0.1], 'Position', [550 0 100 30]);

set(gcf,'windowbuttondownfcn','sroi_00y');
```

6.2 Matlab Script für die Auswertung von mit Cytation erstellten Bildern

```
function sgetline
global Movi rows cols a xx yy pp x3 y3 x33 y33 r1 ijj star_nr selector
bxx cxx byy cyy background imagenr alignsx alignsy
global pixel_numbers positioner

Movi=[];

cd 'E:\Cytation\CSF';
the_limit=400;

cellb={};

[dsstat, dmmess]=fileattrib('*');
for i=1:numel(dmmess)
    if dmmess(i).directory
        cellb{numel(cellb)+1}=dmmess(i).Name;
    end;
end;
names={};values=[];

for abcdef=1:numel(cellb);
    big_values=[];
    abcdef
    name=cellb{abcdef};
    cd(name);

[stat, mess]=fileattrib('*RFP*.tif');
[stat2, mess2]=fileattrib('*GFP*.tif');

if stat==1

for i=1:numel(mess)
    values=[];
Movi(:, :, 1)=imread(mess(i).Name);
Movi(:, :, 2)=imread(mess2(i).Name);
```

```

Movi=double(Movi);
green=Movi(:, :, 2);
red=Movi(:, :, 1);

ccc=find(green>=mean(mean(green)));   cccp=numel(ccc)*100/numel(green);
if cccp<52

    H=fspecial('average',25);
    green_filt=imfilter(green,H,'replicate');
    red_filt=imfilter(red,H,'replicate');
%     green_filt=green_filt-imopen(green_filt,strel('disk',15));
%     ccc=find(green_filt<0); green_filt(ccc)=0;
%     red_filt=red_filt-imopen(red_filt,strel('disk',15));
%     ccc=find(red_filt<0); red_filt(ccc)=0;

old_blue=red_filt;
old_blue=old_blue*255/max(max(old_blue));

old_blue_filt=imfilter(old_blue,H,'replicate');
blue=old_blue_filt;
%
r1=mess(i).Name(1:numel(mess(i).Name)-4)
%
% %blue=Movi(:, :, 3);
% %blue=bpass(blue,0,25);
ccc=find(blue<mean2(blue)); blue(ccc)=0;
    blue=imerode(blue,strel('disk',5));
    blue=imdilate(blue,strel('disk',5));
    ccc=find(blue==0); old_blue_filt(ccc)=0;
    aa=watershed(max(max(old_blue_filt))-old_blue_filt,8);

ccc=find(aa==0);
c_redimg=old_blue_filt;
c_redimg(ccc)=0;
    ccc=find(c_redimg>0); c_redimg(ccc)=1;
    c_redimg=imerode(c_redimg,strel('disk',4));

```

```
c_redimg=imdilate(c_redimg,strel('disk',4));

bwblue=bwlabel(c_redimg);

subplot(2,2,1); imagesc(Movi(:, :,1)); axis equal;
subplot(2,2,2); imagesc(bwblue); axis equal;
subplot(2,2,3); imagesc(Movi(:, :,2)); axis equal;
subplot(2,2,4); imagesc(old_blue_filt); axis equal;
drawnow;
green_filt=green_filt-imopen(green_filt,strel('disk',15));
ccc=find(green_filt<0); green_filt(ccc)=0;
red_filt=red_filt-imopen(red_filt,strel('disk',15));
ccc=find(red_filt<0); red_filt(ccc)=0;

for j=1:max(max(bwblue))
    ccc=find(bwblue==j);

    if numel(ccc)>100

        valx(1)=(mean(red_filt(ccc))-
mean2(red_filt));%*numel(ccc);
        valx(2)=(mean(green_filt(ccc))-
mean2(green_filt));%*numel(ccc);

siz=size(values);
values(siz(1)+1,1:2)=valx;

    end;

end;

dlmwrite(strcat(r1,'_vals_average.txt'),values);
end;
end;
```



```
[stat, mess]=fileattrib('*_vals_average.txt');
aa=dlmread(mess(1).Name);
for i=2:numel(mess)
    b=dlmread(mess(i).Name);
    try
        aa=cat(1,aa,b);
    catch
    end
end;

dlmwrite('all_values_average.txt',aa);

txred=aa(:,1); txgreen=aa(:,2);
ccc=find(txgreen>the_limit & txred<700);
ccc2=find(txred<700);
matrix(numel(names)+1,1)=numel(ccc2);
matrix(numel(names)+1,2)=numel(ccc);
matrix(numel(names)+1,3)=numel(ccc)*100/numel(ccc2);

names{numel(names)+1}=char(cellb{abcdef});

end;end;

cd ..
xlswrite(strcat('Results_more_than_',num2str(the_limit),'.xlsx'),names
,'Tabelle1');
xlswrite(strcat('Results_more_than_',num2str(the_limit),'.xlsx'),matri
x,'Tabelle2');
```

7 Literaturverzeichnis

- Aarsland D, Andersen K, Larsen JP, Lolk A (2003): Prevalence and Characteristics of Dementia in Parkinson Disease. *Arch Neurol* 60, 387
- Aboutit S, Bousset L, Loria F, Zhu S, Chaumont F de, Pieri L, Olivo-Marin J-C, Melki R, Zurzolo C (2016): Tunneling nanotubes spread fibrillar alpha-synuclein by intercellular trafficking of lysosomes. *EMBO J* 35, 2120–2138
- Ahn KJ, Paik SR, Chung KC, Kim J (2006): Amino acid sequence motifs and mechanistic features of the membrane translocation of alpha-synuclein. *J Neurochem* 97, 265–279
- Akhtar RS, Licata JP, Luk KC, Shaw LM, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2018): Measurements of auto-antibodies to α -synuclein in the serum and cerebral spinal fluids of patients with Parkinson's disease. *J Neurochem* 145, 489–503
- Alderson TR, Markley JL (2013): Biophysical characterization of α -synuclein and its controversial structure. *Intrinsically Disord Proteins* 1, 18–39
- Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJA, Cooper JM (2011): Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis* 42, 360–367
- Alzheimer's Association (2016): 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 12, 459–509
- Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, Laatsch R de, Banducci K, Caccavello RJ, Barbour R, Huang J, Kling K, Lee M *et al.* (2006): Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281, 29739–29752
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li J-Y, Brundin P (2010): Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 9, 1128–1138
- Angot E, Steiner JA, Lema Tomé CM, Ekström P, Mattsson B, Björklund A, Brundin P (2012): Alpha-synuclein cell-to-cell transfer and seeding in grafted dopaminergic neurons in vivo. *PLoS One* 7, e39465
- Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J *et al.* (2013): Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28, 811–813
- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S (1997): Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414, 521–526

- Bae E-J, Yang NY, Lee C, Lee H-J, Kim S, Sardi SP, Lee S-J (2015): Loss of glucocerebrosidase 1 activity causes lysosomal dysfunction and α -synuclein aggregation. *Exp Mol Med* 47, e153
- Barbeau A (1962): The Pathogenesis of Parkinson's Disease: A New Hypothesis. *Can Med Assoc J* 87, 802–807
- Bartels T, Ahlstrom LS, Leftin A, Kamp F, Haass C, Brown MF, Beyer K (2010): The N-terminus of the intrinsically disordered protein α -synuclein triggers membrane binding and helix folding. *Biophys J* 99, 2116–2124
- Bartels T, Choi JG, Selkoe DJ (2011): α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation. *Nature* 477, 107–110
- Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschuler Y, Selkoe DJ, Sharon R (2009): Alpha-synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. *Traffic* 10, 218–234
- Betarbet R, Sherer TB, MacKenzie G, Garcia-Osuna M, Panov AV, Greenamyre JT (2000): Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 3, 1301
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961): The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr* 73, 787–788
- Bliederhaeuser C, Grozdanov V, Speidel A, Zondler L, Ruf WP, Bayer H, Kiechle M, Feiler MS, Freischmidt A, Brenner D *et al.* (2016): Age-dependent defects of alpha-synuclein oligomer uptake in microglia and monocytes. *Acta Neuropathol* 131, 379–391
- Bonini NM, Giasson BI (2005): Snaring the function of alpha-synuclein. *Cell* 123, 359–361
- Braak H, Tredici KD, Rüb U, Vos RAI de, Jansen Steur ENH, Braak E (2003): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197–211
- Burré J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC (2010): Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329, 1663–1667
- Burré J, Sharma M, Südhof TC (2012): Systematic mutagenesis of α -synuclein reveals distinct sequence requirements for physiological and pathological activities. *J Neurosci* 32, 15227–15242
- Burré J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Südhof TC (2013): Properties of native brain α -synuclein. *Nature* 498, E4-6; discussion E6-7
- Butler DC, Joshi SN, Genst E de, Baghel AS, Dobson CM, Messer A (2016): Bifunctional Anti-Non-Amyloid Component α -Synuclein Nanobodies Are Protective In Situ. *PLoS One* 11, e0165964

- Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R *et al.* (2002): Synaptic Vesicle Depletion Correlates with Attenuated Synaptic Responses to Prolonged Repetitive Stimulation in Mice Lacking α -Synuclein. *J Neurosci* 22, 8797–8807
- Cali T, Ottolini D, Brini M (2013): Calcium and endoplasmic reticulum-mitochondria tethering in neurodegeneration. *DNA Cell Biol* 32, 140–146
- Caussinus E, Kanca O, Affolter M (2011): Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody. *Nat Struct Mol Biol* 19, 117–121
- Chandra S, Gallardo G, Fernández-Chacón R, Schlüter OM, Südhof TC (2005): Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. *Cell* 123, 383–396
- Chartier-Harlin M-C, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M *et al.* (2004): α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1167–1169
- Chatterjee D, Bhatt M, Butler D, Genst E de, Dobson CM, Messer A, Kordower JH (2018): Proteasome-targeted nanobodies alleviate pathology and functional decline in an α -synuclein-based Parkinson's disease model. *NPJ Parkinsons Dis* 4, 25
- Colla E, Jensen PH, Pletnikova O, Troncoso JC, Glabe C, Lee MK (2012): Accumulation of toxic α -synuclein oligomer within endoplasmic reticulum occurs in α -synucleinopathy in vivo. *J Neurosci* 32, 3301–3305
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT (2000): Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both alpha-synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease. Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 571–576
- Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT (2001): Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294, 1346–1349
- Cotzias GC, van Woert MH, Schiffer LM (1967): Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276, 374–379
- Courte J, Bousset L, Boxberg YV, Villard C, Melki R, Peyrin J-M (2020): The expression level of alpha-synuclein in different neuronal populations is the primary determinant of its prion-like seeding. *Sci Rep* 10, 4895
- Cremades N, Cohen SIA, Deas E, Abramov AY, Chen AY, Orte A, Sandal M, Clarke RW, Dunne P, Aprile FA *et al.* (2012): Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of α -synuclein. *Cell* 149, 1048–1059
- Daniels SB, Peterson KR, Strausbaugh LD, Kidwell MG, Chovnick A (1990): Evidence for Horizontal Transmission of the P Transposable Element between *Drosophila* Species. *Genetics* 124, 339–355

- Danzer KM, Haasen D, Karow AR, Moussaud S, Habeck M, Giese A, Kretschmar H, Hengerer B, Kostka M (2007): Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding. *J Neurosci* 27, 9220–9232
- Danzer KM, Krebs SK, Wolff M, Birk G, Hengerer B (2009): Seeding induced by alpha-synuclein oligomers provides evidence for spreading of alpha-synuclein pathology. *J Neurochem* 111, 192–203
- Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, Cagsal-Getkin O, Winslow AR, Zhu L, Vanderburg CR, McLean PJ (2012): Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 7, 42
- Darios F, Ruipérez V, López I, Villanueva J, Gutierrez LM, Davletov B (2010): Alpha-synuclein sequesters arachidonic acid to modulate SNARE-mediated exocytosis. *EMBO Rep* 11, 528–533
- de Rijk MC, Tzourio C, Breteler MM, Dartigues JF, Amaducci L, Lopez-Pousa S, Manubens-Bertran JM, Alperovitch A, Rocca WA (1997): Prevalence of parkinsonism and Parkinson's disease in Europe: the EUROPARKINSON Collaborative Study. European Community Concerted Action on the Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 10–15
- Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H (2010): Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 119, 703–713
- Delenclos M, Trendafilova T, Mahesh D, Baine AM, Moussaud S, Yan IK, Patel T, McLean PJ (2017): Investigation of Endocytic Pathways for the Internalization of Exosome-Associated Oligomeric Alpha-Synuclein. *Front Neurosci* 11, 172
- Desplats P, Lee H-J, Bae E-J, Patrick C, Rockenstein E, Crews L, Spencer B, Masliah E, Lee S-J (2009): Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13010–13015
- Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008): Mitochondrial Import and Accumulation of α -Synuclein Impair Complex I in Human Dopaminergic Neuronal Cultures and Parkinson Disease Brains. *J Biol Chem* 283, 9089–9100
- DeWitt DC, Rhoades E (2013): α -Synuclein can inhibit SNARE-mediated vesicle fusion through direct interactions with lipid bilayers. *Biochemistry* 52, 2385–2387
- DGN (2016): Idiopathisches Parkinson-Syndrom. S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. <https://www.dgn.org/leitlinien/3219-030-010-idiopathisches-parkinson-syndrom>; abgerufen am 01.06.2020
- Diao J, Burré J, Vivona S, Cipriano DJ, Sharma M, Kyoung M, Südhof TC, Brunger AT (2013): Native α -synuclein induces clustering of synaptic-vesicle mimics via binding to phospholipids and synaptobrevin-2/VAMP2. *Elife* 2, e00592

- Dieriks BV, Park TI-H, Fourie C, Faull RLM, Dragunow M, Curtis MA (2017): α -synuclein transfer through tunneling nanotubes occurs in SH-SY5Y cells and primary brain pericytes from Parkinson's disease patients. *Sci Rep* 7, 42984
- Ding TT, Lee S-J, Rochet J-C, Lansbury PT (2002): Annular α -Synuclein Protofibrils Are Produced When Spherical Protofibrils Are Incubated in Solution or Bound to Brain-Derived Membranes. *Biochemistry* 41, 10209–10217
- Ding Z, Fu Z, Xu C, Wang Y, Wang Y, Li J, Kong L, Chen J, Li N, Zhang R *et al.* (2017): High-resolution cryo-EM structure of the proteasome in complex with ADP-AIFx. *Cell Res* 27, 373–385
- Dorsey ER, Constantinescu R, Thompson JP, Biglan KM, Holloway RG, Kieburtz K, Marshall FJ, Ravina BM, Schifitto G, Siderowf A *et al.* (2007): Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology* 68, 384–386
- Dumoulin M, Last AM, Desmyter A, Decanniere K, Canet D, Larsson G, Spencer A, Archer DB, Sasse J, Muyldermans S *et al.* (2003): A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme. *Nature* 424, 783–788
- Dunning Hotopp JC (2011): Horizontal gene transfer between bacteria and animals. *Trends Genet* 27, 157–163
- Edwards TL, Scott WK, Almonte C, Burt A, Powell EH, Beecham GW, Wang L, Züchner S, Konidari I, Wang G *et al.* (2010): Genome-wide association study confirms SNPs in SNCA and the MAPT region as common risk factors for Parkinson disease. *Ann Hum Genet* 74, 97–109
- El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DMA, Ikeda S-i *et al.* (2003): Alpha-synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17, 1945–1947
- Elsasser S, Chandler-Militello D, Müller B, Hanna J, Finley D (2004): Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279, 26817–26822
- El-Turk F, Newby FN, Genst E de, Guilliams T, Sprules T, Mittermaier A, Dobson CM, Vendruscolo M (2016): Structural Effects of Two Camelid Nanobodies Directed to Distinct C-Terminal Epitopes on α -Synuclein. *Biochemistry* 55, 3116–3122
- Emmanouilidou E, Melachroinou K, Roumeliotis T, Garbis SD, Ntzouni M, Margaritis LH, Stefanis L, Vekrellis K (2010): Cell-produced alpha-synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival. *J Neurosci* 30, 6838–6851
- Engels WR (1997): Invasions of P Elements. *Genetics* 145, 11

- Fahn S, Elton RL, UPDRS Development Committee: The Unified Parkinson's Disease Rating Scale. In: Fahn S, Marsden CD, Calne DB, Goldstein M (Hrsg.): *Recent Developments in Parkinson's Disease*. Macmillan Healthcare Information, Florham Park, NJ 1987, 153–163, 293–304
- Fauré J, Lachenal G, Court M, Hirrlinger J, Chatellard-Causse C, Blot B, Grange J, Schoehn G, Goldberg Y, Boyer V *et al.* (2006): Exosomes are released by cultured cortical neurones. *Mol Cell Neurosci* 31, 642–648
- Fauvet B, Mbefo MK, Fares M-B, Desobry C, Michael S, Ardah MT, Tsika E, Coune P, Prudent M, Lion N *et al.* (2012): α -Synuclein in central nervous system and from erythrocytes, mammalian cells, and *Escherichia coli* exists predominantly as disordered monomer. *J Biol Chem* 287, 15345–15364
- Fernández CO, Hoyer W, Zweckstetter M, Jares-Erijman EA, Subramaniam V, Griesinger C, Jovin TM (2004): NMR of alpha-synuclein-polyamine complexes elucidates the mechanism and kinetics of induced aggregation. *EMBO J* 23, 2039–2046
- Flavin WP, Bousset L, Green ZC, Chu Y, Skarpathiotis S, Chaney MJ, Kordower JH, Melki R, Campbell EM (2017): Endocytic vesicle rupture is a conserved mechanism of cellular invasion by amyloid proteins. *Acta Neuropathol* 134, 629–653
- Freeman D, Cedillos R, Choyke S, Lukic Z, McGuire K, Marvin S, Burrage AM, Sudholt S, Rana A, O'Connor C *et al.* (2013): Alpha-synuclein induces lysosomal rupture and cathepsin dependent reactive oxygen species following endocytosis. *PLoS One* 8, e62143
- Gao L, Tang H, Nie K, Wang L, Zhao J, Gan R, Huang J, Zhu R, Feng S, Duan Z *et al.* (2015): Cerebrospinal fluid alpha-synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis. A systematic review and meta-analysis. *Int J Neurosci* 125, 645–654
- Gerdes H-H, Bukoreshtliev NV, Barroso JFV (2007): Tunneling nanotubes. A new route for the exchange of components between animal cells. *FEBS Lett* 581, 2194–2201
- Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001): A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276, 2380–2386
- Gibb WR (1988): Accuracy in the clinical diagnosis of parkinsonian syndromes. *Postgrad Med J* 64, 345–351
- Gibb WR, Lees AJ (1988): The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 745–752
- Giráldez-Pérez RM, Antolín-Vallespín M, Muñoz MD, Sánchez-Capelo A (2014): Models of α -synuclein aggregation in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 2, 176
- Goedert M (2015): Neurodegeneration. Alzheimer's and Parkinson's diseases. The prion concept in relation to assembled A β , tau, and α -synuclein. *Science* 349, 1255555

- Goetz CG, Kompoliti K, Beal MF, Lang AE, Ludolph AC: Parkinson's disease. In: Beal MF, Lang AE, Ludolph AC (Hrsg.): *Neurodegenerative Diseases*. Cambridge University Press, Cambridge 2005, 561–574
- Goetz CG (2011): The history of Parkinson's disease: early clinical descriptions and neurological therapies. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1, a008862
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36, 59–74
- Graham LA, Loughheed SC, Ewart KV, Davies PL (2008): Lateral transfer of a lectin-like antifreeze protein gene in fishes. *PLoS One* 3, e2616
- Grey M, Dunning CJ, Gaspar R, Grey C, Brundin P, Sparr E, Linse S (2015): Acceleration of alpha-synuclein aggregation by exosomes. *J Biol Chem* 290, 2969–2982
- Grozdanov V, Danzer KM (2018): Release and uptake of pathologic alpha-synuclein. *Cell Tissue Res* 373, 175–182
- Guilliams T, El-Turk F, Buell AK, O'Day EM, Aprile FA, Esbjorner EK, Vendruscolo M, Cremades N, Pardon E, Wyns L *et al.* (2013): Nanobodies raised against monomeric alpha-synuclein distinguish between fibrils at different maturation stages. *J Mol Biol* 425, 2397–2411
- Guo JL, Lee VMY (2014): Cell-to-cell transmission of pathogenic proteins in neurodegenerative diseases. *Nat Med* 20, 130–138
- Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L *et al.* (2011): Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 21, 718–779
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993): Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363, 446–448
- Hansen C, Angot E, Bergström A-L, Steiner JA, Pieri L, Paul G, Outeiro TF, Melki R, Kallunki P, Fog K *et al.* (2011): α -Synuclein propagates from mouse brain to grafted dopaminergic neurons and seeds aggregation in cultured human cells. *J Clin Invest* 121, 715–725
- Hansson O, Hall S, Ohrfelt A, Zetterberg H, Blennow K, Minthon L, Nägga K, Londos E, Varghese S, Majbour NK *et al.* (2014): Levels of cerebrospinal fluid α -synuclein oligomers are increased in Parkinson's disease with dementia and dementia with Lewy bodies compared to Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 6, 25
- Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, Pauw P de, Vincke C, Muyldermans S (2013): Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* 8, 1013–1026
- Hawkes C (2003): Olfaction in neurodegenerative disorder. *Movement disorders* 18, 364–372

- Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007): Parkinson's disease. A dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33, 599–614
- Hecht MM, Nitz N, Araujo PF, Sousa AO, Rosa AdC, Gomes DA, Leonardecz E, Teixeira ARL (2010): Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS One* 5, e9181
- Hely MA, Reid WGJ, Adena MA, Halliday GM, Morris JGL (2008): The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: the inevitability of dementia at 20 years. *Mov Disord.* 23, 837–844
- Hernández-Vargas R, Fonseca-Ornelas L, López-González I, Riesgo-Escovar J, Zurita M, Reynaud E (2011): Synphilin suppresses α -synuclein neurotoxicity in a Parkinson's disease *Drosophila* model. *Genesis* 49, 392–402
- Hodara R, Norris EH, Giasson BI, Mishizen-Eberz AJ, Lynch DR, Lee VM-Y, Ischiropoulos H (2004): Functional consequences of alpha-synuclein tyrosine nitration. Diminished binding to lipid vesicles and increased fibril formation. *J Biol Chem* 279, 47746–47753
- Hoehn MM, Yahr MD (1967): Parkinsonism. Onset, progression, and mortality. *Neurology* 17, 427
- Hong Z, Shi M, Chung KA, Quinn JF, Peskind ER, Galasko D, Jankovic J, Zabetian CP, Leverenz JB, Baird G *et al.* (2010): DJ-1 and alpha-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. *Brain* 133, 713–726
- Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ (2001): Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 57, 1497–1499
- Ibáñez P, Bonnet A-M, Débarges B, Lohmann E, Tison F, Agid Y, Dürr A, Brice A, Pollak P (2004): Causal relation between α -synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364, 1169–1171
- Iljina M, Hong L, Horrocks MH, Ludtmann MH, Choi ML, Hughes CD, Ruggeri FS, Williams T, Buell AK, Lee J-E *et al.* (2017): Nanobodies raised against monomeric α -synuclein inhibit fibril formation and destabilize toxic oligomeric species. *BMC Biol* 15, 57
- Irwin DJ, Abrams JY, Schonberger LB, Leschek EW, Mills JL, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2013): Evaluation of potential infectivity of Alzheimer and Parkinson disease proteins in recipients of cadaver-derived human growth hormone. *JAMA Neurol* 70, 462–468
- Ishihara LS, Cheesbrough A, Brayne C, Schrag A (2007): Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78, 1304–1309
- Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, Silva HA de, Kittel A, Saitoh T (1995): The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14, 467–475

- Jang A, Lee H-J, Suk J-E, Jung J-W, Kim K-P, Lee S-J (2010): Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. *J Neurochem* 113, 1263–1274
- Jankovic J (2000): The Evolution of Diagnosis in Early Parkinson Disease. *Arch Neurol* 57, 369
- Jellinger KA (2009): Formation and development of Lewy pathology. A critical update. *J Neurol* 256, 270–279
- Jucker M, Walker LC (2013): Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501, 45–51
- Kang J-H, Irwin DJ, Chen-Plotkin AS, Siderowf A, Caspell C, Coffey CS, Waligórska T, Taylor P, Pan S, Frasier M *et al.* (2013): Association of cerebrospinal fluid β -amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and α -synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease. *JAMA Neurol* 70, 1277–1287
- Keren-Kaplan T, Zeev Peters L, Levin-Kravets O, Attali I, Kleifeld O, Shohat N, Artzi S, Zucker O, Pilzer I, Reis N *et al.* (2016): Structure of ubiquitylated-Rpn10 provides insight into its autoregulation mechanism. *Nat Commun* 7, 12960
- Kirchhofer A, Helma J, Schmidthals K, Frauer C, Cui S, Karcher A, Pellis M, Muyldermans S, Casas-Delucchi CS, Cardoso MC *et al.* (2010): Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat Struct Mol Biol* 17, 133–138
- Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S (Hrsg.): *Physiologie*. 7. Auflage; Thieme, Stuttgart 2014
- Klucken J, Poehler A-M, Ebrahimi-Fakhari D, Schneider J, Nuber S, Rockenstein E, Schlötzer-Schrehardt U, Hyman BT, McLean PJ, Masliah E *et al.* (2012): Alpha-synuclein aggregation involves a bafilomycin A 1-sensitive autophagy pathway. *Autophagy* 8, 754–766
- Krüger R, Kuhn W, Müller T, Voitalla D, Graeber M, Kösel S, Przuntek H, Epplen JT, Schöls L, Riess O (1998): Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18, 106–108
- Lautenschläger J, Stephens AD, Fusco G, Ströhl F, Curry N, Zacharopoulou M, Michel CH, Laine R, Nespovitaya N, Fantham M *et al.* (2018): C-terminal calcium binding of α -synuclein modulates synaptic vesicle interaction. *Nat Commun* 9, 712
- Lazaro DF, Rodrigues EF, Langohr R, Shahpasandzadeh H, Ribeiro T, Guerreiro P, Gerhardt E, Krohnert K, Klucken J, Pereira MD *et al.* (2014): Systematic comparison of the effects of alpha-synuclein mutations on its oligomerization and aggregation. *PLoS Genet* 10, e1004741

- Lee H-J, Khoshaghideh F, Patel S, Lee S-J (2004): Clearance of α -Synuclein Oligomeric Intermediates via the Lysosomal Degradation Pathway. *J Neurosci* 24, 1888–1896
- Lee H-J, Patel S, Lee S-J (2005): Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates. *J Neurosci* 25, 6016–6024
- Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee J-H, Paik SR, Lee S-J (2008a): Assembly-dependent endocytosis and clearance of extracellular alpha-synuclein. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1835–1849
- Lee H-J, Suk J-E, Bae E-J, Lee S-J (2008b): Clearance and deposition of extracellular alpha-synuclein aggregates in microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 423–428
- Lee H-J, Baek SM, Ho D-H, Suk J-E, Cho E-D, Lee S-J (2011): Dopamine promotes formation and secretion of non-fibrillar alpha-synuclein oligomers. *Exp Mol Med* 43, 216–222
- Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom: siehe DGN 2016
- Leplow B: Parkinson. Fortschritte der Psychotherapie Bd. 29. Hogrefe, Göttingen 2007
- Lesage S, Brice A (2009): Parkinson's disease. From monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 18, R48-59
- Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honoré A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Dürr A, Melki R *et al.* (2013): G51D α -synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol* 73, 459–471
- Lewy FH: Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In: Lewandowsky M, Abelsdorff G (Hrsg.): *Handbuch der Neurologie*. Springer-Verlag, Berlin 1912, 920–933
- Li J-Y, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehn-crona S, Björklund A *et al.* (2008): Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14, 501–503
- Lingor P, Liman J, Kallenberg K, Sahlmann C-O, Bähr M: Diagnosis and Differential Diagnosis of Parkinson's Disease. In: Qutubuddin A (Hrsg.): *How to Stay Active with Parkinson's Disease*. INTECH Open Access Publisher 2011
- Lingor P, Carboni E, Koch JC (2016): Alpha-synuclein and iron. Two keys unlocking Parkinson's disease. *J Neural Transm* 124, 973–981
- Liu C-W, Corboy MJ, DeMartino GN, Thomas PJ (2003): Endoproteolytic activity of the proteasome. *Science* 299, 408–411
- Li W, Englund E, Widner H, Mattsson B, van Westen D, Lätt J, Rehn-crona S, Brundin P, Björklund A, Lindvall O *et al.* (2016): Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, 6544–6549
- Llorens F, Schmitz M, Varges D, Kruse N, Gotzmann N, Gmitterová K, Mollenhauer B, Zerr I (2016): Cerebrospinal α -synuclein in α -synuclein aggregation disorders. *Tau/ α -*

- synuclein ratio as potential biomarker for dementia with Lewy bodies. *J Neurol* 263, 2271–2277
- Luk KC, Song C, O'Brien P, Stieber A, Branch JR, Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2009): Exogenous alpha-synuclein fibrils seed the formation of Lewy body-like intracellular inclusions in cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20051–20056
- Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2012): Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338, 949–953
- Maass F, Schulz I, Lingor P, Mollenhauer B, Bähr M (2019): Cerebrospinal fluid biomarker for Parkinson's disease. An overview. *Mol Cell Neurosci* 97, 60–66
- Mao X, Ou MT, Karuppagounder SS, Kam T-I, Yin X, Xiong Y, Ge P, Umanah GE, Brahmachari S, Shin J-H *et al.* (2016): Pathological α -synuclein transmission initiated by binding lymphocyte-activation gene 3. *Science* 353, aah3374
- Marras C, McDermott MP, Rochon PA, Tanner CM, Naglie G, Rudolph A, Lang AE, Group tPS (2005): Survival in Parkinson disease. Thirteen-year follow-up of the DATA-TOP cohort. *Neurology* 64, 87–93
- Marzo L, Gousset K, Zurzolo C (2012): Multifaceted roles of tunneling nanotubes in intercellular communication. *Front Physiol* 3, 72
- Masuda-Suzukake M, Nonaka T, Hosokawa M, Kubo M, Shimosawa A, Akiyama H, Hasegawa M (2014): Pathological alpha-synuclein propagates through neural networks. *Acta Neuropathol Commun* 2, 88
- Mazzulli JR, Mishizen AJ, Giasson BI, Lynch DR, Thomas SA, Nakashima A, Nagatsu T, Ota A, Ischiropoulos H (2006): Cytosolic catechols inhibit alpha-synuclein aggregation and facilitate the formation of intracellular soluble oligomeric intermediates. *J Neurosci* 26, 10068–10078
- McKeith I, Mintzer J, Aarsland D, Burn D, Chiu H, Cohen-Mansfield J, Dickson D, Dubois B, Duda JE, Feldman H *et al.* (2004): Dementia with Lewy bodies. *Lancet Neurol* 3, 19–28
- Moisan F, Kab S, Mohamed F, Canonico M, Le Guern M, Quintin C, Carcaillon L, Nicolau J, Duport N, Singh-Manoux A *et al.* (2016): Parkinson disease male-to-female ratios increase with age. French nationwide study and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 952–957
- Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG (2011): α -Synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism. A cohort study. *Lancet Neurol* 10, 230–240

- Moran NA, Jarvik T (2010): Lateral transfer of genes from fungi underlies carotenoid production in aphids. *Science* 328, 624–627
- Mosharov EV, Staal RGW, Bové J, Prou D, Hananiya A, Markov D, Poulsen N, Larsen KE, Moore CMH, Troyer MD *et al.* (2006): Alpha-synuclein overexpression increases cytosolic catecholamine concentration. *J Neurosci* 26, 9304–9311
- Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF (2014): Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3
- Murray IVJ, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2003): Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42, 8530–8540
- Muyldermans S (2013): Nanobodies. Natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem* 82, 775–797
- Nemani VM, Lu W, Berge V, Nakamura K, Onoa B, Lee MK, Chaudhry FA, Nicoll RA, Edwards RH (2010): Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 65, 66–79
- Ngolab J, Trinh I, Rockenstein E, Mante M, Florio J, Trejo M, Masliah D, Adame A, Masliah E, Rissman RA (2017): Brain-derived exosomes from dementia with Lewy bodies propagate α -synuclein pathology. *Acta Neuropathol Commun* 5, 46
- Nonaka T, Watanabe ST, Iwatsubo T, Hasegawa M (2010): Seeded aggregation and toxicity of {alpha}-synuclein and tau. Cellular models of neurodegenerative diseases. *J Biol Chem* 285, 34885–34898
- Noyce AJ, Bestwick JP, Silveira-Moriyama L, Hawkes CH, Giovannoni G, Lees AJ, Schrag A (2012): Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol* 72, 893–901
- Nystrom H, Nordstrom A, Nordstrom P (2016): Risk of Injurious Fall and Hip Fracture up to 26 y before the Diagnosis of Parkinson Disease: Nested Case-Control Studies in a Nationwide Cohort. *PLoS Med* 13, e1001954
- Ogawa K, Yamada T, Tsujioka Y, Taguchi J, Takahashi M, Tsuboi Y, Fujino Y, Nakajima M, Yamamoto T, Akatsu H *et al.* (2000): Localization of a novel type trypsin-like serine protease, neurosin, in brain tissues of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 54, 419–426
- Pan-Montojo F, Anichtchik O, Dening Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H *et al.* (2010): Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5, e8762
- Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan GA, Pal A, Said J, Marsico G, Verbavatz J-M, Rodrigo-Angulo M *et al.* (2012): Environmental toxins trigger PD-like

- progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci Rep* 2, 898
- Parkinson J: *An Essay on the Shaking Palsy*. Sherwood, Nealy and Jones, London 1817
- Parnetti L, Gaetani L, Eusebi P, Paciotti S, Hansson O, El-Agnaf O, Mollenhauer B, Blennow K, Calabresi P (2019): CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 18, 573–586
- Pasanen P, Myllykangas L, Siitonen M, Raunio A, Kaakkola S, Lyytinen J, Tienari PJ, Pöyhönen M, Paetau A (2014): Novel α -synuclein mutation A53E associated with atypical multiple system atrophy and Parkinson's disease-type pathology. *Neurobiol Aging* 35, 2180.e1-5
- Paumier KL, Luk KC, Manfredsson FP, Kanaan NM, Lipton JW, Collier TJ, Steece-Collier K, Kemp CJ, Celano S, Schulz E *et al.* (2015): Intrastratial injection of pre-formed mouse α -synuclein fibrils into rats triggers α -synuclein pathology and bilateral nigrostriatal degeneration. *Neurobiol Dis* 82, 185–199
- Peelaerts W, Bousset L, van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, van den Haute C, Melki R, Baekelandt V (2015): α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522, 340–344
- Pieri L, Madiona K, Melki R (2016): Structural and functional properties of prefibrillar α -synuclein oligomers. *Sci Rep* 6, 24526
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R *et al.* (1997): Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276, 2045–2047
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE *et al.* (2015): MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30, 1591–1601
- Pranke IM, Morello V, Bigay J, Gibson K, Verbavatz J-M, Antony B, Jackson CL (2011): α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. *J Cell Biol* 194, 89–103
- Rajput AH, Rozdilsky B, Rajput A (1991): Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. *Can J Neurol Sci* 18, 275–278
- Reyes JF, Olsson TT, Lamberts JT, Devine MJ, Kunath T, Brundin P (2015): A cell culture model for monitoring alpha-synuclein cell-to-cell transfer. *Neurobiol Dis* 77, 266–275
- Rissiek B, Koch-Nolte F, Magnus T (2014): Nanobodies as modulators of inflammation. Potential applications for acute brain injury. *Front Cell Neurosci* 8, 344
- Ritz B, Lee P-C, Lassen CF, Arah OA (2014): Parkinson disease and smoking revisited. Ease of quitting is an early sign of the disease. *Neurology* 83, 1396–1402

- Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, Martino D, Fontana A, Logroscino G (2016): Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* 86, 566–576
- Rizzo G, Arcuti S, Copetti M, Alessandria M, Savica R, Fontana A, Liguori R, Logroscino G (2018): Accuracy of clinical diagnosis of dementia with Lewy bodies. A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 89, 358–366
- Rodriguez JA, Ivanova MI, Sawaya MR, Cascio D, Reyes FE, Shi D, Sangwan S, Guenther EL, Johnson LM, Zhang M *et al.* (2015): Structure of the toxic core of α -synuclein from invisible crystals. *Nature* 525, 486–490
- Rothbauer U, Zolghadr K, Tillib S, Nowak D, Schermelleh L, Gahl A, Backmann N, Conrath K, Muyldermans S, Cardoso MC *et al.* (2006): Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3, 887–889
- Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes H-H (2004): Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303, 1007–1010
- Sastry N, Zheng W, Liu G, Wang H, Chen X, Cai M, Contractor P, Sgobio C, Sun L, Xie C *et al.* (2015): No apparent transmission of transgenic α -synuclein into nigrostriatal dopaminergic neurons in multiple mouse models. *Transl Neurodegener* 4, 23
- Satake W, Nakabayashi Y, Mizuta I, Hirota Y, Ito C, Kubo M, Kawaguchi T, Tsunoda T, Watanabe M, Takeda A *et al.* (2009): Genome-wide association study identifies common variants at four loci as genetic risk factors for Parkinson's disease. *Nat Genet* 41, 1303–1307
- Schagger H, Jagow G von (1987): Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368–379
- Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guido T, Hu K, Huang J, Johnson-Wood K, Khan K *et al.* (1999): Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* 400, 173–177
- Schiavini DG, Puel JM, Averous SA, Bazex JA (1989): Quantitative western immunoblotting analysis in survey of human immunodeficiency virus-seropositive patients. *J Clin Microbiol* 27, 2062
- Schreiber A, Peter M (2014): Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1843, 163–181
- Scott D, Roy S (2012): α -Synuclein inhibits intersynaptic vesicle mobility and maintains recycling-pool homeostasis. *J Neurosci* 32, 10129–10135

- Serpell LC, Berriman J, Jakes R, Goedert M, Crowther RA (2000): Fiber diffraction of synthetic α -synuclein filaments shows amyloid-like cross- β conformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4897–4902
- Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, Mendez N, Ishii R, Trenkwalder C, Mollenhauer B, Soto C (2017): Development of a Biochemical Diagnosis of Parkinson Disease by Detection of α -Synuclein Misfolded Aggregates in Cerebrospinal Fluid. *JAMA Neurol* 74, 163–172
- Sharma M, Burré J, Bronk P, Zhang Y, Xu W, Südhof TC (2012): CSP α knockout causes neurodegeneration by impairing SNAP-25 function. *EMBO J* 31, 829–841
- Sharon R, Bar-Joseph I, Frosch MP, Walsh DM, Hamilton JA, Selkoe DJ (2003): The Formation of Highly Soluble Oligomers of α -Synuclein Is Regulated by Fatty Acids and Enhanced in Parkinson's Disease. *Neuron* 37, 583–595
- Shi M, Liu C, Cook TJ, Bullock KM, Zhao Y, Gingham C, Li Y, Aro P, Dator R, He C *et al.* (2014): Plasma exosomal α -synuclein is likely CNS-derived and increased in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 128, 639–650
- Shin YJ, Park SK, Jung YJ, Kim YN, Kim KS, Park OK, Kwon S-H, Jeon SH, Le Trinh A, Fraser SE *et al.* (2015): Nanobody-targeted E3-ubiquitin ligase complex degrades nuclear proteins. *Sci Rep* 5, 14269
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG *et al.* (2009): Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet* 41, 1308–1312
- Simonsen AH, Kuiperij B, El-Agnaf OMA, Engelborghs S, Herukka S-K, Parnetti L, Rektorova I, Vanmechelen E, Kapaki E, Verbeek M *et al.* (2016): The utility of α -synuclein as biofluid marker in neurodegenerative diseases. A systematic review of the literature. *Biomark Med* 10, 19–34
- Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R *et al.* (2003): alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302, 841
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76–85
- Sørensen SJ, Bailey M, Hansen LH, Kroer N, Wuertz S (2005): Studying plasmid horizontal transfer in situ. A critical review. *Nat Rev Microbiol* 3, 700–710
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM-Y, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997): [alpha]-Synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839–840

- Steinmetz H, Sitzer M (Hrsg.): Lehrbuch Neurologie. 1. Auflage; Urban & Fischer, München 2011
- Stöckl MT, Zijlstra N, Subramaniam V (2013): α -Synuclein oligomers. An amyloid pore? Insights into mechanisms of α -synuclein oligomer-lipid interactions. *Mol Neurobiol* 47, 613–621
- Stuendl A, Kunadt M, Kruse N, Bartels C, Moebius W, Danzer KM, Mollenhauer B, Schneider A (2016): Induction of alpha-synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Brain* 139, 481–494
- Sung JY, Kim J, Paik SR, Park JH, Ahn YS, Chung KC (2001): Induction of neuronal cell death by Rab5A-dependent endocytosis of alpha-synuclein. *J Biol Chem* 276, 27441–27448
- Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT (2015): Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 78, 522–529
- Ta H, Keller J, Haltmeier M, Saka SK, Schmied J, Opazo F, Tinnefeld P, Munk A, Hell SW (2015): Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy. *Nat Commun* 6, 7977
- Taylor SC, Posch A (2014): The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int* 2014, 361590
- Theillet F-X, Binolfi A, Bekei B, Martorana A, Rose HM, Stuver M, Verzini S, Lorenz D, van Rossum M, Goldfarb D *et al.* (2016): Structural disorder of monomeric α -synuclein persists in mammalian cells. *Nature* 530, 45–50
- Tofaris GK, Layfield R, Spillantini MG (2001): α -Synuclein metabolism and aggregation is linked to ubiquitin-independent degradation by the proteasome. *FEBS Lett* 502, 22–26
- Tofaris GK, Razaq A, Ghetti B, Lilley KS, Spillantini MG (2003): Ubiquitination of alpha-synuclein in Lewy bodies is a pathological event not associated with impairment of proteasome function. *J Biol Chem* 278, 44405–44411
- Tofaris GK (2017): A Critical Assessment of Exosomes in the Pathogenesis and Stratification of Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 7, 569–576
- Tokuda T, Salem SA, Allsop D, Mizuno T, Nakagawa M, Qureshi MM, Locascio JJ, Schlossmacher MG, El-Agnaf OMA (2006): Decreased alpha-synuclein in cerebrospinal fluid of aged individuals and subjects with Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 162–166
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989): Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 27, 495–501

- Trostchansky A, Lind S, Hodara R, Oe T, Blair IA, Ischiropoulos H, Rubbo H, Souza JM (2006): Interaction with phospholipids modulates alpha-synuclein nitration and lipid-protein adduct formation. *Biochem J* 393, 343–349
- Ulusoy A, Musgrove RE, Rusconi R, Klinkenberg M, Helwig M, Schneider A, Di Monte DA (2015): Neuron-to-neuron α -synuclein propagation in vivo is independent of neuronal injury. *Acta Neuropathol Commun* 3, 13
- Vaikath NN, Hmila I, Gupta V, Erskine D, Ingelsson M, El-Agnaf OMA (2019): Antibodies against alpha-synuclein. Tools and therapies. *J Neurochem* 150, 612–625
- van Dijk KD, Bidinosti M, Weiss A, Raijmakers P, Berendse HW, van de Berg WDJ (2014): Reduced α -synuclein levels in cerebrospinal fluid in Parkinson's disease are unrelated to clinical and imaging measures of disease severity. *Eur J Neurol* 21, 388–394
- Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Petrova J, Voss JC, Stamou DG, Steven AC *et al.* (2010): Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem* 285, 32486–32493
- Vekrellis K, Xilouri M, Emmanouilidou E, Rideout HJ, Stefanis L (2011): Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. *Lancet Neurol* 10, 1015–1025
- Visanji NP, Brooks PL, Hazrati L-N, Lang AE (2013): The prion hypothesis in Parkinson's disease: Braak to the future. *Acta Neuropathol Commun* 1, 2
- Volpicelli-Daley LA, Luk KC, Patel TP, Tanik SA, Riddle DM, Stieber A, Meaney DF, Trojanowski JQ, Lee VM-Y (2011): Exogenous α -synuclein fibrils induce Lewy body pathology leading to synaptic dysfunction and neuron death. *Neuron* 72, 57–71
- Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F (1988): Parkinson's disease. The presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 76, 217–221
- Wales P, Pinho R, Lazaro DF, Outeiro TF (2013): Limelight on alpha-synuclein: pathological and mechanistic implications in neurodegeneration. *J Parkinsons Dis* 3, 415–459
- Walsh DM, Selkoe DJ (2016): A critical appraisal of the pathogenic protein spread hypothesis of neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 17, 251–260
- Waters VL (2001): Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nat Genet* 29, 375–376
- Weinreb PH, Zhen W, Poon AW, Conway KA, Lansbury PT (1996): NACP, a protein implicated in Alzheimer's disease and learning, is natively unfolded. *Biochemistry* 35, 13709–13715
- Weiss S, Chakraborty T (2001): Transfer of eukaryotic expression plasmids to mammalian host cells by bacterial carriers. *Curr Opin Biotechnol* 12, 467–472

- Westphal CH, Chandra SS (2013): Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J Biol Chem* 288, 1829–1840
- Wilhelm BG, Mandad S, Truckenbrodt S, Kröhnert K, Schäfer C, Rammner B, Koo SJ, Claßen GA, Krauss M, Haucke V *et al.* (2014): Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* 344, 1023–1028
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S *et al.* (2011): In vivo demonstration that alpha-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 4194–4199
- Wood SJ, Wypych J, Steavenson S, Louis J-C, Citron M, Biere AL (1999): α -Synuclein Fibrillogenesis Is Nucleation-dependent. *J Biol Chem* 274, 19509–19512
- Yoshino H, Hirano M, Stoessel AJ, Imamichi Y, Ikeda A, Li Y, Funayama M, Yamada I, Nakamura Y, Sossi V *et al.* (2017): Homozygous alpha-synuclein p.A53V in familial Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 57, 248.e7-248.e12
- Zarranz JJ, Alegre J, Gómez-Esteban JC, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B *et al.* (2004): The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 55, 164–173
- Zheng T, Wu X, Wei X, Wang M, Zhang B (2017): The release and transmission of amyloid precursor protein via exosomes. *Neurochem Int* 114, 18–25
- Zhu M, Li J, Fink AL (2003): The association of alpha-synuclein with membranes affects bilayer structure, stability, and fibril formation. *J Biol Chem* 278, 40186–40197
- Zuris JA, Thompson DB, Shu Y, Guilinger JP, Bessen JL, Hu JH, Maeder ML, Joung JK, Chen Z-Y, Liu DR (2015): Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 33, 73–80

Danksagung

Ich danke meinem Betreuungsausschuss Herrn Prof. Dr. Silvio Rizzoli und Herrn Prof. Dr. Paul Lingor für Anmerkungen und Vorschläge zu den Experimenten.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Silvio Rizzoli für seine schnelle Hilfe und Ansprechbarkeit zu jeder Zeit danken. Er hat mir stets ermöglicht, vielen Ansätzen nachzugehen und die Wissenschaft kennen zu lernen. Ich bin ihm auch zu großem Dank verpflichtet, da er mich zunächst als Hochschullehrer und später als Doktorvater unterrichtet, unterstützt und ermutigt hat.

Ein ebenso großer Dank geht an Dr. Felipe Opazo, der mir das wissenschaftliche Denken nähergebracht hat und mir in zahlreichen Diskussionen neue Sichtweisen gezeigt hat. Man konnte sich immer an ihn wenden. Es hat sehr viel Freude gemacht, mit ihm zusammen zu arbeiten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Dr. Buket Basmanav Ünalın für die Einführung in die Wissenschaft bedanken, ihre Unterstützung bei der Planung von Experimenten und die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an PD Dr. Marcus Niebert, welcher mit mir über Probleme meiner Experimente häufiger diskutierte. Auch möchte ich Sinem Sertel, Dr. Manuel Maidorn und Dr. Kim Ann Saal für das Unterrichten einiger Techniken danken. Zudem danke an Dr. Eugenio Fornasiero für anregende Diskussionen. Des Weiteren möchte ich Christina Schäfer und Gabriele Klähn für ihre technische Assistenz danken.

Dem gesamten Labor verdanke ich eine – wenn auch arbeitsreiche – sehr schöne Zeit mit einem guten Teamgeist.