

Aus dem Institut für Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von Autoantikörpern gegen das neuronale
Protein Synapsin hinsichtlich ihrer Epitopspezifität und
Klassenzugehörigkeit

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sarah Melchert

aus Würzburg

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Im Rahmen dieser Dissertation konnte folgende Publikation erzielt werden:

Mertens, R., Melchert, S., Gitler D., Schou, M. B., Saether, S. G., Vaaler, A., Piepgras J., Kochova, E., Benfenati, F., Ahnert-Hilger, G., Ruprecht, K. & Höltje, M. 2018.
Epitope specificity of anti-synapsin autoantibodies: Differential targeting of synapsin I domains. *PLoS One*, 13, e0208636.

Die in dieser Publikation veröffentlichten Ergebnisse wurden auch für die vorliegende Monographie verwendet.

Inhaltsverzeichnis:

1. Abstract	S. 3
2. Einleitung	S. 5
2.1 <u>Autoantikörperenzephalitiden</u>	S. 5
2.1.1 Beschreibung des Indexpatienten für anti-Synapsin Autoantikörper und Prävalenz der Antikörper	S. 7
2.2 <u>Synapsine</u>	S. 8
2.2.1 Domänenstruktur der Synapsine	S. 10
2.2.2 Bedeutung der Synapsine für synaptische Plastizität	S. 12
2.2.3 Synapsin assoziierte Erkrankungen	S. 14
2.3 <u>Fragestellung</u>	S. 16
3. Material und Methoden	S. 18
3.1 Material	S. 18
3.1.1 Chemikalien	S. 18
3.1.2 Geräte	S. 19
3.1.3 Antikörper	S. 20
3.1.4 Patienten	S. 21
3.1.5 Synapsin-Plasmide und Versuchstiere	S. 22
3.2 Methoden	S. 23
3.2.1 HEK-Zell-Transfektion	S. 23
3.2.2 Transformation	S. 24
3.2.3 Aufbereitung von Mausgehirnen zur weiteren Verwendung im Immunblot	S. 25
3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration	S. 26
3.2.5 Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse	S. 27
3.2.6 Statistik	S. 30
3.2.7 Tierschutzrichtlinien und gute wissenschaftliche Praxis	S. 30
4. Ergebnisse	S. 31
4.1 <u>Antikörper gegen Synapsin-Domänen</u>	S. 31
4.1.1 Patienten und Spezifität der exprimierten Konstrukte	S. 31

4.1.2	Auftreten einer IgG vermittelten Immunreaktivität gegen die A-Domäne von Synapsin Ia	S. 35
4.1.3	Auftreten einer IgG vermittelten Immunität gegen die D-Domäne von Synapsin Ia.....	S. 42
4.1.4	Auftreten einer IgG-vermittelten Immunität gegen mehrere Synapsin Ia Domänen.....	S. 49
4.1.5	Fehlende IgG vermittelte Immunität gegenüber Synapsin Konstrukten in Patienten mit Antikörpern gegen full-length Synapsin.....	S. 50
4.1.6	Nachweis von IgA Antikörpern gegen die D-Domäne und das DE-Fragment von Synapsin Ia im Liquor und Serum des Indexpatienten	S. 51
4.1.7	Gesunde Kontrollen weisen keine Antikörper gegen die verschiedenen Synapsin Ia Konstrukte auf.....	S. 53
4.2	IgG-Subklassen bei Domänen-positiven Patienten.....	S. 56
4.3	IgA Antikörper im Liquor bei Patienten mit beginnenden Demenzen.....	S. 58
5.	Diskussion.....	S. 61
5.1	Eignung der gewählten Methode.....	S. 61
5.2	Domänenspezifität der Antikörper.....	S. 61
5.3	IgG Subklassen.....	S. 63
5.4	Antikörper bei Demenzpatienten.....	S. 64
5.5	Pathogenetische Relevanz.....	S. 64
5.6	Detektion durch das Immunsystem.....	S. 66
5.7	Physiologische Autoimmunität.....	S. 67
5.8	Ausblick.....	S. 68
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	S. 70
7.	Literaturverzeichnis.....	S. 72
8.	Eidesstattliche Versicherung.....	S. 81
9.	Anteilerklärung.....	S. 82
10.	Lebenslauf.....	S. 83
11.	Publikationsliste.....	S. 85
12.	Danksagung.....	S. 86

1. Abstrakt:

In den letzten Jahren sind neben den klassischen paraneoplastischen Syndromen mit neuronaler Präsentation vermehrt die Autoantikörperenzephalitiden in den Fokus der Forschung gerückt. Diese Krankheitsbilder sind nicht unbedingt mit einer neoplastischen Erkrankung vergesellschaftet und durch immunsuppressive Strategien therapierbar. Der Entdeckung der häufigsten Form von Autoantikörperenzephalitis, der anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis, folgen bis heute zahlreiche Entdeckungen weiterer antineuronaler Antikörper. So nahm unsere Arbeitsgruppe nach dem Nachweis von IgA-Antikörpern gegen das neuronale Protein Synapsin bei einem Patienten mit dem klinischen Bild einer limbischen Enzephalitis ohne maligne Grunderkrankung die Untersuchung einer Kohorte mit breit gefächerten neurologisch-psychiatrischen Diagnosen auf das Vorliegen von anti-Synapsin-Antikörpern vor. Bei einem Teil dieser Patienten konnten anti-Synapsin-Antikörper, allerdings vom IgG-Typ, nachgewiesen werden. Die Antikörper von achtzehn Patienten werden in der vorliegenden Arbeit in Zell-basierten Assays hinsichtlich ihrer Epitopspezifität charakterisiert. Das Protein Synapsin besteht aus abgegrenzten Untereinheiten mit verschiedenen Strukturen und Funktionen. HEK-Zellen wurden mit diesen Untereinheiten transfiziert und die in Seren der Patienten enthaltenen Antikörper auf Reaktivität mit den einzelnen Untereinheiten überprüft. Dabei zeigte sich kein einheitliches Bild, es scheinen aber präferentiell zwei Domänen, die A-Domäne und die D-Domäne, als antigene Epitope zu wirken. Die Antikörper gehören nicht alle der gleichen IgG-Subklasse an, sind aber in der Mehrheit der Fälle vom vergleichsweise selten vorkommenden IgG₄ Typ. Darüberhinaus wurden Liquores von Patienten mit beginnenden Demenzen unterschiedlicher Ätiologie auf das Vorliegen von anti-Synapsin-Antikörpern überprüft. In 4% der Fälle konnten im Western-Blot-Verfahren mit Synapsin-Knock-Out Kontrolle IgA-Antikörper gegen Synapsin nachgewiesen werden. Mangels einer ausreichenden Anzahl an Kontrollen kann über die statistische Signifikanz dieser Entdeckung gegenwärtig noch keine Aussage gemacht werden. Es bleibt mittels funktioneller Studien zu untersuchen, in wie weit die Antikörper der untersuchten Patienten eine pathogenetische Relevanz haben bzw. in wie weit es sich lediglich um ein Epiphänomen handelt.

1.2 Abstract

The recently discovered autoantibody encephalitides have moved more and more into the focus of scientific research. In contrast to the long known paraneoplastic syndromes with neurological presentation, the autoantibody encephalitides are not necessarily associated with a neoplastic condition and respond to treatment with immune suppressive strategies. After the discovery of the most common form of autoantibody encephalitis, the NMDA receptor encephalitis, many other types of autoantibodies against neuronal antigens were found and the search for new entities in this field continues to the day. A few years ago, in serum and CSF of a patient with the clinical picture of limbic encephalitis in the absence of neoplastic disease, IgA-antibodies against the neuronal protein Synapsin were found. This led to the examination of a group of patients with a broad spectrum of neurological and/or psychiatric diseases for the presence of antibodies against this protein in the serum. A part of this group tested positive for said antibodies, this time of the IgG-type. The protein synapsin consists of different subunits, each of them having their own structure and function. In the paper at hand, the anti-Synapsin-autoantibodies of eighteen patients are characterized concerning their epitope specificity. This is done by transfecting HEK-cells with the different subunits and testing the sera of the patients for reactivity against the fractions. The results showed that, though different domains were antigenic for different patients, a preference for the A-domain and the D-domain exists. Likewise, the antibodies from different patients don't belong to the same IgG-subtype, but antibodies of the IgG₄ type were clearly most frequently found. Additionally, CSF samples from patients diagnosed with early forms of different kinds of dementia were examined for the presence of anti-Synapsin-antibodies. In 4% of cases, antibodies could be detected by Western blotting with synapsin-knock-out controls. Due to a limited number of control CSFs and therefore lacking statistical significance, a valid conclusion cannot yet be drawn. Concerning the pathological relevance of the here presented findings, further research, particularly regarding the functional effects of the found antibodies, remains to be done.

2. Einleitung

2.1 Autoantikörperenzephalitiden

Der vermehrte Nachweis einer autoimmun-vermittelten Pathogenese unterschiedlicher neurologischer oder psychiatrischer Erkrankungen in den letzten Jahren, zusammen mit dem damit einhergehenden teilweise paradigmatischen Wandel der Therapiestrategien, bildet ein gleichermaßen hochdynamisches wie spannendes Forschungsfeld ab. Dass es grundsätzlich zu einer Immunantwort, die mit der Bildung von Antikörpern gegen körpereigene neuronale Proteine einhergehen können, ist im Rahmen maligner Grunderkrankungen schon seit Langem bekannt. Die aus dieser Immunantwort resultierende Erkrankung wird als paraneoplastisches Syndrom bezeichnet. Zu diesen paraneoplastischen Syndromen gehört das Krankheitsbild der limbischen Enzephalitis. Wie der Name schon andeutet, handelt es sich hierbei um eine autoimmun vermittelte Entzündung von Teilen des limbischen Systems. Insbesondere der Hippocampus ist hier häufig betroffen. Der Schädigung von Strukturen des limbischen Systems entsprechend präsentieren sich Patienten mit limbischer Enzephalitis klinisch mit Temporallappenanfällen, Kurzzeitgedächtnisstörungen, rasch progredienter Demenz, psychotisch-halluzinatorischen oder affektiven Störungen sowie Bewegungsstörungen. Die Antikörper von Patienten mit paraneoplastischen Syndromen neurologischer Art sind IgG-Antikörper und ihre Antigene intrazelluläre Proteine und somit für die Antikörper nicht gut zugänglich. Die eigentliche Pathologie und der irreversible Zelluntergang im Zielgewebe ist nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung am ehesten durch T-Zellen vermittelt (Darnell and Posner, 2003). So sind bei manchen Tumorpatienten onconeuronale Antikörper nachweisbar, ohne dass klinisch ein paraneoplastisches Syndrom vorliegt (Monstad et al., 2009). Induziert man durch Immunisierung mit Hu-Protein hohe Anti-Hu-Titer in Mäusen, so führt dies nicht zu Symptomen (Sillevis Smitt et al., 1995). Andererseits kann man bei Patienten mit Anti-Hu Enzephalomyelitis Hu-reaktive T-Zellen finden (Rousseau et al., 2005) und Hirn- und Nervengewebe von Anti-Hu-Enzephalomyelitis Patienten sind T-Zell infiltriert (Dalmau et al., 1991; Voltz et al., 1998). Die pathogenetische Vorstellung ist, dass im Tumorgewebe ebenfalls das entsprechende neuronale Antigen enthalten ist, es bei Tumorwachstum vermehrt exprimiert wird und eine Immunreaktion hervorruft (Darnell and Posner, 2003). Wie die eigentlich bestehende Toleranz des Immunsystems gegen Proteine, die zum „Selbst“

gehören, im Kontext einer malignen Erkrankung überwunden wird, ist nicht geklärt. Es ist jedoch nicht notwendigerweise immer so, dass intrazelluläre Antigene keine wirksamen Zielstrukturen für Antikörper sein können. Bei der paraneoplastischen Variante des Stiff-Person-Syndrom, bei dem es durch Störung der GABAergen Neurotransmission zu einer dauerhaften oder durch externe Stimuli getriggerten Erhöhung des Muskeltonus kommt, liegen häufig Antikörper gegen das mit synaptischen Vesikeln assoziierte Protein Amphiphysin vor. Es konnte gezeigt werden, dass es zur Epitop-spezifischen Internalisierung von Anti-Amphiphysin-Antikörpern kommt, wenn Amphiphysin in der Zelle vorhanden ist und dass der Transfer von Anti-Amphiphysin-IgG bei Ratten sowohl klinisch eine Erhöhung des Muskeltonus als auch eine Beeinträchtigung der präsynaptischen GABAergen Inhibition zur Folge hat (Geis et al., 2010). In einer anderen Studie wurden Anti-Yo Antikörper von zerebellären Purkinje-Zellen aufgenommen und induzierten darauf den Zelluntergang (Greenlee et al., 2010). Vor wenigen Jahren führte die Beschreibung einer Patientengruppe mit Antikörpern gegen unterschiedliche extrazelluläre neuronale Antigene zur Entdeckung einer neuen Art von Autoimmunenzephalitis (Ances et al., 2005). Diese Enzephalitiden mit Antikörpern gegen Neuropil-Proteine oder die extrazellulären Domänen synaptischer Proteine zeigen eine wesentlich geringere Assoziation mit Tumorerkrankungen und können in nahezu jedem Lebensalter auftreten (Armangue et al., 2012; Florance et al., 2009). Sie sprechen gut auf eine immunsuppressive Therapie an (Lancaster et al., 2011) und für die Formen, für die der Schädigungsmechanismus gezeigt werden konnte, waren die Antikörper von direkter pathogenetischer Bedeutung (Carvajal-Gonzalez et al., 2014; Lai et al., 2009; Manto et al., 2010; Ohkawa et al., 2013; Petit-Pedrol et al., 2014). Es besteht häufig ein Zusammenhang zwischen der physiologischen Funktion des Antigens und der klinischen Präsentation der Autoimmunenzephalitis und in vielen Fällen lassen sich die Symptome in genetisch manipulierten Knock-out-Modellorganismen reproduzieren. Der am häufigsten vorkommende Typ ist die Anti-NMDA-Rezeptor-Enzephalitis (Granerod et al., 2010), bei der Antikörper gegen den N-terminalen extrazellulär gelegenen Teil der GLUN1 Untereinheit von NMDA-Rezeptoren gebildet werden (Dalmau et al., 2008). Binden diese Antikörper, so kommt es zu einer Quervernetzung und Internalisierung der Rezeptoren. Diese Veränderungen sind bei Säugetieren der Antikörperexposition reversibel (Hughes et al., 2010). Bei der NMDAR-Enzephalitis scheint außerdem IgG nicht die einzige relevante Immunglobulinklasse zu sein. Es wurden auch Patienten mit Antikörpern vom IgA-Typus beschrieben, deren Antikörper *in vitro* zum Verlust

synaptischer NMDA-Rezeptoren und zur Abschwächung postsynaptischer Ströme führte (Prüss et al., 2012). Weitere Beispiele für spontan auftretende Autoimmunenenzephalitiden sind die Anti-AMPA-Rezeptor-Enzephalitis, Anti-Caspr2- und Anti-LGI1-Enzephalitis – letzteres ist ein nach extrazellulär sezerniertes Protein – Anti-GABA-Rezeptorenzephalitis und die Anti-DPPX-Enzephalitis. Insgesamt ist die Forschung auf dem Feld der Autoimmunenenzephalitiden hochaktuell und dem Repertoire an bekannten Antikörpern werden stetig neue hinzugefügt (Leypoldt et al., 2015).

2.1.1 Beschreibung des Indexpatienten für anti-Synapsin Autoantikörper und Prävalenz der Antikörper

Vor wenigen Jahren beschrieb unsere Arbeitsgruppe den Fall eines 69-jährigen männlichen Patienten mit limbischer Enzephalitis ohne Vorliegen bekannter neuronaler Antikörper, (Piepgras et al., 2015), jedoch mit auffällig hohem Immunglobulin-Titer im Liquor (im Folgenden als Indexpatient bezeichnet). Der Indexpatient präsentierte sich mit einem generalisierten epileptischen Anfall bei anamnestisch einem vorangegangenen Anfall wenige Monate zuvor, Verwirrung, Desorientierung und einem Mild Cognitive Impairment. Das MRT zeigte zunächst eine T2-Hyperintensität im Bereich des linken Hippocampus, im Verlauf entwickelte sich eine Hippocampusatrophie. Im EEG imponierte frontozentral eine Verlangsamung mit einigen epileptiformen Entladungen und im Liquor fand man eine leichte lymphozytäre Pleozytose, eine leichte Proteinerhöhung und oligoklonale IgG-Banden. Diese Befunde sind typisch für das Vorliegen einer Antikörper-assoziierten limbischen Enzephalitis. Ein weniger typischer Befund, aber wie bereits angesprochen auch nicht ohne Präzedenzfall, war der Nachweis einer ausgeprägten intrathekalen Synthese von IgA. Eine Tumorsuche blieb ohne Ergebnis und der Patient sprach auf die Therapie mit Rituximab, einem gegen den B-Zell-Oberflächenmarker CD20 gerichteten Antikörper, an. Auch dies passt in das Bild einer Autoantikörperenzephalitis, ähnlich der gegen neuronale Oberflächenproteine gerichteten Enzephalitiden. Es folgte die nähere Charakterisierung der Antikörper des Indexpatienten. Bei dem Antigen handelte es sich um ein Protein zwischen 70 und 100 kD Größe, das in synaptischen Vesikeln anreichert. Untersuchungen mittels Immunpräzipitation und Massenspektrometrie lieferten die Sequenzen für Synapsin I und Synapsin II. Die Reaktivität der Patientenantikörper sowohl vom IgA- als auch vom IgG-

Typ mit Synapsin bestätigte sich im Western Blot mit Knock-out Kontrolle, in der Immunfluoreszenz mit transfizierten HEK-Zellen sowie im Hirnschnitt der Maus (Piepgras et al., 2015). Nach der Erstbeschreibung eines Falls von limbischer Enzephalitis assoziiert mit Anti-Synapsin-Antikörpern stellte sich die Frage nach der Prävalenz dieser Antikörper. Für eine erste Näherung wurden Seren von 375 Patienten aus Norwegen und Deutschland mit unterschiedlichen neurologischen und psychiatrischen Erkrankungen sowie von 97 gesunden Kontrollen im Western Blot und in Zell-basierten Assays getestet. Dabei waren 23 Patienten, jedoch keine der Kontrollen, positiv. Tumorerkrankungen lagen bei 2 Patienten und andere neuronale Antikörper bei 8 Patienten vor (Höltje et al., 2017). Es konnte bisher nicht festgestellt werden, dass die Antikörper klinisch mit einem klar definierten Symptom oder gar Syndrom korrelieren. Wie bereits erwähnt, hängt die klinische Präsentation von Autoimmunenzenzephalitiden häufig mit der physiologischen Funktion der als Antigen wirkenden Strukturen zusammen. Vor diesem Hintergrund erfolgt zunächst eine funktionelle Beschreibung der Synapsine.

2.2 Synapsine:

Synapsine sind intrazelluläre Phosphoproteine, die in präsynaptischen Nervenendigungen des zentralen und des peripheren Nervensystems vorkommen (De Camilli et al., 1979; Fried et al., 1982; De Camilli et al., 1983). Bei Säugetieren gibt es drei Synapsin-Gene, die für die Proteine Synapsin I-III kodieren. Durch alternatives Splicing entstehen weitere Isoformen: Synapsin Ia und Ib, Synapsin IIa und IIb und Synapsin IIIa-f (Porton et al., 1999; Südhof et al., 1989). Die Größe der Synapsine liegt im Bereich um 70-80 kDa, für Synapsin Ia bei 86 kDa und für Ib bei 80 kDa. Eine Synapsin I-Expression auch in einigen nicht-neuronalen Zellen wie Osteoblasten und Beta-Zellen des Pankreas wurde beschrieben, ist jedoch von geringer Relevanz (Bhangu et al., 2001; Haycock et al., 1988; Matsumoto et al., 1999; Romano et al., 1987). Im ZNS findet sich Synapsin fast ubiquitär, die einzelnen Isoformen werden aber differenziert exprimiert und haben teils unterschiedliche und teils sogar komplementäre Funktionen (Kielland et al., 2006; Mandell et al., 1992; Matus-Leibovitch et al., 1997; Staple et al., 1997; Stone et al., 1994; Zurmohle et al., 1996; Ullrich and Südhof, 1995). Die Expression von Synapsin I und II beginnt in Kultur mit der Differenzierung von Progenitorzellen zu Neuronen und erreicht ein Maximum während der Synaptogenese (Lohmann et al., 1978). In Knock-out

Situationen für Synapsin I und II erfolgt das neuronale Wachstum und die Synapsenbildung in Kultur verlangsamt im Vergleich zu Wildtyp-Neuronen, der Rückstand wird jedoch wieder aufgeholt (Chin et al., 1995). In Gehirnen von Syn I^{-/-}, Syn II^{-/-} oder Syn I/II^{-/-} Mäusen findet man in der histologischen Analyse keine strukturellen Aberrationen (Rosahl et al., 1993), sodass geschlussfolgert werden kann, dass Synapsin I und II für eine normale neuronale Entwicklung nicht unverzichtbar sind. Es gibt jedoch Hinweise, die eine wichtige Funktion der Synapsine für synaptische Feinregulation und Plastizität implizieren, auf die im Folgenden noch eingegangen wird. Synapsin III wird im Unterschied zu Synapsin I und II zu einem frühen Zeitpunkt, während der Neuritenelongation stark exprimiert und ist in axonalen Wachstumskegeln und im Zellkörper nachweisbar. Der Knock-out von Synapsin III führt zu einer Verbreiterung und Verkürzung des Wachstumskegels (Ferreira et al., 2000). Im *Gyrus dentatus* des Hippocampus adulter Mäuse führt der Syn III Knock-out zu einer verminderten Proliferation und einer verlängerten Lebensdauer von neuronalen Progenitorzellen (Kao et al., 2008). Synapsin I ist das am längsten bekannte und am besten untersuchte Synapsin. Es liegt in präsynaptischen Nervenendigungen mit synaptischen Vesikeln (SV) assoziiert vor (Hirokawa et al., 1989), befindet sich aber vor allem im distal der aktiven Zone gelegenen Reserve Pool synaptischer Vesikel und spielt an SVs in der Nähe der aktiven Zone, dem Readily Releasable Pool (RPP) einigen Arbeiten zu Folge eine geringere Rolle (Kushner et al., 2005; Pieribone et al., 1995). Synapsin I kann sowohl mit der phospholipidhaltigen Membran von SVs als auch mit Elementen des Zytoskeletts wie Aktin, Brain-Spectrin oder Mikrotubuli interagieren (Hirokawa et al., 1989) und außerdem Homo- oder Heterodimere bilden. Dabei überlappen die Regionen für die einzelnen Interaktionen innerhalb des Proteins nicht, sodass Synapsin geeignet ist - entweder durch Bindung an mehrere SVs oder an einzelne Vesikel in Kombination mit Dimerisierung - synaptische Vesikel an Elementen des Zytoskeletts zu clustern (Font and Aubert-Foucher, 1989; Hosaka and Südhof, 1999) und so den RP vom RRP zu trennen, was ungewollte Vesikelfusion oder Transmitterausschüttung zu verhindern hilft. Außerdem kann Synapsin ein stabiles Monolayer an der Grenze zwischen hydrophilen und hydrophoben Substanzen bilden (Ho et al., 1991) und durch Vesikelcoating zur Stabilisierung synaptischer Vesikel beitragen, indem es die Oberflächenspannung dieser sehr stark gekrümmten Strukturen vermindert (Cheetham et al., 2003). So sind Vesikel von Synapsin Knock-out Neuronen größer und zahlenmäßig vermindert (Awizio et al., 2007). Die Interaktionen mit den verschiedenen Strukturen der Präsynapse werden durch

Phosphorylierung mittels verschiedener Kinasen reguliert. Vereinfacht kann man sagen, dass an der Mehrzahl der phosphorylierbaren Reste Phosphorylierung zu einer verminderten und Dephosphorylierung zu einer erhöhten Affinität für Vesikel und Zytoskelettbestandteile führt (Cesca et al., 2010). Die Depolarisation der Nervenzelle hat eine Phosphorylierung der Synapsine an vielen Stellen zur Folge (Nestler and Greengard, 1982; Tsou and Greengard, 1982), was zu einer Dissoziation der Synapsine von den Vesikeln und damit zu einer Bereitstellung der Vesikel zur Exozytose führt. An anderen Stellen wird Synapsin bei Depolarisierung dephosphoryliert, was auf eine mögliche Rolle für die Endozytose im Zusammenhang mit Vesikel-Recycling hindeutet (Cesca et al., 2010). Synapsin ist aber nicht zusammen mit Clathrin nachweisbar und ist daher vermutlich erst nach vollendeter Endozytose von Bedeutung (Bloom et al., 2003). Eine mögliche Vorstellung ist, dass Synapsin die endozytierten Vesikel ans Zytoskelett rekrutiert und wieder dem RP zuführt (Cesca et al., 2010).

2.2.1 Domänenstruktur der Synapsine:

Die Domänenstruktur der Synapsine wurde erstmals 1989 beschrieben und ist heute noch weitgehend aktuell (s. Abb. 1). Alle Synapsine haben N-terminal mit den Domänen A bis C die gleiche Struktur, C-terminal variieren die einzelnen Isoformen (Südhof et al., 1989). Nachfolgend soll die Domänenstruktur von Synapsin I als für die vorliegende Arbeit relevanteste vorgestellt werden.

A-Domäne:

Die A-Domäne ist relativ kurz mit ca. 30 Aminosäuren (Südhof et al., 1989) und fungiert als Substrat für die Phosphorylierung durch die Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) I und IV sowie für die Proteinkinase A (PKA). Die Domäne A bindet gut an negativ geladene Lipide und moduliert vermutlich die Bindung von Synapsin an Vesikel. Außerdem ist die dephosphorylierte A-Domäne in der Lage, Aktin zu bündeln. Phosphorylierung führt zur Abdissoziation von den Vesikeln und vom Zytoskelett und findet verstärkt bei Depolarisation statt (Bahler and Greengard, 1987; Czernik et al., 1987; Huttner and Greengard, 1979).

B-Domäne:

Die B-Domäne ist evolutionär nicht gut konserviert (Südhof et al., 1989), bis auf einen Teil, der ein ArfGAP1 lipid-packing sensor (ALPS) Motiv enthält. ALPS-Motive sind gelöst unstrukturiert, falten sich aber bei Kontakt mit Membranen in amphiphile Konstrukte und könnten in der Lage sein, Defekte in der Phospholipidmembranen der kleinen und damit stark gekrümmten SV zu erkennen und so eine spezifische Wechselwirkung zwischen Synapsin und SV zu vermitteln. Die Deletion des ALPS-Motivs beeinträchtigt die Fähigkeit von Synapsin, synaptische Vesikel zu binden (Drin et al., 2007; Krabben et al., 2011). Die B-Domäne kann über den MAP-Kinase/Erk-Weg phosphoryliert werden (Jovanovic et al., 1996; Matsubara et al., 1996).

C-Domäne:

Die C-Domäne ist relativ lang und sowohl zwischen den Isoformen innerhalb einer Spezies als auch zwischen den Spezies hochkonserviert. Sie enthält Bindungsstellen für Aktin und für Homo- und Heterodimerisierung (Font and Aubert-Foucher, 1989, Hosaka and Südhof, 1999) und vermittelt damit die Kernfunktionen von Synapsin für die SV-Zytoskelett-Interaktion. Außerdem kann ein Teil der Domäne C in Phospholipidmembranen inserieren (Südhof et al., 1989). Auch diese Domäne stellt ein Substrat für Phosphorylierung dar (Onofri et al., 2007)

D-Domäne:

Die D-Domäne ist Prolin-reich und enthält viele Motive, die in der Lage sind, SH-Gruppen an Proteinen zu binden (Südhof et al., 1989). Zwar ist die D-Domäne nicht in jeder Synapsin-Isoform vorhanden, aber jede Isoform hat an ihrer Stelle einen Prolin-reichen Abschnitt (Südhof et al., 1989). Aufgrund der Proteinbindungsfähigkeit wäre die D-Domäne nach Meinung einiger Autoren ein guter Kandidat, um mit Membranproteinen von SVs zu interagieren und so zur Spezifität der Synapsin-bindung an SVs beizutragen (Cesca et al., 2010). Auch die D-Domäne ist Substrat des MAPK/Erk-Weges (Czernik et al., 1987; Huttner et al., 1981) . Sie inhibiert das korrekte Targeting von Synapsin an synaptische Terminalen, dieser Einfluss kann aber von der E-Domäne überwunden werden (Gitler et al., 2004b).

Domäne E:

Die letzten 50 Aminosäuren bilden die E-Domäne und kommen sowohl in Syn Ia als auch in Syn IIa vor (Südhof et al., 1989).

Überexpression der E-Domäne in inhibitorischen Purkinje-Zellen beschleunigt die Kinetik von Exozytose und Vesikelzirkulation und vermindert die synaptische Depression nach hochfrequenter Stimulation (Fassio et al., 2006).

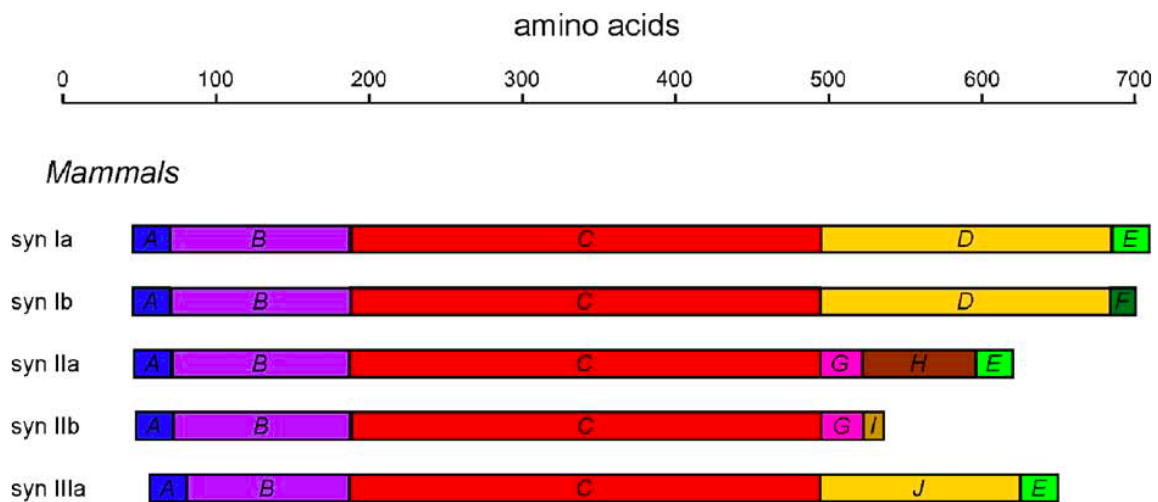


Abb. 1: Domänenstruktur der Synapsine

Abgebildet ist die Domänenstruktur der Synapsine bei Säugern. Die Abbildung stammt aus Cesca, Baldelli et al. 2010.

2.2.2 Bedeutung der Synapsine für synaptische Plastizität:

Da Synapsin an der aktiven Zone eine weniger wichtige Rolle spielt, hat dessen Fehlen tendenziell eine geringere Auswirkung auf die basale Transmission. Wenn der Bedarf für Vesikel aus dem Reserve-Pool aufkommt, also nach prolongierter neuronaler Stimulation, kommt der Mangel verstärkt zum Tragen. So folgt in Synapsin Knock-out Neuronen, insbesondere bei GABAergen Terminals, auf eine längere Stimulation eine stärker ausgeprägte synaptische Depression als im Wild-Typ.

Paired Pulse Facilitation (PPF):

Synapsine beeinflussen einige Formen synaptischer Plastizität, vor allem der Short Term Plasticity (STP). Hier ist zunächst die Paired Pulse Facilitation (PPF) zu nennen. Erfolgt innerhalb eines Zeitfensters einiger Millisekunden nach einem Stimulus ein zweiter Reiz, so wird dieser verstärkt weitergeleitet, hauptsächlich über eine Erhöhung der Neurotransmitter-Freisetzungswahrscheinlichkeit in der Präsynapse. Bezüglich der PPF ist die Datenlage nicht eindeutig. In einigen Studien scheint es so zu sein, dass die PPF bei Fehlen von Synapsin gesteigert ist und dass dieser Effekt insbesondere glutamaterge Synapsen betrifft, während GABAerge Synapsen eher von einer verstärkten Depression betroffen sind (Chiappalone et al., 2009; Rosahl et al., 1993). Eine andere Studie fand dagegen eine verminderte PPF im Knock-out. Bei geringen Calcium-Konzentrationen war dieser Effekt jedoch nicht mehr vorhanden, sodass die Autoren den Unterschied zum Wildtyp eher auf die verstärkte synaptische Depression zurückführten (Humeau et al., 2001). Bei gesteigerter MAPK/Erk Aktivität, die zu einer stärkeren Phosphorylierung von Synapsin I führt, sind sowohl PPF als auch die Long Term Potentiation (LTP), die zu langfristigen Veränderungen der synaptischen Transmission führt, gesteigert. Dieser Effekt kann durch die Deletion von Syn I blockiert werden (Kushner et al., 2005).

Posttetanisch Potenzierung (PTP):

Bei der PTP kommt es nach tetanischer Stimulation der Präsynapse zu einer erhöhten Amplitude der postsynaptischen Reizantwort, die über viele Sekunden anhält. Dies ist vermutlich durch die größere Calcium-Konzentration in der Präsynapse in Folge der Addition von Restcalcium nach dem vorangegangenen Stimulus und neuem Kalziumeinstrom zu erklären. PTP kann in Abwesenheit von NMDA-Antagonisten zu LTP führen. Das Fehlen von Synapsin scheint PTP zu beeinträchtigen. So kommt es bei cholinergen Neuronen von *Aplysia* nach Neutralisierung von Synapsin durch entsprechende Antikörper zu posttetanischer Depression statt Potenzierung. Umgekehrt wird die PTP gesteigert, wenn man exogenes Syn I injiziert (Humeau et al., 2001). Im Mausmodell ist die PTP im Syn II Knock-out vermindert und im Syn I/II Knock-out doppelt so stark vermindert wie im Syn II single Knock-out, wenn auch im Syn I single Knock-out kein Einfluss messbar war (Li et al., 1995; Rosahl et al., 1995).

2.2.3 Synapsin-assoziierte Erkrankungen:

Synapsin spielt eine Rolle in der Pathogenese verschiedener neurologischer und psychiatrischer Erkrankungen. Am besten ist dies für die Epilepsie belegt. Alle Synapsin Knock-out Modellorganismen mit Ausnahme des Syn III single Knock-out entwickeln nach einer symptomfreien Latenzphase eine Epilepsie (Li et al., 1995; Rosahl et al., 1995). Beim Menschen wurden verschiedene Mutation im SYN 1 Gen mit dem Vorliegen von Epilepsie und zum Teil mit zusätzlichen Verhaltensstörungen und Autismus-Spektrum-Störungen korreliert (Fassio et al., 2011a; Garcia et al., 2004). Außerdem lieferte eine multizentrische Genom-Mapping-Analyse SYN2 Mutationen als Risikofaktor für das Entwickeln einer Epilepsie (Cavalleri et al., 2007). Diese Beobachtung legt den Schluss nahe, dass das Fehlen von Synapsin die Balance zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Einflüssen verschiebt. Auf welche Art und Weise dies geschieht, ist noch nicht vollständig geklärt. In GABAergen Synapsen wird weniger Synapsin exprimiert als in glutamatergen (Fassio et al., 2011b). Die Synapsine scheinen aber in beiden Synapsentypen unterschiedliche Funktionen zu erfüllen. In glutamatergen Synapsen von Synapsin I Knock-out Mäusen ist nur der RP verkleinert und damit die Synaptische Depression ausgeprägter, die basale Transmission aber nicht eingeschränkt. In GABAergen Synapsen ist die Anzahl der Vesikel im RRP reduziert und damit die basale Transmission eingeschränkt (Gitler et al., 2004a; Chiappalone et al., 2009). So scheint zunächst die GABAerge Transmisson durch das Fehlen von Synapsinen geschwächt, die glutamaterge dagegen gestärkt zu sein. Auch in Patch Clamp Experimenten mit Triple Knock-out Neuronen zeigt sich eine ähnliche Verschiebung in Richtung Exzitation. EPSCs sind hier größer, ebenso wie die Short Term Facilitation in glutamatergen Synapsen, IPSCs dagegen weisen eine verminderte Amplitude auf (Farisello et al., 2013). Neuere Daten deuten jedoch darauf hin, dass dies nur in der Latenzphase bis zum Auftreten erster epileptischer Symptome der Fall ist. Nach dem Auftreten der Epilepsie scheinen Kompensationsmechanismen zu einer Stärkung der GABAergen Transmission, klinisch jedoch nicht zu einem Sistieren der Anfälle zu führen (Ketzef and Gitler, 2014; Ketzef et al., 2011).

Alzheimer:

Da Synapsine einen Einfluss auf STP und LTP haben, kann man vermuten, dass ein Mangel an Synapsin zu Beeinträchtigungen von Lernen und Gedächtnis führen könnte.

Tatsächlich findet man bei Untersuchungen an post-mortem gewonnenen Proben aus dem Hippocampus von Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen weniger Synapsin (Perdahl et al., 1984; Qin et al., 2004). Im entorhinalen Cortex von Patienten mit beginnendem Alzheimer ist die Expression der α -Varianten aller drei Synapsine vermindert (Perdahl et al., 1984). Auch in verschiedenen Modellorganismen zeigt sich ein Einfluss von Synapsin auf das Gedächtnis. Die Synapsin-Null *Drosophila* Mutante zeigt Einschränkungen in der Gedächtnisbildung und beim assoziativen Lernen (Godenschwege et al., 2004; Michels et al., 2005). Synapsin I K.O. und Synapsin II K.O. Mäuse sind altersabhängig kognitiv eingeschränkt (Corradi et al., 2008) und bei Triple Knock-out Mäusen ist das räumliche Gedächtnis defizitär (Gitler et al., 2004a). Im Gegensatz dazu wird die Expression von Synapsin gesteigert, nachdem eine Maus eine neue Aufgabe im Morris-Watermaze gelernt hat (Gomez-Pinilla et al., 2001).

Andere Erkrankungen:

Passend zum ubiquitären Vorkommen dieses Proteins wurde auch für viele weitere Erkrankungen ein Zusammenhang mit Synapsin postuliert. Im Hippocampus von Patienten mit bipolarer Störung findet sich weniger Synapsin Ia, IIa und IIIa als bei Kontrollpatienten (Vawter et al., 2002). Im Brodmann-Areal 10 im präfrontalen Cortex wurde dagegen eine verstärkte Synapsin-Expression berichtet (Cruceanu et al., 2013). Die Therapie mit Lithium, einem bei bipolarer Störung häufig als Phasenprophylaxe eingesetztem Medikament, beeinflusst bei einigen Patienten die Expression von Synapsin II (Cruceanu et al., 2012). Bei MS-Patienten kommen TH1 Zellen gegen Synapsin ähnlich häufig wie gegen Myelinbasisches Protein gerichtete TH1 Zellen vor. Bezüglich der relativen Häufigkeit der gegen Synapsin gerichteten T-Zellen zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen MS-Patienten und gesunden Kontrollen (Polak et al., 2001).

Für die Pathogenese von Schizophrenie scheint insbesondere Synapsin II und möglicherweise auch Synapsin III eine Rolle zu spielen. Beide Proteine werden von schizophrenen Patienten weniger stark exprimiert. Mutationen im Synapsin II Gen kommen bei schizophrenen Patienten gehäuft vor (Dyck et al., 2011).

2.3 Fragestellung:

Unsere Arbeitsgruppe hat in vorangegangenen Arbeiten das Vorliegen von Anti-Synapsin I Antikörpern in Serumproben von Patienten mit verschiedenen neurologischen und psychiatrischen Diagnosen gezeigt. Diese Antikörper reagierten im Zell-basierten Assay und im Western Blot mit full-length-Synapsin.

Es ist ungeklärt, welcher Teil des Proteins als antigenes Epitop wirkt und inwiefern sich die Epitopspezifität innerhalb der untersuchten Kohorte unterscheidet. Dies kann eine Rolle spielen, um besser in der Lage zu sein, die mögliche Pathogenität der Antikörper in funktionellen Studien zu untersuchen. Mit Hilfe von Plasmid-DNA für einzelne Synapsin-Teilstücke durch D. Gitler und Arbeitsgruppe, können HEK-Zellen mit DNA für einzelne Synapsin-Abschnitte transfiziert und hinsichtlich ihrer Antigenität untersucht werden.

Folgende Fragestellungen sollen in der vorliegenden Dissertation beantwortet werden:

- Eignet sich zur näheren Charakterisierung der Epitopspezifität der in Patientenseren nachgewiesenen Antikörper mit Reaktivität gegen full-length-Synapsin der Zell-basierte Assay mit transfizierten HEK-Zellen?
- Gegen welche Epitope werden Antikörper gebildet, unterscheiden sich diese zwischen den einzelnen Patienten und haben bestimmte Synapsin-Domänen ein besonders hohes Antigenes Potenzial?
- Gibt es eine Assoziation zwischen der Epitopspezifität der Antikörper und der Klinik der Patienten?
- Welcher IgG-Subklasse gehörten die Anti-Synapsin Antikörper vom IgG-Typ an?

Weiterhin standen Liquorproben von Patienten mit Mild Cognitive Impairment (MCI) oder beginnender Alzheimer-Demenz zur Verfügung. Synapsin scheint eine Rolle in Prozessen der synaptischen Plastizität zu spielen. Ebenso scheint es einen

Zusammenhang zwischen Synapsinen und zumindest einigen Formen der Alzheimer-Demenz zu geben. Daher sollte folgende Frage initial beantwortet werden:

- Findet man im Liquor von Patienten mit beginnender Demenz Antikörper gegen Synapsin?

3. Material und Methoden:

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

<u>Chemikalien:</u>	<u>Hersteller:</u>
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BCA Protein Assay Lösung A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serum Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Enhanced-Chemiluminescence-Reagenzien (ECL)	GE Healthcare, Chicago, USA
Entwickler	Kodak, Rochester, USA
Fixierer	Kodak, Rochester, USA
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Braun, Melsungen, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magermilchpulver	Elsdorf, Elsdorf, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Optimem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Prestained PageRuler Proteinmarker	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteaseinhibitor	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N,N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Normal Goat Serum (NGS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Urea	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.2 Geräte

<u>Geräte:</u>	<u>Hersteller:</u>
Filmkassette <i>Hypercassette</i>	Amersham Bioscience, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Fotoentwicklungsmaschine Cura 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Gelelektrophoreseapparatur (Mini Protean II)	Bio Rad, Hercules, USA
Glasplatten	Bio Rad, Hercules, USA
Guss-Rahmen	Bio Rad, Hercules, USA
Guss-Stand	Bio Rad, Hercules, USA
Handhomogenisator mit PVC Überzug	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Konfokales Lasermikroskop Leica SL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Optima TL Ultrazentrifuge, TLA 100,4 Rotor	Beckmann Coulter, Brea, USA

Zentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	Anthos Mikrosysteme, Krefeld, Deutschland
Power Pack 200	Bio Rad, Hercules, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transblot SD	Bio Rad, Hercules, USA
10- und 15-Well-Kämme	Bio Rad, Hercules, USA
Implen Nanophotometer P300	Intas, München, Deutschland

<u>Sonstiges</u>	<u>Hersteller:</u>
Fotofilm – Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Chicago, USA
Kompetenter E. coli one shot 10 F	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Nitrocellulose Membran Hybond-C	Amersham Bioscience, Little Chalfont, Vereinigtes Königreich
Quantum Prep Plasmid Miniprep	Bio Rad, Hercules, USA

3.1.3 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Klonalität</u>	<u>Wirtsspezies</u>	<u>Hersteller</u>
Alexa Fluor 594 anti-human IgG	polyklonal	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG	polyklonal	Ziege	MoBiTec, Göttingen, Deutschland
Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG	polyklonal	Ziege	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
anti-human IgA (alpha chain), Peroxidase-gekoppelt	polyklonal	Ziege	Rockland Immunochemicals, Limerick, USA
anti-Synapsin I/II	polyklonal	Hase	Snyaptic Systems, Göttingen, Deutschland
anti-Synapsin I	monoklonal	Maus	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland

anti-Synapsin I (C-Domäne)	polyklonal	Hase	Prof. Dr. Fabio Benfenati, Istituto Italiano di Tecnologia, Genua, Italien(Vaccaro et al., 1997)
anti-Synapsin I (E-Domäne)	polyklonal	Hase	Prof. Dr. Fabio Benfenati, Istituto Italiano di Tecnologia, Genua, Italien(Vaccaro et al., 1997)
Texas Red 594 anti-human IgA	polyklonal	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa Fluor 647 anti-human IgG ₁	polyklonal	Ziege	Southern Biotech, Birmingham, USA
Alexa Fluor 647 anti-human IgG ₂	polyklonal	Ziege	Southern Biotech, Birmingham, USA
Alexa Fluor 647 anti-human IgG ₃	polyklonal	Ziege	Southern Biotech, Birmingham, USA
Alexa Fluor 647 anti-human IgG ₄	polyklonal	Ziege	Southern Biotech, Birmingham, USA

3.1.4 Patienten:

Für die Experimente standen einerseits Liquor- und Serumproben eines 2013 mit limbischer Enzephalitis diagnostizierten Patienten zur Verfügung. Diese Proben testen positiv auf Antikörper vom IgA-Typ und auch vom IgG-Typ gegen Synapsin I und II (Piepgras et al., 2015). Weiterhin wurden Seren von Patienten genutzt, die zwischen September 2011 und März 2012 an der St. Olaf Universitätsklinik in Trondheim, Norwegen, psychiatrisch aufgenommen wurden (Schou et al., 2016). Aus einer Kohorte von insgesamt 207 Patienten aus Trondheim identifizierte unsere Arbeitsgruppe 16 Patienten mit Synapsin-I-Antikörpern vom IgG Typ (Höltje et al., 2017). Außerdem stellte das NeuroCure Clinical Research Center/Department of Neurology der Charité Seren von drei Anti-Synapsin-I positiven Patienten mit entweder Clinically Isolated Syndrome (CIS) oder Relapsing Remitting MS im frühen Stadium, von einem dieser Patienten

zusätzlich Liquor sowie 9 Seren und 5 Liquorproben von gesunden Kontrollen bereit. Von der Hochschulambulanz Gedächtnissprechstunde des Experimental and Clinical Research Centers der Charité wurden 110 Liquorproben von Patienten sowie 14 Kontroll-Liquores zur Verfügung gestellt. Die Patienten stellten sich mit kognitiven Auffälligkeiten in der Gedächtnissprechstunde vor und hatten sehr unterschiedliche Diagnosen, wobei zu beachten ist, dass die genaue Ursache eines demenziellen Syndroms in vielen Fällen erst post mortem mit Sicherheit bestimmt werden kann und häufig auch Mischformen, insbesondere zwischen vaskulärer Demenz und Alzheimer-demenz vorliegen. Bei dem Patientenkollektiv wurde in 40 Fällen am ehesten eine Demenz vom Alzheimerstyp, in vier Fällen eine Demenz vaskulärer Ätiologie, in fünf Fällen eine gemischte (vaskulär / Alzheimer) Demenz, in acht Fällen eine frontotemporale Demenz, in 18 Fällen eine affektive Störung mit kognitiven Einschränkungen und in 13 Fällen subjektive Gedächtnisbeschwerden (subjective memory complaints, SMC) diagnostiziert. Bei 19 Patienten blieb die Ätiologie der kognitiven Defizite bis auf weiteres unklar, zwei Patienten waren Geschwister Betroffener und ein Patient litt an kognitiven Beschwerden in Folge einer Meningoenzephalitis. Die Patienten gaben zur Nutzung der Liquorproben zu wissenschaftlichen Zwecken ihr Einverständnis und es erging ein Ethikvotum mit der Nummer EA2/118/15.

3.1.5 Synapsin-Plasmide und Versuchstiere:

Plasmide:

Für die Transfektionen wurden Plasmide mit folgenden DNA-Fragmenten genutzt, die wie vorbeschrieben (Gitler et al., 2004b) aus der Sequenz von Ratten Synapsin Ia mittels C1-Backbone Vektor konstruiert wurden: das N-terminale ABC-Fragment (AA 1-416), das BC-Fragment (AA 31-416) Domäne C (AA 113-420), Domäne D (AA 414-651), Das DE-Fragment (AA 415-704) und die Domäne E (AA 655-704). Ratten-Synapsin Ia ist humanem Synapsin zu 95% homolog (Südhof, 1990). Alle Fragmente wiesen ein Reporter-Konstrukt für enhanced Yellow Fluorescence (eYFP, ABC-Fragment) oder enhanced Green Fluorescence (eGFP, alle sonstigen Konstrukte) zur endogenen Detektion der Expression auf.

Mäuse:

Die Synapsin Tripple-Knock-out-Mäuse wurden wie vorbeschrieben von Professor Fabio Benfenatis Arbeitsgruppe (Istituto Italiano di Tecnologia, Genua, Italien) generiert und zur Verfügung gestellt (Boido et al.). Es wurden Wildtyp-Mäuse vom Typ C57BL/6 verwandt.

3.2 Methoden:

3.2.1 HEK-Zell-Transfektion:

Human embryonic kidney cells (HEK)293 wurden bei einer Dichte von ca. 70% Konfluenz zunächst 20 Minuten mit Optimem gewaschen und anschließend über eine Stunde bei 37°C in Optimem inkubiert. Für die DNA-Ansätze wurden pro Well 50 µl Optimem mit 1 µl Lipofectamin® und 1-1,5 µg Plasmid-DNA versetzt und 30 Minuten stehen gelassen, damit sich die für die Transfektion erforderlichen DNA enthaltenden Liposomen bilden konnten (s. Herstellerinformation Lipofectamin). Durch die Zugabe von Optimem kann die Serumkonzentration im Zellmedium reduziert werden (s. Herstellerinformationen). Dies ist von Vorteil, da hohe Serumkonzentrationen die Transfektionseffizienz negativ beeinflussen. Die DNA-Ansätze wurden auf die Wells gegeben und pro Well noch 200 µl Optimem hinzugefügt, anschließend wurden die Zellen über 4h bei 37°C inkubiert. Nach den 4h wurden 250 µl HEK-Zell-Medium hinzugegeben und die Zellen dann erneut über mindestens 24h bei 37°C inkubiert. Die Fixierung der HEK-Zellen erfolgte entweder mit eiskaltem 80%igem Methanol für den Nachweis von IgG oder mit auf 4 °C gekühltem 4%igem PFA für den Nachweis von IgA-Antikörpern jeweils über 20 Minuten. Nach der Fixierung wurden die Zellen in einer Blocklösung mit 0,1% Triton X-100 über 1h permeabilisiert. Anschließend wurden die Patientenserum in einer Verdünnung von 1:320 bzw. die Liquores in einer Verdünnung von 1:50 auf die Zellen gegeben und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer belassen. Die Bindung der Sekundärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur über 2h in einer Lösung mit 2% BSA (bovines Serumalbumin) im Dunkeln. Dabei wurde der Alexa Fluor 594 anti-human IgG in der Verdünnung 1:700 und der Texas-red Anti IgA in der Verdünnung 1:200 eingesetzt. Die Antikörper gegen IgG-Subklassen wurden jeweils in der Verdünnung 1:300 eingesetzt. Unter dem Fluoreszenzmikroskop war die erfolgreiche Transfektion anhand der Fluoreszenz-Markierung gut zu erkennen. Zur zusätzlichen Überprüfung wurden die mit den einzelnen

Fragmenten und Domänen transfizierten HEK-Zellen mit jeweils spezifischen Antikörpern gefärbt. Der Versuch wurde für jedes Patientenserum mindestens drei Mal wiederholt.

Titer-Bestimmung und Berechnung des Antikörperindex:

Die HEK-Zell-Transfektion erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurde Patientenserum oder -liquor in Verdünnungen von 1:320, 1:1000, 1:3200, 1:10000, 1:32000 zugegeben und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer belassen. Die Bindung des Sekundärantikörpers erfolgte wie bereits beschrieben. Der Antikörperindex wurde nach der Formel $AI = (\text{anti-Synapsin Titer Liquor}^1 / \text{anti-Synapsin Titer Serum}^1) / (\text{Gesamt Ig Liquor} / \text{Gesamt Ig Serum})$ berechnet, wobei ein Index über 4 als beweisend für eine intrathekale Synthese der Antikörper gewertet wurde.

3.2.2 Transformation

Für die Transformation, wie beschrieben (Pope and Kent, 1996), wurden zunächst kompetente E.coli-Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden die Zellen mit 5 µl Plasmid-DNA vorsichtig gemischt und die Mischung 30 Minuten auf Eis belassen. Danach erfolgte ein Hitzeschock von 42 °C über 30 Sekunden, woraufhin die Reagenzien wieder über 2 Minuten auf Eis gelagert wurden. Als nächstes wurden die Zellen bei 300 rpm und 37°C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz zentrifugiert, die Überstände abpipettiert und das Pellet in 50 µl S.O.C.-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei Kanamycin-haltige Agar-Platten verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA enthielt ein Resistenzgen gegen Kanamycin, sodass nur die Zellen wachsen konnten, die erfolgreich transformiert wurden. Von jeder der zwei Agar-Platten wurde jeweils zwei Kulturen entnommen und in eine Flasche mit LB-Medium und Kanamycin 1:1000 (50µg/ml) gegeben, die über Nacht bei 37°C und 115 rpm im Schüttler belassen wurden. Zur Aufreinigung der DNA wurde das Quantum midi Prep Plasmid Kit nach dem Hersteller-Protokoll (siehe Herstellerinformationen) verwandt. Die Zellen wurden im Medium zunächst über 5 Minuten bei 5000 rpm herunterzentrifugiert und dann, nach Entfernen des Mediums, in der im Kit enthaltenen Resuspensionslösung resuspendiert. Anschließend wurde eine basische Lösung zur Lyse der Zellen hinzugefügt, und vorsichtig gemischt. Nach erfolgter Lyse wurde der pH durch Zugabe einer weiteren Lösung wieder neutralisiert. Die Zellreste wurden daraufhin über

10 Minuten herunterzentrifugiert. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in einen Spinfilter pipettiert und mit im Kit enthaltener Quantum-Prep-Matrix versetzt. Nach dem Mischen erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt über 30 Sekunden. Hierbei verbleibt die Matrix mit der gebundenen DNA im Spinfilter. Das Zentrifugat wurde verworfen und der Spinfilter mit Matrix in Ethanol haltigem Wasch-Puffer nochmals über 30 s zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt und über 2 Minuten zentrifugiert. Die im Spinfilter verbliebene DNA wird mit destilliertem Wasser auf höchster Geschwindigkeit über 1 Minute ausgewaschen und in einem Sammeltube aufgefangen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte mittels Implen Nanophotometer.

3.2.3 Aufbereitung von Mausgehirnen zur weiteren Verwendung im Immunblot:

Für die Immunblots wurden Gesamthirnhomogenate von Wildtyp- und Synapsin-I/II/III-Knock-out-Mäusen (generiert von der Arbeitsgruppe Prof. Fabio Benfenati) sowie die subzelluläre Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel aus Gesamthirnhomogenat von Wildtypmäusen genutzt. Die Herstellung dieser Proben erfolgte auf Eis oder bei 4°C. Aus Wildtyp-Mäusen und Synapsin I/II/III -/- Mäusen wurden Gehirne entnommen und homogenisiert. Aus Wildtyp-Gesamthirn wurde weiterhin noch die subzelluläre Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel gewonnen. Alle hierzu erforderlichen Arbeitsschritte erfolgten auf Eis oder bei 4°C.

Herstellung von Gesamthirnhomogenat:

Zur Herstellung von Gesamthirnhomogenat wurde die Wildtyp-Maus mittels Genickbruch durch Überstreckung getötet und mit einer Schere dekapitiert. Die Kalotte wurde eröffnet, das Gehirn entnommen und mit PBS-Puffer, dem PMSF (200 mmol) 1:100 und Proteaseinhibitor 1:1000 zugesetzt wurde, versetzt. Als Nächstes erfolgte die Homogenisierung mit einem Glas-Teflon-Homogenisator bei 900 rpm. Anschließend wurde das Homogenisat bei 5000 rpm herunterzentrifugiert, um Membranfragmente, nicht lysierte Zellen und Zellkerne zu separieren, und der Überstand wurde in Lämmli-puffer (Laemmli, 1970) nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test über 10 min bei 95°C gekocht.

Herstellung der Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel:

Die Fraktion synaptischer Vesikel wurde durch eine Reihe von Zentrifugationen gewonnen. Zunächst erfolgte die Homogenisierung des Wildtyp-Maushirns wie oben beschrieben. Der Überstand aus dem ersten Zentrifugationsschritt wurde im Rotor TLA 100.4 bei 23000 rpm über 15 Minuten zentrifugiert. Im hierbei entstandenen Pellet befinden sich die ungereinigten Synaptosomen, die in 0,32 M Saccharose Lösung resuspendiert wurden. Bei Synaptosomen handelt es sich um die synaptischen Endigungen von Neuronen, in denen die synaptischen Vesikel enthalten sind. Um die Vesikel zu erhalten, wurde die hypoosmotischen Lyse angewandt. Hierzu wurde eine Lösung aus eiskaltem, destilliertem Wasser, Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:1000, 2mM PMSF im Verhältnis und HEPES-NaOH-Puffer hergestellt und das synaptosomale Pellet im Verhältnis 1:10 mit dieser Lösung versetzt. Daraufhin erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt im TLA 100.4 Rotor bei 23000 rpm über 20 min. Das nun entstandene Pellet enthielt die Membranen der Nervenendigungen, während sich die synaptischen Vesikel im Überstand befanden. Dieser Überstand wurde vorsichtig abgenommen und im TLA 100,4 Rotor bei 80000 rpm erneut zentrifugiert, um die synaptischen Vesikel, die sich nach der Zentrifugation im Pellet befinden vom neuronalen Zytosol im Überstand zu trennen. Das Pellet wurde mit 150 µl 0,32 M Saccharose Lösung resuspendiert und nach der Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen BCA-Test 10 min bei 95°C in Lämmli-Puffer gekocht.

3.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

BCA-Test

Zur Quantifizierung der Proteinkonzentration im Gesamthirnhomogenat oder der Fraktion synaptischer Vesikel kam ein BCA-Test (Smith et al., 1985) zum Einsatz. Zunächst wurde eine Standardreihe mit definierten Verdünnungen von bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS hergestellt. Die zu untersuchenden Proben wurden im Verhältnis 1:50 und 1:250 verdünnt. Die Proben wurden mit BCA-Lösung versetzt und über 30 Minuten auf 60° C erhitzt. Die in der BCA Lösung enthaltenen zweiwertigen Kupferionen werden in einer Reaktion mit den Peptidbindungen der Proteine zu einwertigem Kupfer reduziert (Biuretreaktion, (Davis, 1964, Weichselbaum, 1946). Dies passiert bei Raumtemperatur

vorranging durch die Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin, bei 60° C jedoch durch die Peptidbindungen, was den Test weniger abhängig von der Aminosäurezusammensetzung und daher spezifischer macht (Olson and Markwell, 2007, Wiechelman et al., 1988). Bicinchoninsäure bildet mit den einwertigen Kupferionen einen blauvioletten Komplex. Die Lichtabsorption der Proben und der Standardreihe wurde bei 550 nm gemessen, eine lineare Regressionsgerade der Standardreihe mit dem Lichtabsorptionsgrad als Funktion der Probenkonzentration ermittelt und durch Einsetzen des Absorptionsgrades der zu untersuchenden Proben in die Regressionsgleichung deren Konzentration errechnet, wobei der Mittelwert aus jeweils zwei Proben in den beiden oben angegebenen Verdünnungen herangezogen wurde.

3.2.5 Gelelektrophorese und Western-Blot-Analyse:

Die Proben wurden mittels SDS-PAGE in einem diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gel (Sammelgel 4%, Trenngel 10%) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Laemmli). Bei SDS (Natriumdodecylsulfat), das im Laemmli-Puffer enthalten ist, handelt es sich um ein anionisches Tensid, das an Aminosäuren bindet und auf diese Weise eine konstant negative Ladung der Proteine und der einzelnen Aminosäuren bewirkt. Die nun negativ geladenen Aminosäuren stoßen sich gegenseitig ab, was, unterstützt von der Erhitzung auf 95°, zur Denaturierung und Linealisierung der Proteine führt. Durch DTT im Lämmli-Puffer werden zusätzlich Disulfidbrücken aufgespalten.

Gelherstellung:

Es wurden Polyacrylamid-Gele mit einer Dicke von 1 mm genutzt. Im Sammelgel betrug die Acrylamidkonzentration 4% und im Trenngel 10%. Polyacrylamidgele wirken wie molekulare Siebe, wobei sich die Größe der Poren umgekehrt proportional zu der Konzentration der Acrylamidmonomere verhält (Rüchel et al., 1978). Das Gel entsteht durch radikalische Polymerisation unterstützt durch den Radikalstarter Amoniumperoxidsulfat und den Quervernetzungskatalysator TEMED (Tetramethylethylendiamin). Diskontinuierliche Gele bestehen aus einem Sammelgel mit einem neutralen pH-Wert und einem basischen Trenngel. Die Puffer enthalten Glycin, das bei neutralem pH-Wert teilweise eine positive Ladung aufweist, die bei der Wanderung zur Anode bremst, sodass das Glycin im Sammelgel hinter der Probe

wandert. Beim Übergang ins Trenngel mit basischem pH verliert Glycin seine positive Ladung und überholt die Proteine, was zu einem Stapelungseffekt an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel führt. Dies wiederum hat eine schärfere Trennung der Proteine zur Folge (Davis, 1964). Zum Gießen der Gels wurden zunächst Glasplatten und Abstandhalter mittels Isopropanol von Fett gereinigt. Dann wurde das Gel nach folgender Rezeptur hergestellt:

	Trenngel (10%)	Sammelgel (4%)
Trenngelpuffer (pH 8,8)	2,5 ml	-
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	-	1,25 ml
Destilliertes Wasser	5 ml	3,25 ml
Bisacrylamid (40%)	2,5 ml	0,5 ml
APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Nach dem Einfüllen des Trenngels in die Form wurden einige Tropfen Isopropanol dazugegeben, um den Rand zu glätten und das Gel vom Radikalfänger Sauerstoff abzuschließen. Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das Sammelgel nach Entfernung des Isopropanols mittels Filterpapier aufgegossen und ein Taschenkamm blasenfrei eingesteckt.

Gelelektrophorese:

Für die Elektrophorese wurde ein elektrisches Feld an die mit den denaturierten und linealisierten Proteinen beladenen Gele angelegt. Da alle Proteine unter dem Einfluss von SDS negativ geladen sind, kann die Ladung vernachlässigt werden. Die Proteine wandern entlang des elektrischen Feldes zur Anode, wobei die Strecke, die sie in einer bestimmten Zeit zurücklegen abhängig ist von der Größe der einzelnen Proteine. Je größer sie sind, desto schwerer durchdringen sie das Polyacrylamidgel. Zum Größenvergleich lief immer ein standardisierter Marker mit. Die angelegte Spannung betrug über 15 min 80 V zur Durchquerung des Sammelgels und anschließend über 1 h 130 V zur Durchquerung des Trenngels.

Western-Blot:

Die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte wie von Burnette und Renart et al. beschrieben mittels Western-Blot im Semi-Dry-Verfahren (Burnette, 1981; Renart et al., 1979). Dabei wurden zunächst die Membran und Filterpapiere mit Methanol- und SDS-haltigem Semi-Dry-Blotpuffer benetzt. Das Methanol als amphiphile Substanz dient dazu, die Hydrophobie der nur schwach polaren Nitrozellulose zu mindern. Die Nitrozellulosemembran wurde anodenseitig auf das Gel aufgelegt. Über und unter Gel und Membran befanden sich Filterpapiere und es wurde pro Gel eine Stromstärke von 0,3 A über anderthalb Stunden angelegt. Zur Kontrolle der erfolgreichen Übertragung und zum Vergleich der Proteinmengen in den einzelnen Spuren wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt. Bei Ponceau handelt es sich um einen Azofarbstoff, der die Aminogruppen der Proteine reversibel bindet und leicht wieder ausgewaschen werden kann. Anschließend wurde die Membran eine Stunde in einer 5%igen Trockenmilchpulverlösung gewaschen um unspezifische Bindungen abzusättigen. Hierbei wurde die Lösung mehrfach gewechselt. Die Patientenserum wurden in einer Verdünnung von 1:200 und die Liquores in 1:100-1:50 aufgetragen und über Nacht bei 4°C belassen. Danach erfolgte eine erneute Absättigung mit Milch über eine Stunde mit mehrmaligem Lösungswechsel. Daraufhin wurden die Blotstreifen in der Regel eine Stunde bei Raumtemperatur in den Sekundärantikörper gelegt. In einigen Fällen wurde der Sekundärantikörper über Nacht bei 4°C belassen. Als Sekundärantikörper verwandten wir zur Darstellung von gebundenem humanem IgG goat-a-human-kappa-light-chain IgG in der Verdünnung 1:4000 und für humanes IgA polyklonalen goat anti-IgA Antikörper, den wir 1:1000 einsetzten. Beide Antikörper sind an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Daraufhin wurden die Blots über 1,5 Stunden unter Einsatz von Urea zur Reduktion des Hintergrundes gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper wurde über eine Chemolumineszenzreaktion erbracht. Hierbei wird eine Luminol-haltige ECL-Lösung auf die Blots gegeben, die bei Kontakt mit Meerrettich-Peroxidase oxidiert wird. In diesem oxidierten Zustand werden Photonen emittiert, mit denen Foto-Film (GE Healthcare, Chicago, USA) belichtet wird. Die Entwicklung des Films erfolgte in einer Maschine vom Typ Cura 60 der Firma AGFA.

3.2.6 Statistik:

Die Altersdifferenz zwischen Patienten und Kontrollen innerhalb der Demenzkohorte wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests auf statistische Signifikanz untersucht. Dieser Test wurde ausgewählt, da er sich für unverbundene, nicht normal verteilte Variablen eignet. Zur Überprüfung eines signifikanten Unterschiedes zwischen Patienten und Kontrollen bezüglich des Geschlechts und des Antikörperstatus wurde der Exakte Test nach Fisher verwendet. Die statistischen Tests wurden mit der Software SPSS ausgeführt.

3.2.7 Tierschutzrichtlinien und gute wissenschaftliche Praxis:

Bei der Verfassung der vorliegenden Arbeit wurde die Satzung der Charité zur guten wissenschaftlichen Praxis stets beachtet. Die Durchführung von Tierexperimenten erfolgte nicht über das erforderliche Maß hinaus und die Tierschutzrichtlinien wurden dabei befolgt.

4. Ergebnisse:

4.1 Antikörper gegen Synapsin-Domänen

4.1.1 Patienten und Spezifität der exprimierten Konstrukte

Es wurden achtzehn Serum- und zwei Liquorproben, die, wie vorher gezeigt, IgG- und in einem Fall auch IgA-Antikörper gegen Synapsin I enthalten (Höltje et al., 2017), analysiert, um diese Antikörper näher zu charakterisieren. Sechzehn der Serumproben stammten von Patienten, die zwischen 2011 und 2012 in der St. Olaf Universitätsklinik Trondheim, Norwegen mit unterschiedlichen Diagnosen psychiatrisch aufgenommen wurden. Einzelheiten zu den Patienten sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Zusätzlich standen Serum- und Liquorproben von unserem Indexpatienten (Piepgras et al., 2015) und von einer Patientin mit Clinical Isolated Syndrome (CIS), die beide in der Charité behandelt wurden, zur Verfügung. Darüber hinaus wurde Serum von neun gesunden Kontrollen und fünf Kontrollliquores analysiert. Die Charakterisierung der Antikörper auf Epitopspezifität wurde mittels Zell-basiertem Assay vorgenommen. Hierzu wurden HEK-Zellen mit Plasmiden transfiziert, die für sechs unterschiedliche Synapsin I-Fragmente kodieren: Das C-terminale ABC-Fragment (Aminosäuren 1-30), das BC-Fragment (Aminosäuren 31-416) die C-Domäne (Aminosäure 113-420), das DE-Fragment (Aminosäure 415-704), die D-Domäne (Aminosäure 414-651) und die E-Domäne (Aminosäure 655-704). Die Plasmide wurden konstruiert wie vorbeschrieben (Gitler et al., 2004b). Die Fragmente kodieren für Ratten-Synapsin Ia, das humanem Synapsin Ia zu 95 % homolog ist (Südhof, 1990). Nach Inkubation über 24 Stunden war die erfolgreiche Expression der transfizierten Konstrukte unter dem Mikroskop deutlich an der Fluoreszenzmarkierung zu erkennen. Zusätzlich reagierten die transfizierten Zellen mit Antikörpern, die für die entsprechenden Domänen spezifisch sind (s. Abb 2). Das spricht für eine erfolgreiche Expression und spezifische Erkennung der Konstrukte und lässt die Methode insgesamt für die Überprüfung der Patientenproben geeignet erscheinen.

Tabelle 1

Patient	Alter	Geschlecht	Titer rat-Synapsin	Diagnosen	Befunde	konkretisierend aufretende Antikörper
N12	29	f	1:320	Bipolare Störung vom Typ 1, gemischte Episode	cMRT: normal (6 Monate nach Aufnahme); EEG: normal	-
N32	20	f	1:320	Bipolar Störung vom Typ 2, depressive Episode	keine	-
N45	32	f	1:1000	Persistierende Persönlichkeitsveränderung nach katastrophalem Erlebnis	keine	NMDAR IgM (1:10)
N68	52	f	1:10.000	Rezidivierende depressive Störung, schwere depressive Episode; Koma für 12 Tage im Alter von 8 Jahren nach einem Unfall	cMRT: partielle Agenesie des Corpus callosum, keine weiteren Auffälligkeiten; EEG: normal	NMDAR IgA (1:10)
N82	26	m	1:320	Akute polymorphe psychotische, Möbius Syndrom	cCT: normal; EEG: normal	NMDAR IgM (1:100)
N94	39	m	1:100.000	Alkoholabusus, ADHS, Bipolare Störung Typ 2, emotional instabile Persönlichkeitsstörung	cCT: normal (4 Monate vor Aufnahme)	GAD IgG (1:100)
N141	21	f	1:1000	Alkoholabhängigkeit, ADHS, PTSD, Zwangsgedanken, Zwangshandlungen	cMRT (3 Jahre nach Probenentnahme): normal; CSF (3 Jahre nach Probenentnahme): normal; EEG: normal	-
N149	51	m	1:100.000	Bipolare Störung Typ 1, manische Episode, Alkoholabhängigkeit, Hepatitis C	keine	beta-2-glycoprotein-IgG; cardiolipin-IgG
N171	22	f	1:32.000	Moderate depressiv Episode; SLE	keine	-
N183	31	f	1:3200	Rezidivierende depressive Störung, moderate Episode, Persönlichkeitsstörung	keine	-

Tabelle 1

Patient	Alter	Geschlecht	Titer rat-Synapsin	Diagnosen	Befunde	konkomitierend auftretende Antikörper
N185a	58	f	1:1000	Bipolare Störung Typ 1, manische Episode mit psychotischen Symptomen, MS, später diagnostizierte organische affektive Störung	cMRT: MS Läsionen; EEG: normal	
N185b	68	m	1:320	Bipolare Störung Typ 1, manische Episode, paranoide Psychose	cMRT: normal; Verlaufskontrolle cMRT: 4 Jahre später: leichte Hippocampusatrophie	-
N189	77	f	1:320.000	Rezidivierende depressive Störung	cMRT: alte Infarkte, chronische vaskuläre Läsionen -> Leukenzephalopathie? (1 Monat vor Aufnahme)	-
N201	44	f	1:1000	Rezidivierende depressive Störung, moderate Episode; Alkoholabhängigkeit; Epileptische Anfälle in der Kindheit; mögliche Hypoxie bei Geburt	keine	-
N203	27	m	1:320	Paranoide Schizophrenie, Polytoxikomanie	cMRT: normal (4 Monate nach Aufnahme); EEG: normal (2 Monate nach Aufnahme)	NMDAR IgA (1:10)
N204	60	m	1:1000	Rezidivierende depressive Störung, milde Episode, Cannabissubusus, Melanom, Hepatitis C, Psoriasis	keine	NMDAR IgM(1:32)
Cis 117	24	f	1:10.000	Clinically isolated Syndrome	cMRT: MS Läsionen; CSF: 14 cells/ml, positive OKBs	-

Tabelle 1:

Klinische und demo-graphische Patientendaten

Die anti-rat-Synapsin-Ia-Titer ebenso wie Diagnosen und paraklinische Befunde sind der Tabelle zu entnehmen, in Anlehnung an bereits publizierte Daten (Höltje et al., 2017).

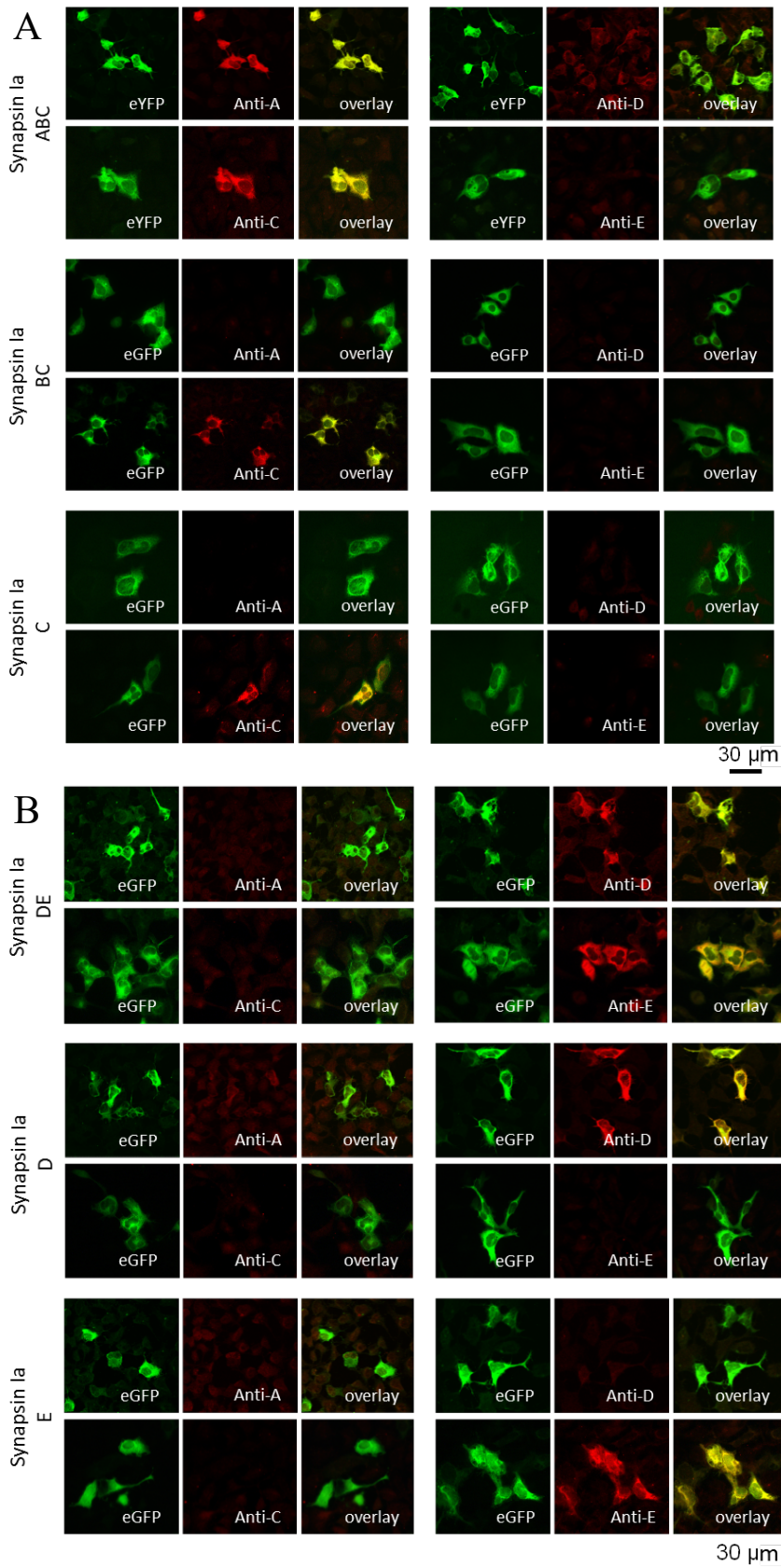


Abb. 2:
Spezifität der exprimierten Konstrukte

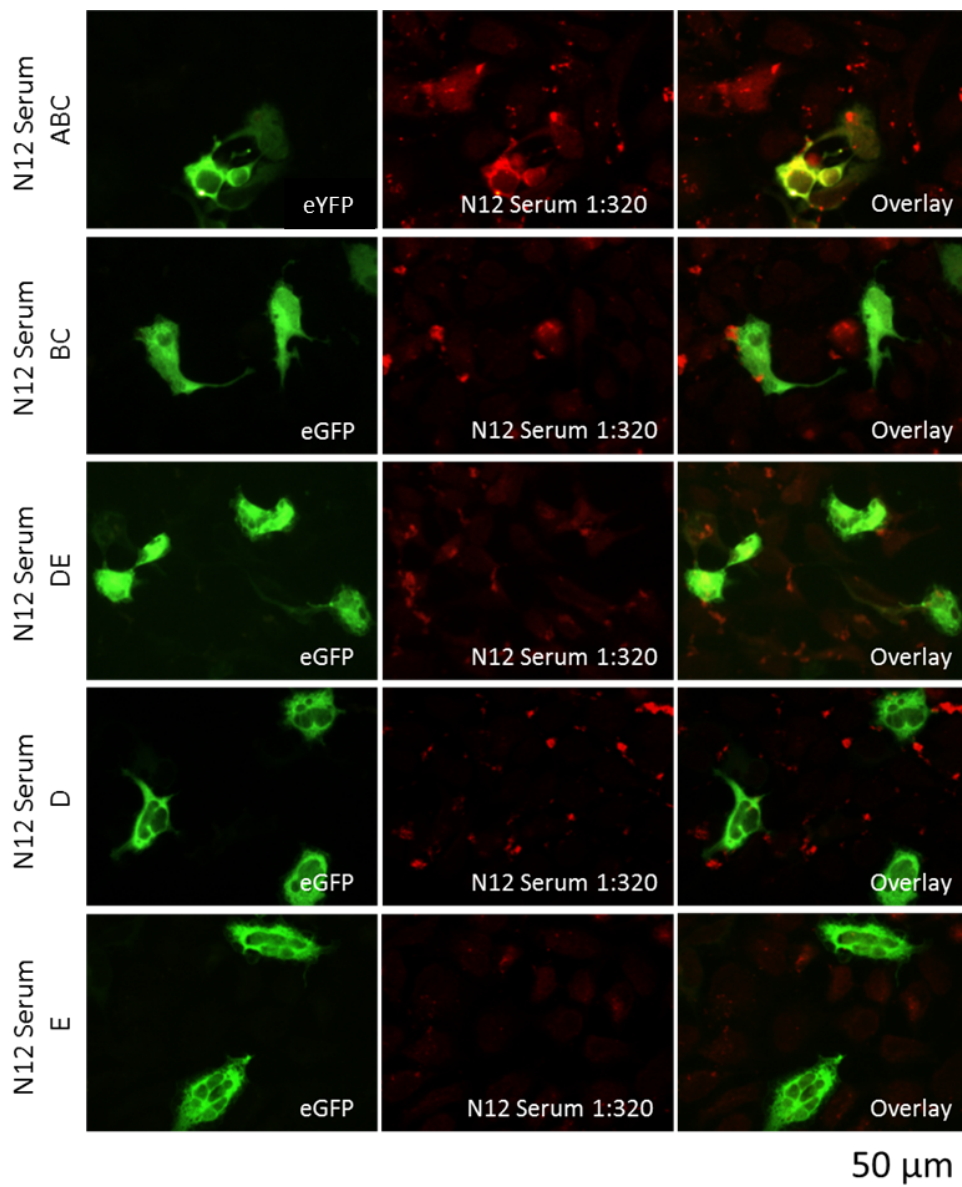
HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden über Nacht mit Antikörpern gegen die A-, C-, D- und E-Domäne inkubiert und mit Sekundärantikörpern gegen Hasen- (anti-A, -C und -E) bzw. Maus-IgG (Anti-D) visualisiert. Dabei wurden anti-E in einer Verdünnung von 1:200 und alle anderen Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:500 eingesetzt. (Mertens et al., 2018)

A: Auf ABC-exprimierende Zellen reagieren anti-A und anti-C Antikörper positiv, auf BC- und C-exprimierende Zellen reagiert der anti-C Antikörper positiv. Anti-D und anti-E Antikörper reagieren mit keinem der Konstrukte positiv.

B: Auf DE-exprimierende Zellen reagieren anti-D und anti-E Antikörper positiv, auf D-exprimierende Zellen reagieren anti-D Antikörper und auf E-exprimierende Zellen anti-E Antikörper positiv. Anti-A und Anti-C Antikörper reagieren mit keinem der Konstrukte positiv.

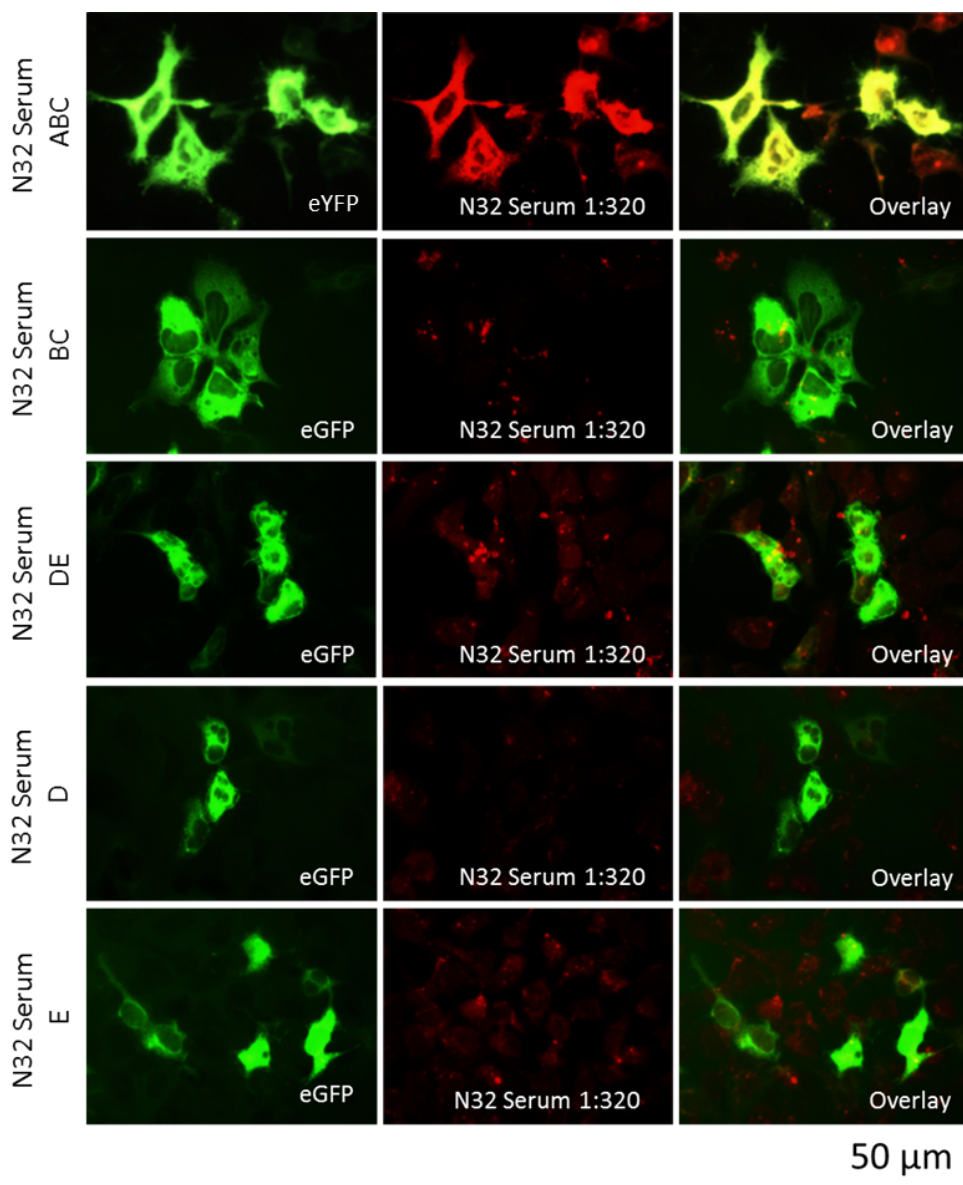
4.1.2 Auftreten einer IgG vermittelten Immunreaktivität gegen die A-Domäne von Synapsin Ia

Von den achtzehn Synapsin-positiven Seren konnte bei zwölf Seren eine Immunaktivität gegen die Fragmente festgestellt werden. Sechs (33% in Bezug auf die Gesamtheit der untersuchten achtzehn Proben) Seren reagierten ausschließlich mit dem ABC-Fragment und waren negativ für alle anderen Konstrukte, auch BC und C, sodass für diese Fälle eine A-Reaktivität angenommen werden kann. Nur bei einer Probe war eine positive Reaktion mit dem BC-Fragment und bei keiner der Proben eine Reaktion mit der C-Domäne zu detektieren (nicht gezeigt). In den folgenden Abbildungen 3-8 werden die individuellen Färbemuster der Patienten mit einer Reaktivität gegen die A-Domäne gezeigt.

**Abb. 3:**

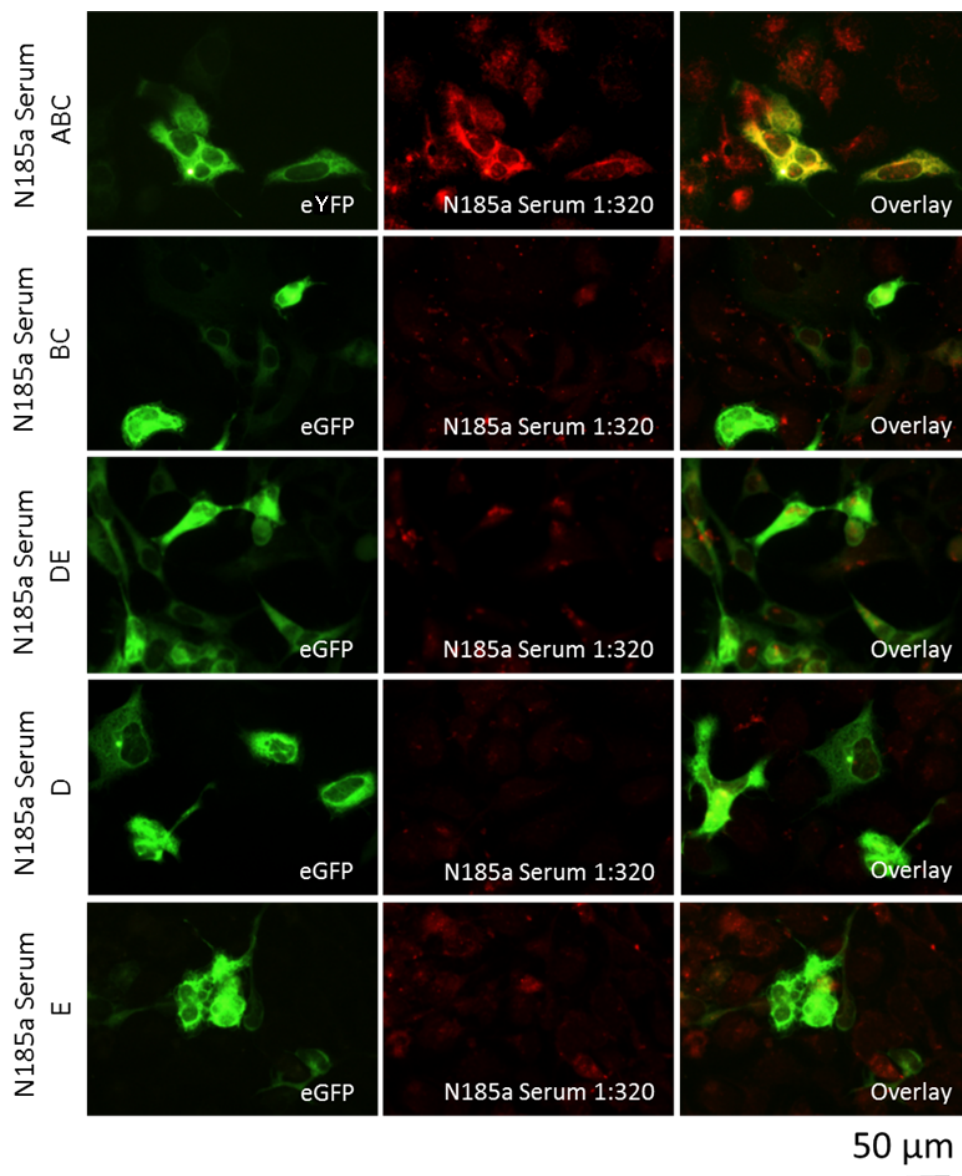
Das Serum von Patient N12 mit Bipolarer Störung reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N12 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin.

**Abb. 4:**

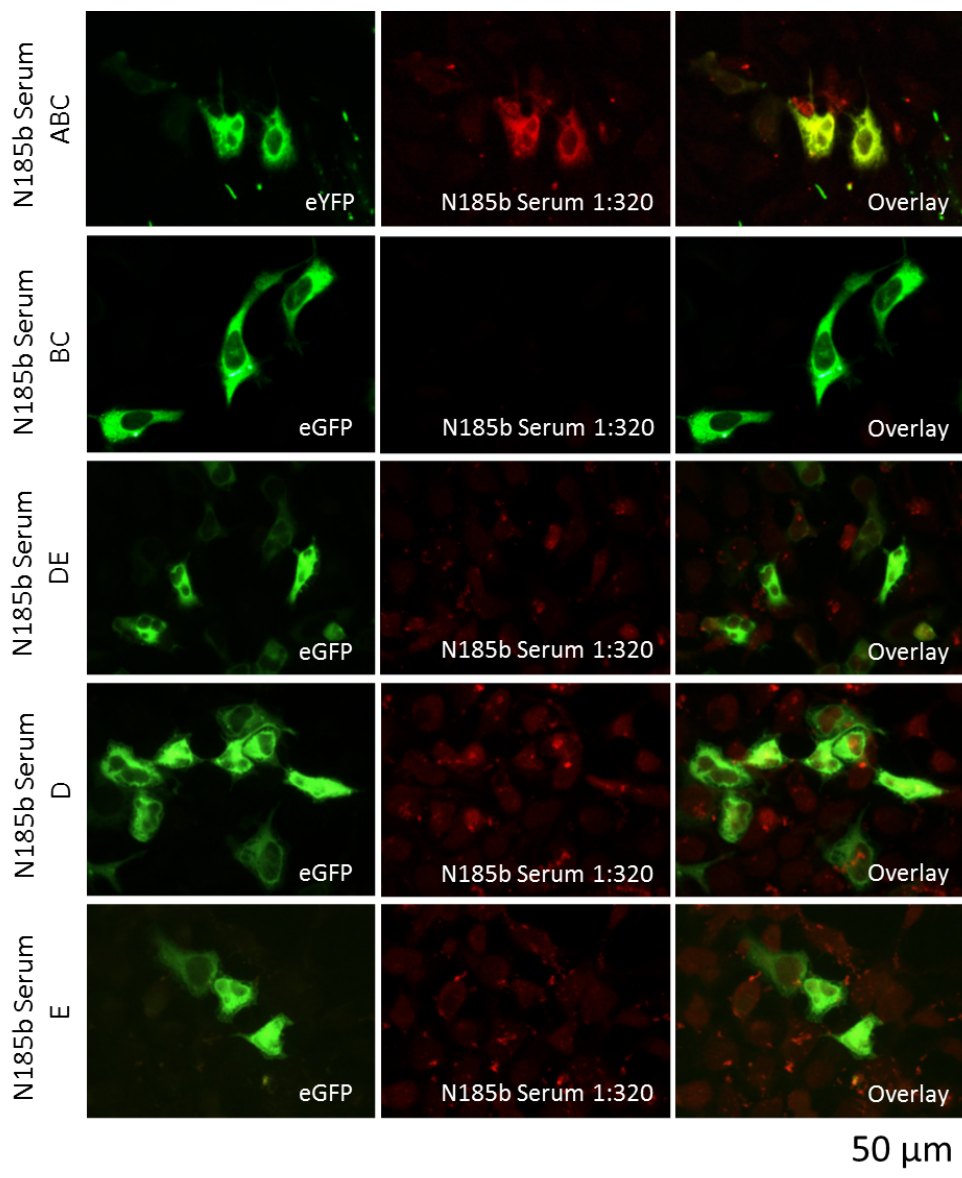
Das Serum von Patient N32 mit bipolarer Störung reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die Fluoreszenz der mit ABC transfizierten Zellen wurde durch die Zugabe eines anti-GFP-Antikörpers verstärkt, der mit eYFP kreuzreagiert. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N32 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin.

**Abb. 5:**

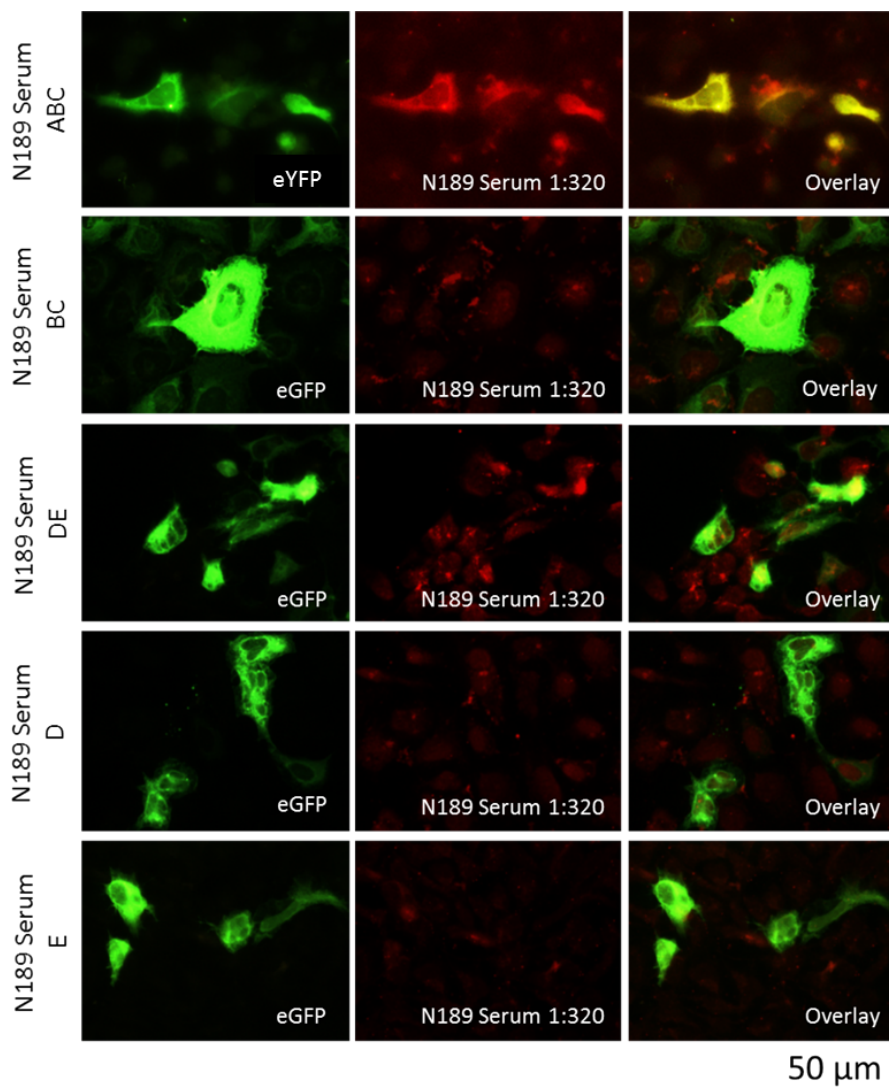
Das Serum von Patient N185a mit bipolarer Störung reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N185a (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin.

**Abb. 6:**

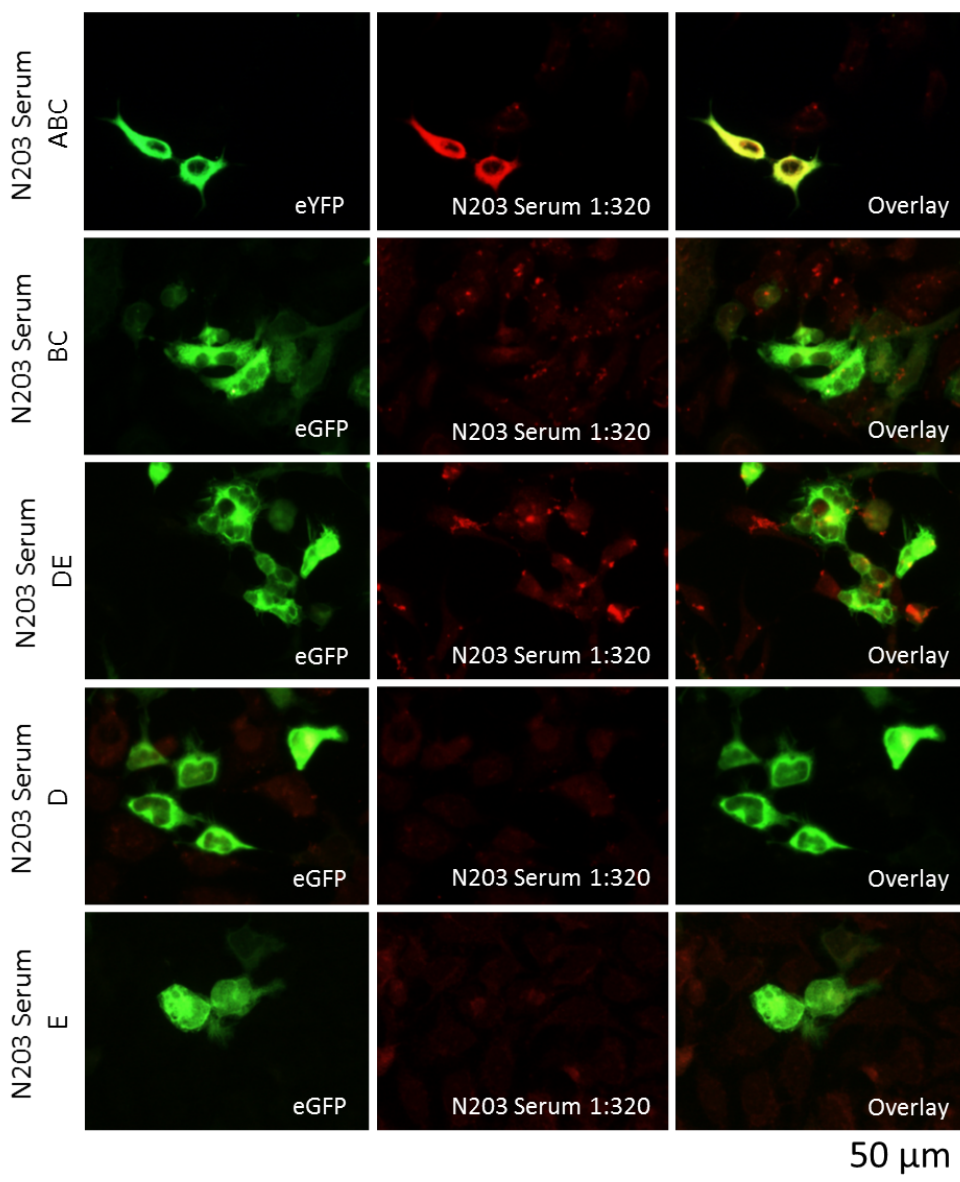
Das Serum von Patient N185b mit bipolarer Störung reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N185b (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin. (Mertens et al., 2018)

**Abb. 7:**

Das Serum von Patient N189 mit rezidivierender depressiver Störung reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N189 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin.

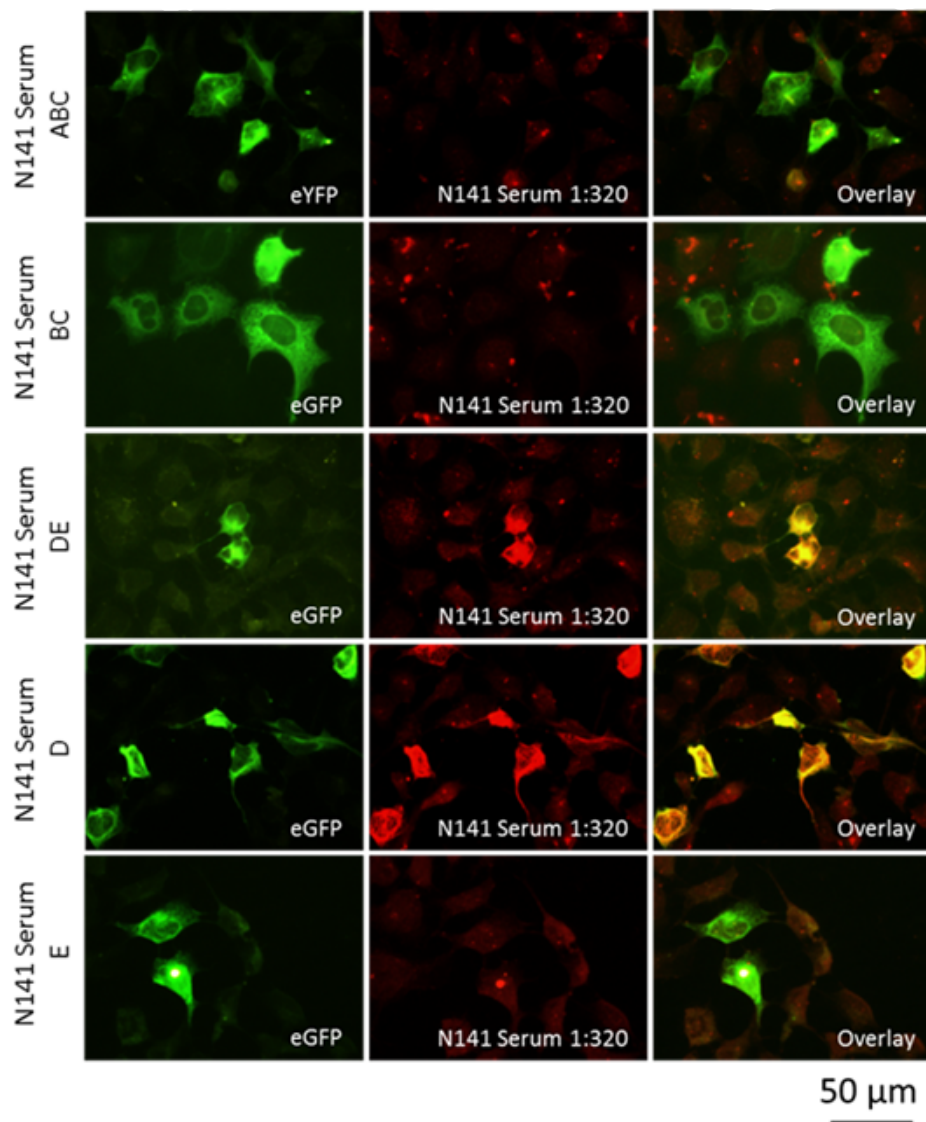
**Abb. 8:**

Das Serum von Patient N203 mit paranoider Schizophrenie reagiert positiv mit dem ABC-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die Fluoreszenz der mit ABC transfizierten Zellen wurde durch die Zugabe eines anti-GFP-Antikörpers verstärkt, der mit eYFP kreuzreagiert. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N203 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP Signal der mit dem ABC-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eGFP Signal des BC-Fragments, des DE-Fragments und der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die A-Domäne hin.

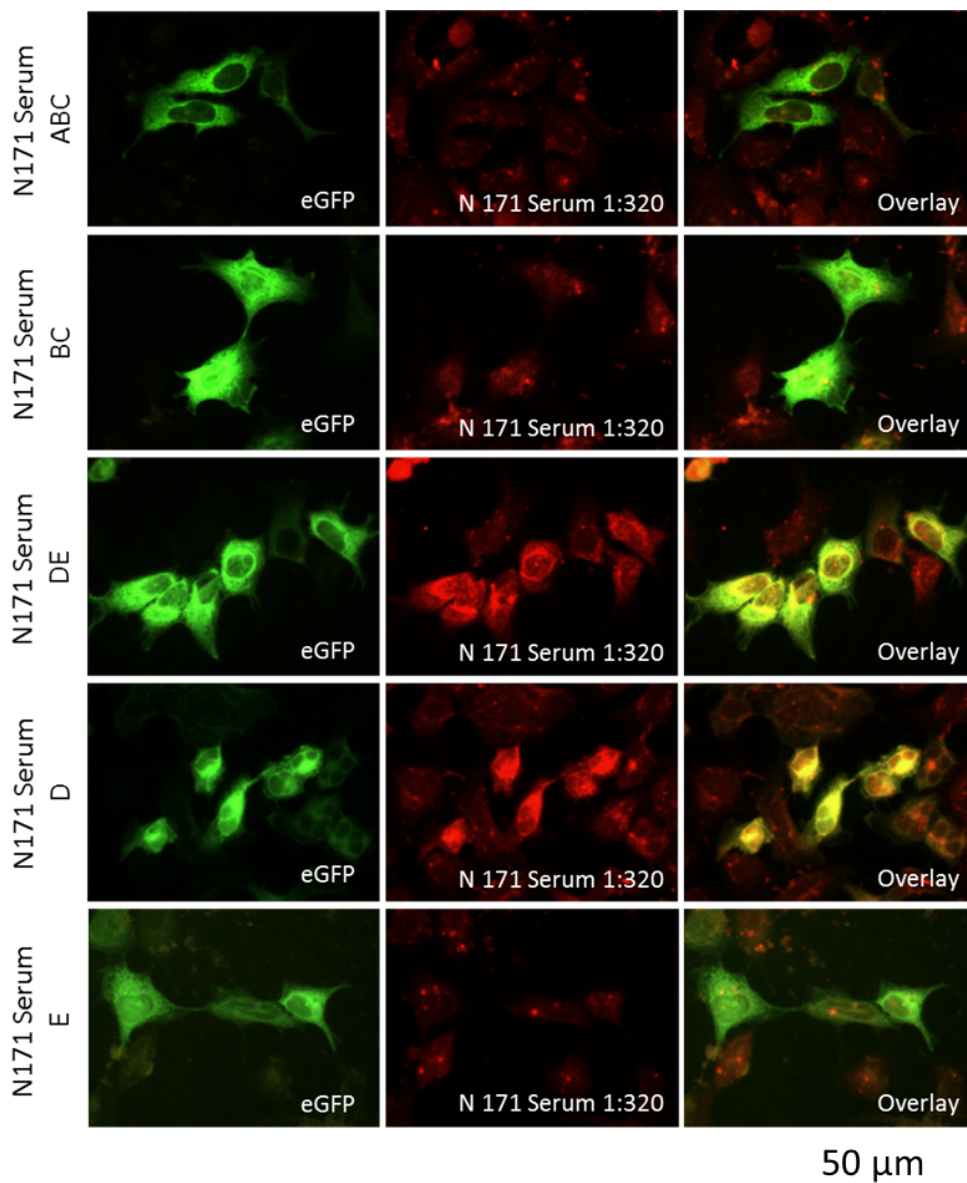
4.1.3 Auftreten einer IgG-vermittelten Immunreaktivität gegen die D-Domäne von Synapsin Ia.

Nach der Vorstellung der Färbungsmuster der gegen die A-Domäne gerichteten Antikörper erfolgt nun die Vorstellung der Patienten, die hinsichtlich der Epitopspezifität der anti-Synapsin Antikörper auf eine Reaktivität mit der D-Domäne hinweisen. Vier Seren und ein Serum-Liquor-Paar zeigten eine IgG-Reaktivität auf die D-Domäne oder das Konstrukt aus D und E. Zwei Seren und das Serum-Liquor-Paar waren positiv für die D-Domäne und das DE-Konstrukt. Ein Serum war nur für die D-Domäne positiv und ein Serum nur für das DE-Konstrukt. Keine Probe reagierte mit der E-Domäne. Dies deutet darauf hin, dass am ehesten die D-Domäne als Antigen wirkt. Die individuellen Färbemuster werden in den nun folgenden Abbildungen 9-14 dargestellt.

**Abb. 9:**

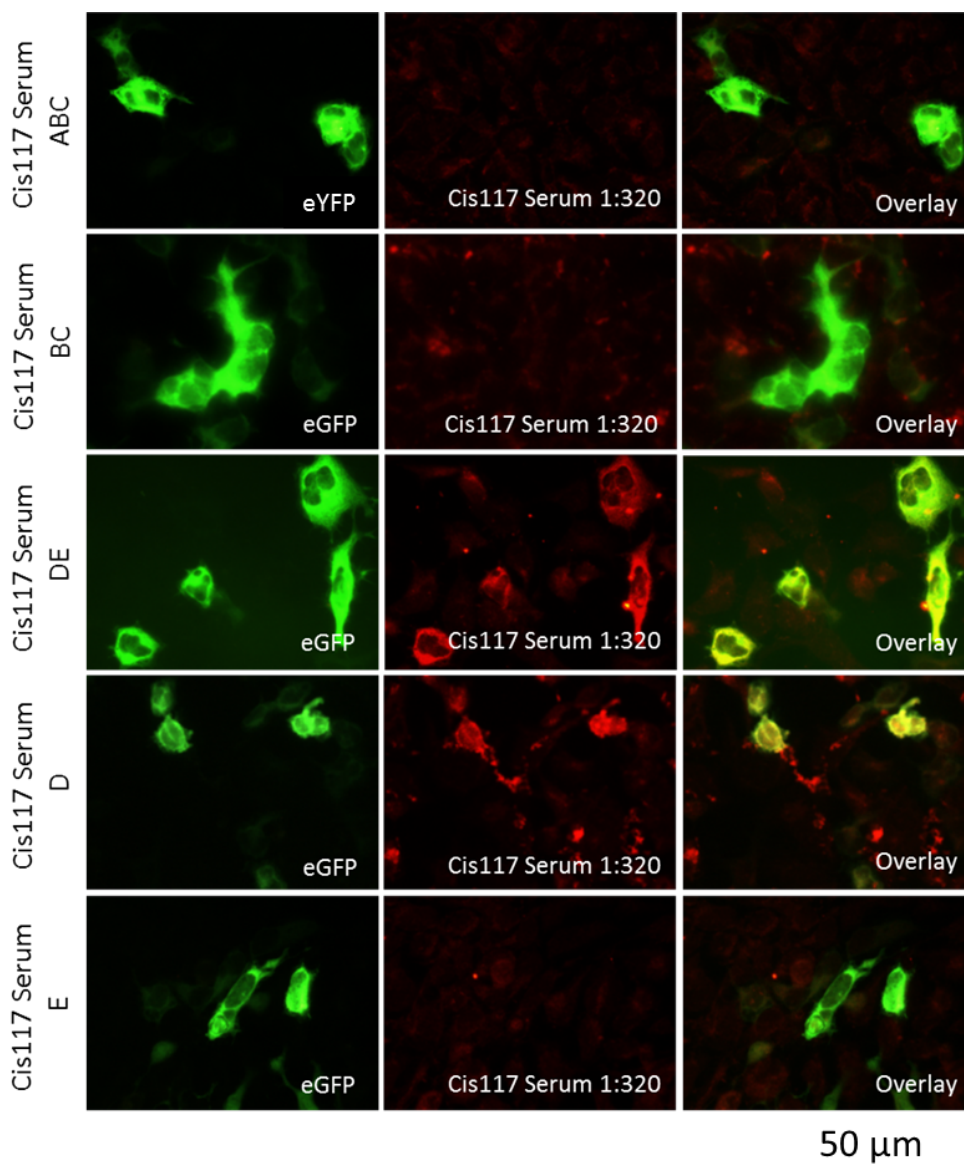
Das Serum von Patient N141 mit Posttraumatischer Belastungsstörung und Alkoholabhängigkeit reagiert positiv mit der D-Domäne und dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N141 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin.

**Abb. 10:**

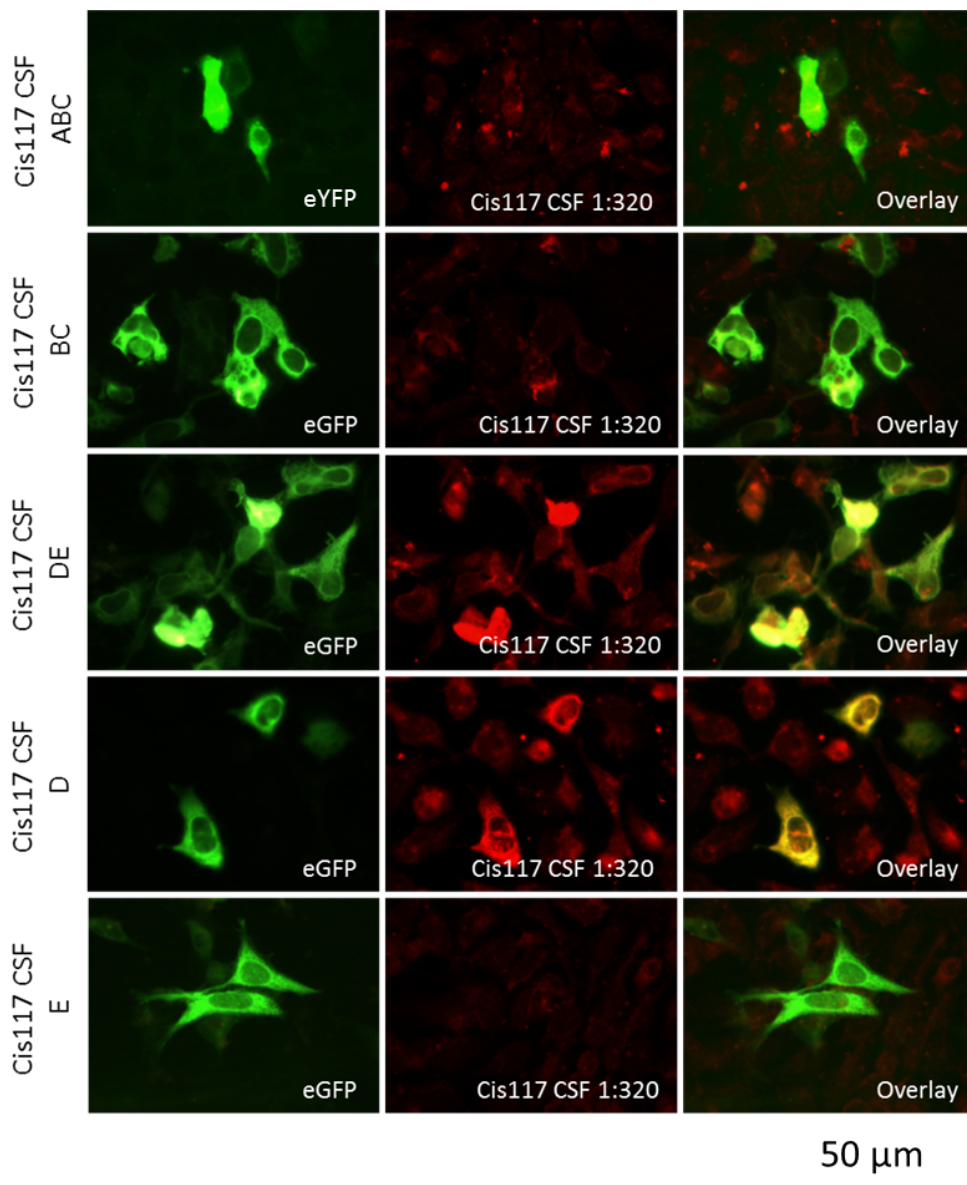
Das Serum von Patient N171 mit moderater depressiver Episode reagiert positiv mit der D-Domäne und dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N171 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin.

**Abb. 11:**

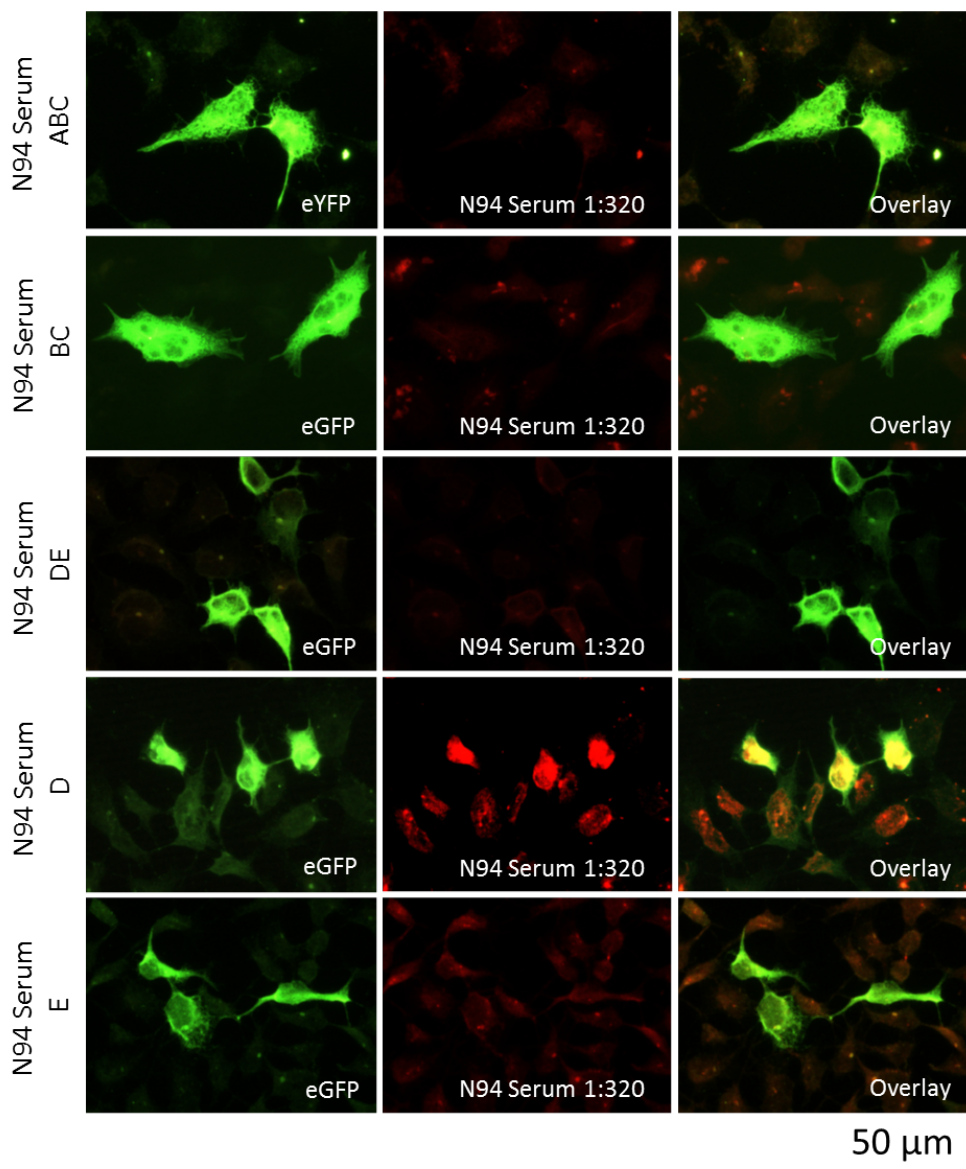
Das Serum von Patient CIS117 mit Klinisch Isoliertem Syndrom reagiert positiv mit der D-Domäne Und dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient CIS117 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin.

**Abb. 12:**

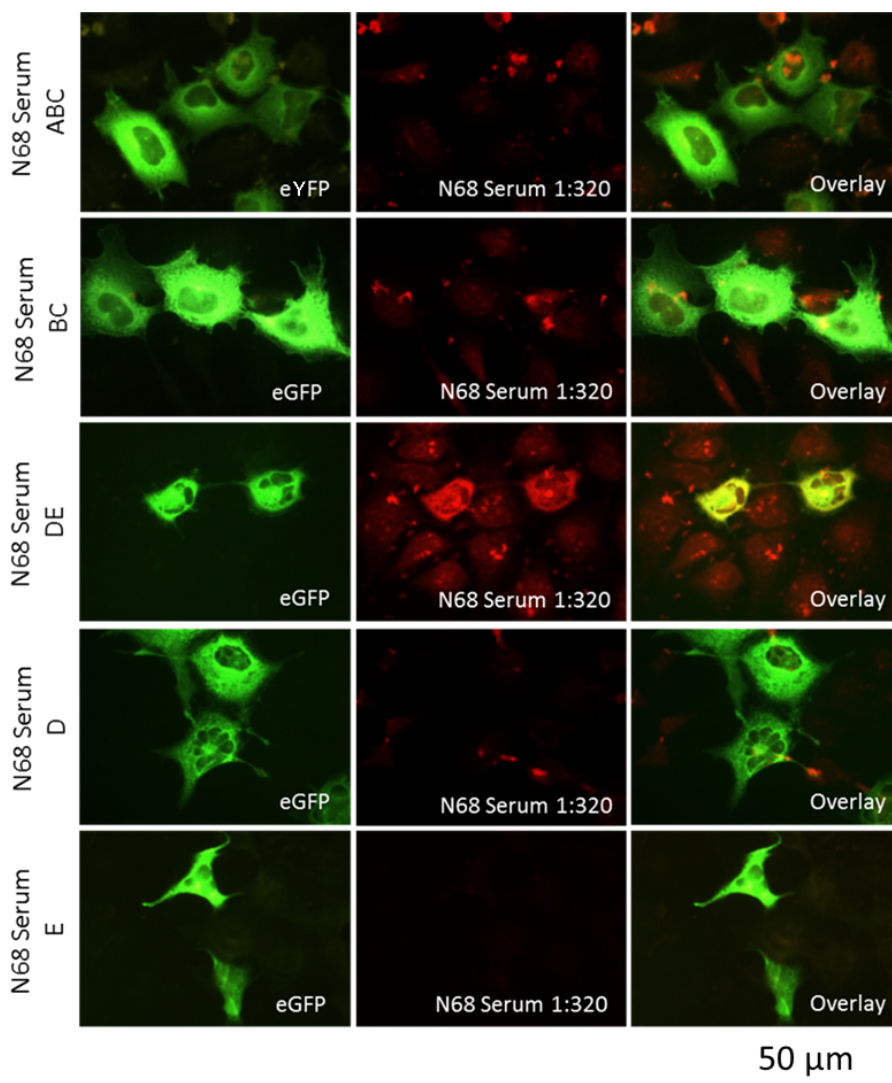
Der Liquor von Patient CIS117 mit Klinisch Isoliertem Syndrom reagiert positiv mit der D-Domäne und dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Liquor von Patient CIS117 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Liquor enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin.

**Abb. 13:**

Das Serum von Patient N94 bipolarer Störung und Alkoholabusus reagiert positiv mit der D-Domäne

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die Fluoreszenz der transfizierten Zellen ist mit einem Anti-GFP-Antikörper verstärkt, der auch mit eYFP kreuzreagiert. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N94 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC-, BC- und DE-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin.

**Abb. 14:**

Das Serum von Patient N68 rezidivierender depressiver Störung reagiert positiv mit dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N68 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der D- oder E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für das DE-Fragment hin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass von achtzehn untersuchten Patienten fünf (27,8 %) IgG mit D-Reaktivität aufwiesen. Die Domänenspezifität des Serum-Liquor-Paares (Patient CIS 117) stimmte in der Reaktivität gegen die D-Domäne überein.

4.1.4 Auftreten einer IgG-vermittelten Immunreaktivität gegenüber mehrerer Synapsin Ia Domänen

Eine Serumprobe war positiv für die Konstrukte ABC, BC, DE, D und E (s. Abb 15). Die isolierte C-Domäne wurde, wie bei allen anderen Proben, nicht von den Patientenantikörpern erkannt (nicht gezeigt).

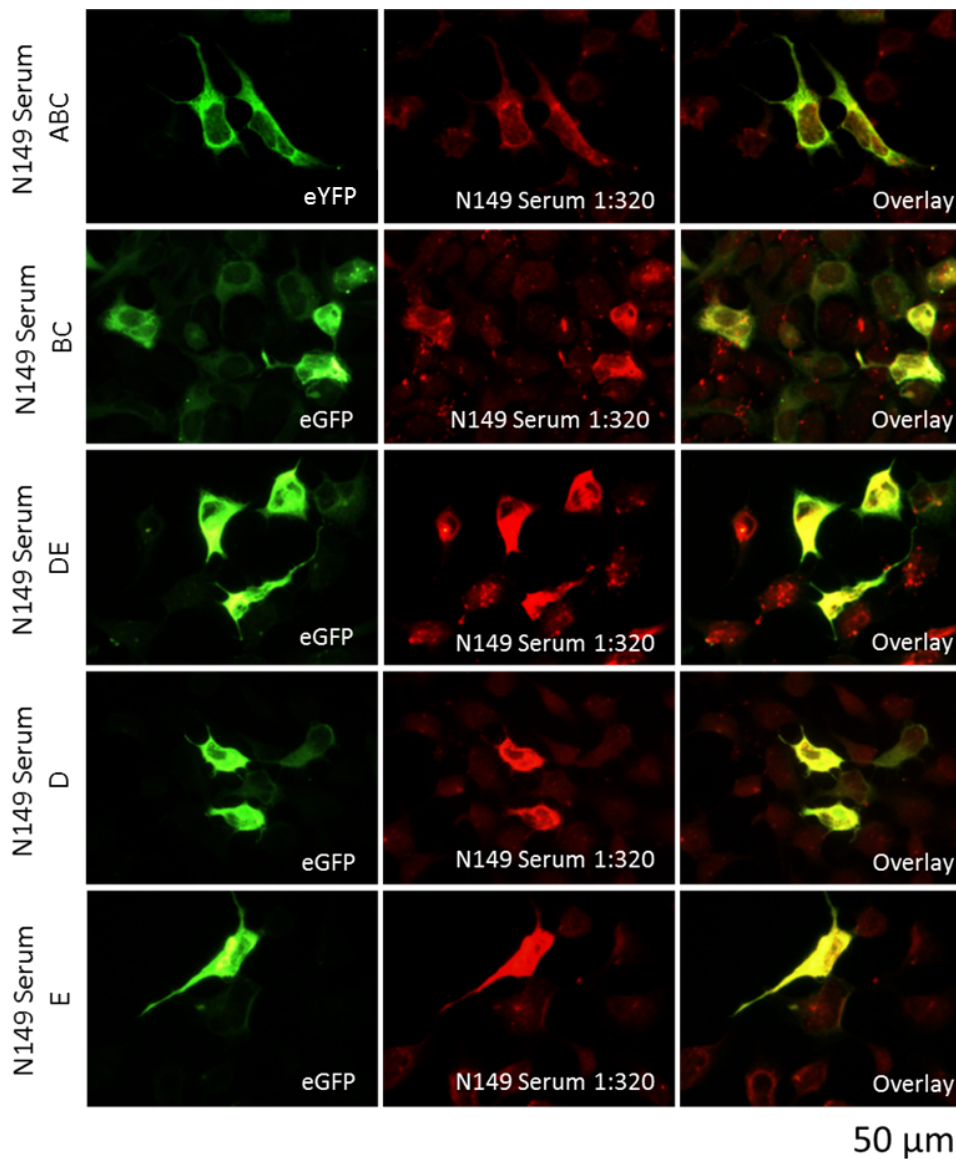


Abb. 15:

Das Serum von Patient N149 mit bipolarer Störung reagiert positiv mit allen Fragmenten

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N149 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist kolokalisiert mit dem eYFP/eGFP Signal aller Fragmente.

4.1.5 Fehlende IgG-vermittelte Immunreaktivität gegenüber Synapsin Konstrukten in Patienten mit Antikörpern gegen full-length Synapsin

Für 5 Seren (27,8%), die positiv auf IgG-Antikörper gegen das Gesamtprotein Synapsin la testeten, konnte keine Reaktion gegen eines der transfizierten Synapsin Fragmente nachgewiesen werden. Dies wird exemplarisch anhand eines Patienten in Abbildung 16 dargestellt.

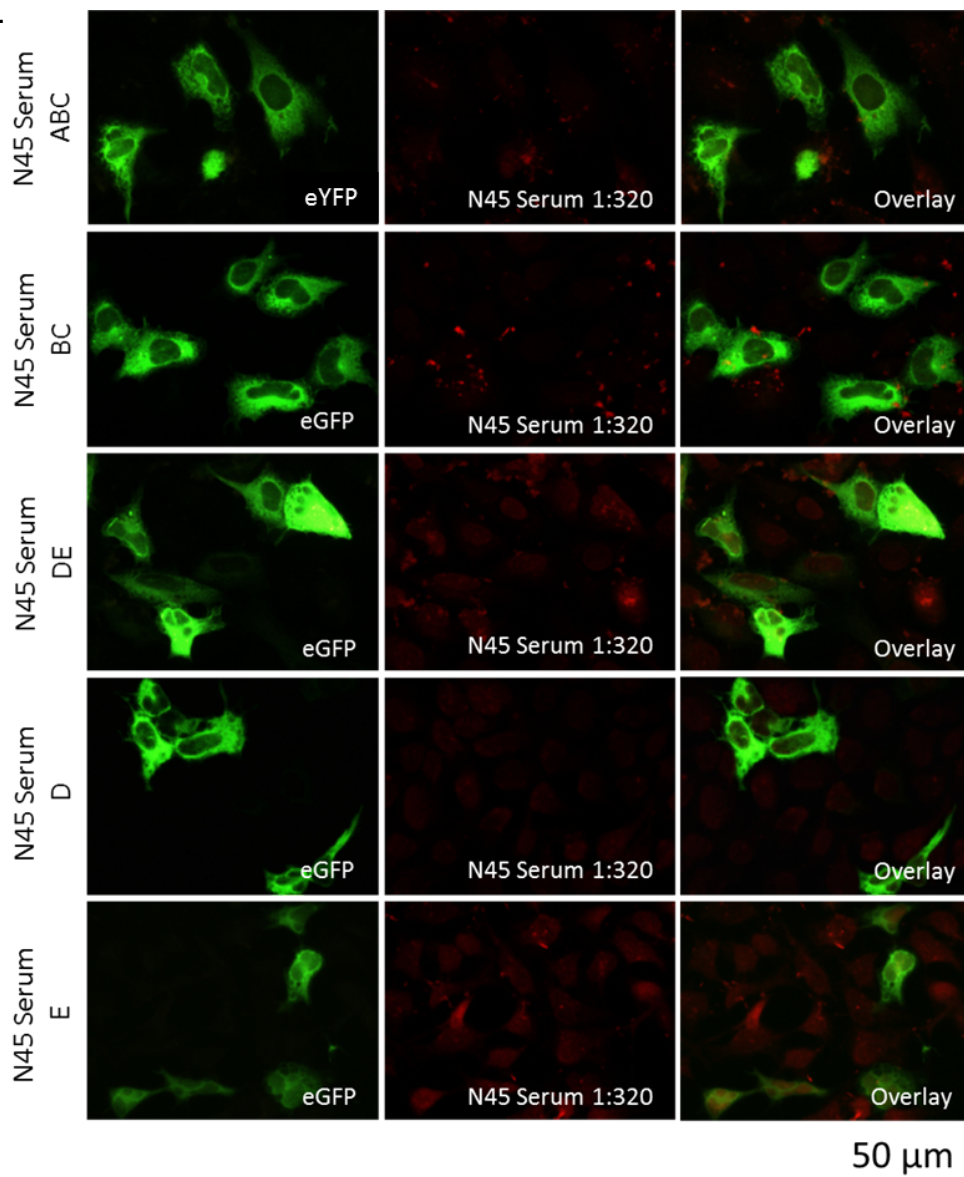


Abb. 16:

Das Serum von Patient N45 mit persistierender Persönlichkeitsveränderung nach katastrophaler Erfahrung reagiert mit keinem der Konstrukte

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von Patient N45 (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist mit dem eYFP/eGFP-Signal keiner der Konstrukte kolokalisiert. Trotz der positiven Reaktion auf full length Synapsin sind die Antikörper im Serum dieses Patienten positiv auf keines der Teilstücke.

4.1.6 Nachweis von IgA Antikörpern gegen die D-Domäne und das DE-Fragment von Synapsin Ia im Liquor und Serum des Indexpatienten

Bei dem Indexpatienten mit limbischer Enzephalitis wurden im Immunblot und im Zellbasierten Assay Antikörper vom IgA- und IgG-Typ gegen full-length-Synapsin festgestellt (Piepgras et al., 2015). Es konnte jedoch kein gegen einzelne Domänen gerichtetes IgG nachgewiesen werden. Sowohl der Liquor als auch das Serum des Indexpatienten testete jedoch positiv für Antikörper vom IgA-Typ gegen die D-Domäne und das DE-Fragment (s. Abb. 17 und 18).

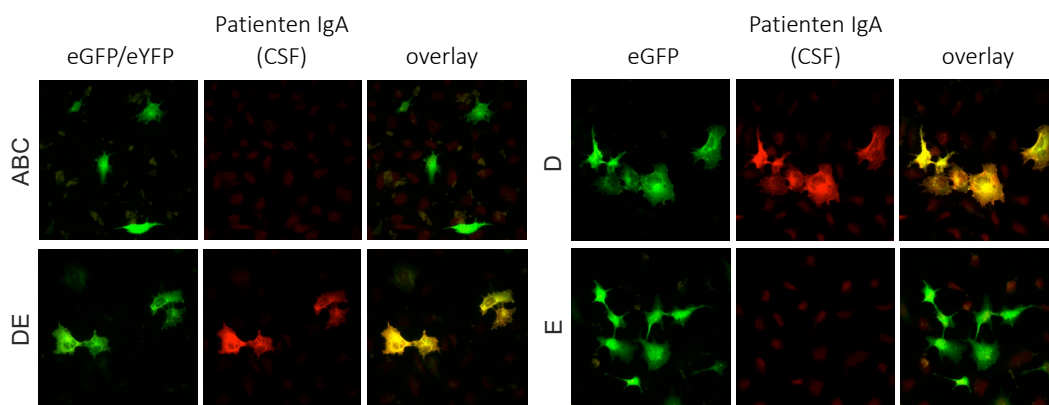
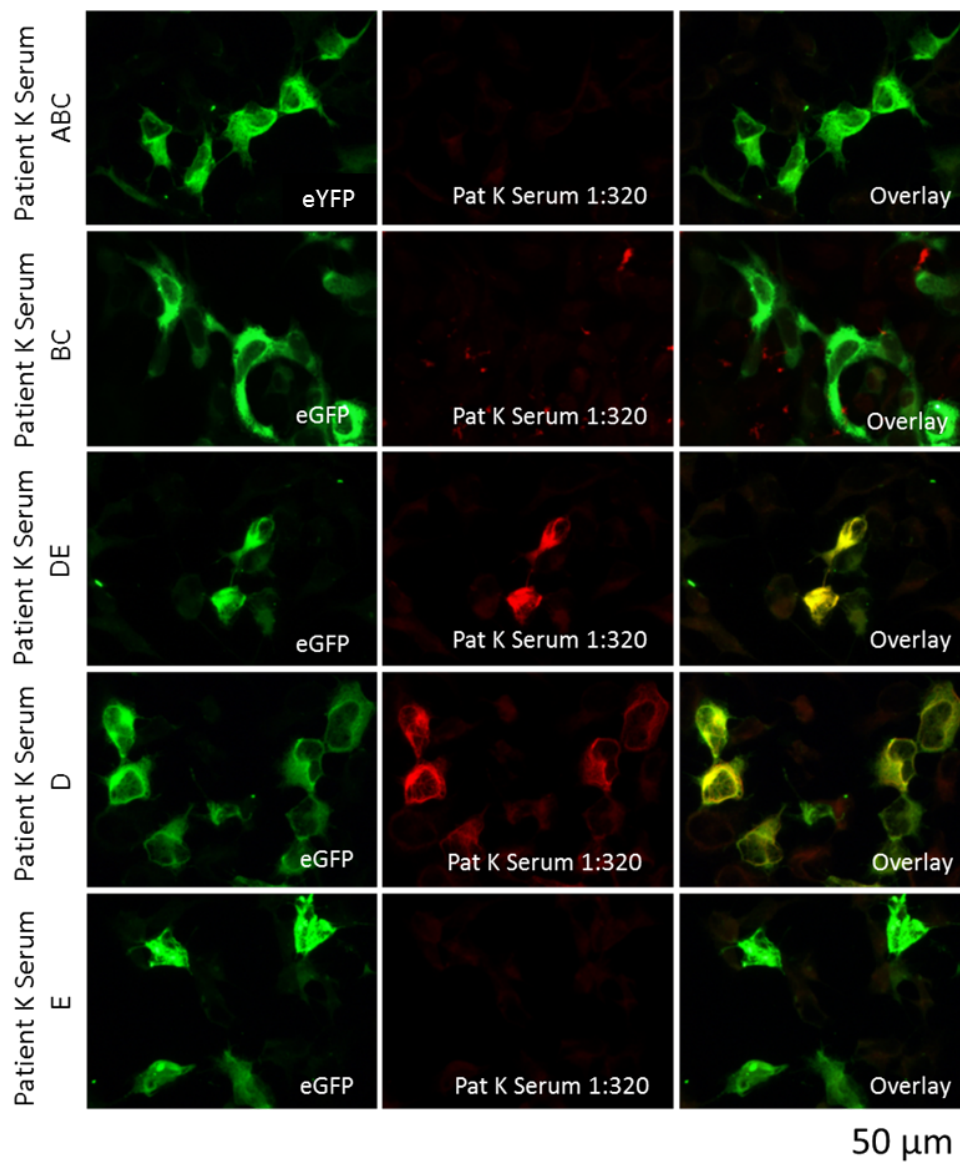


Abb. 17:

Der Liquor des Indexpatienten mit limbischer Enzephalitis enthält IgA-Antikörper gegen die D-Domäne und das DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Liquor des Indexpatienten (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgA anschließend mittels Texas red anti-human IgA detektiert. Das Signal von gebundenem IgA ist kolokalisiert mit dem eGFP Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal des ABC-Fragments, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Liquor enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin (Mertens et al., 2018).

**Abb. 18:**

Das Serum des Indexpatienten mit limbischer Enzephalitis enthält IgA-Antikörper gegen die D-Domäne und das DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Fragmenten transfiziert, fixiert und mit Triton X-100 permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum des Indexpatienten (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgA anschließend mittels Texas-red anti-human IgA detektiert. Das Signal von gebundenem IgA ist kolokalisiert mit dem eGFP-Signal der mit dem DE-Fragment und der mit der D-Domäne transfizierten Zellen, jedoch nicht mit dem eYFP/eGFP Signal der ABC- und BC-Fragmente, sowie dem eGFP Signal der E-Domäne. Dies deutet auf eine Epitopspezifität der im Serum enthaltenen Antikörper für die D-Domäne hin (Mertens et al., 2018).

4.1.7 Gesunde Kontrollen weisen keine Antikörper gegen die verschiedenen Synapsin Ia Konstrukte auf

Als Kontrollgruppe wurden die Seren von 9 gesunden Personen hinsichtlich einer Reaktivität gegen die beschriebenen Synapsin Ia Konstrukte untersucht. Weiterhin wurden die Liquores von 2 Kontrollpersonen analysiert. Die Untersuchungen ergaben für keine der Proben ein positives Testergebnis hinsichtlich einer IgG oder IgA Reaktivität gegen eines der Konstrukte. Im Nachfolgend wird eine exemplarische Darstellung an Hand einer Serum-Kontrolle auf IgG und einer Liquor-Kontrolle auf IgA und IgG, Abb. 19 und 20 gezeigt.

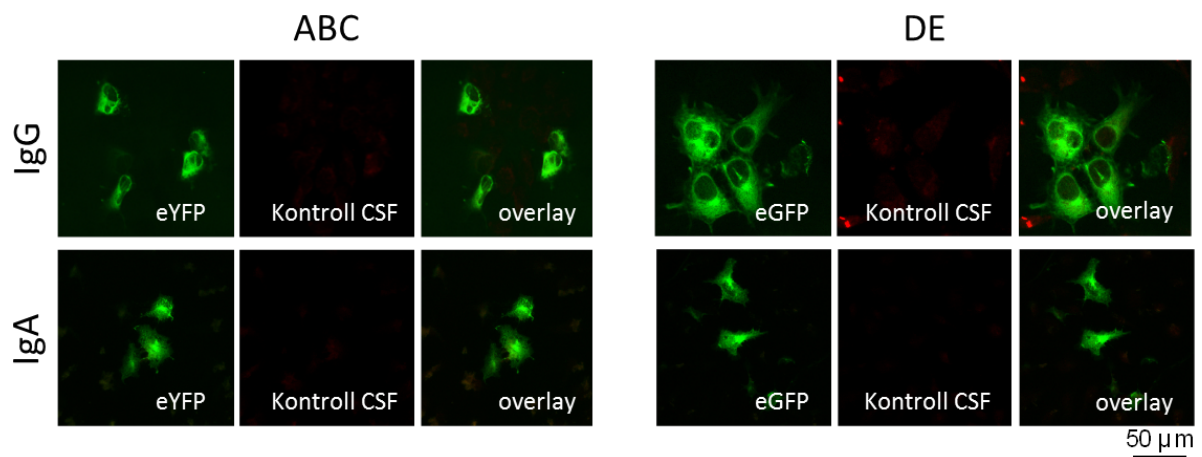
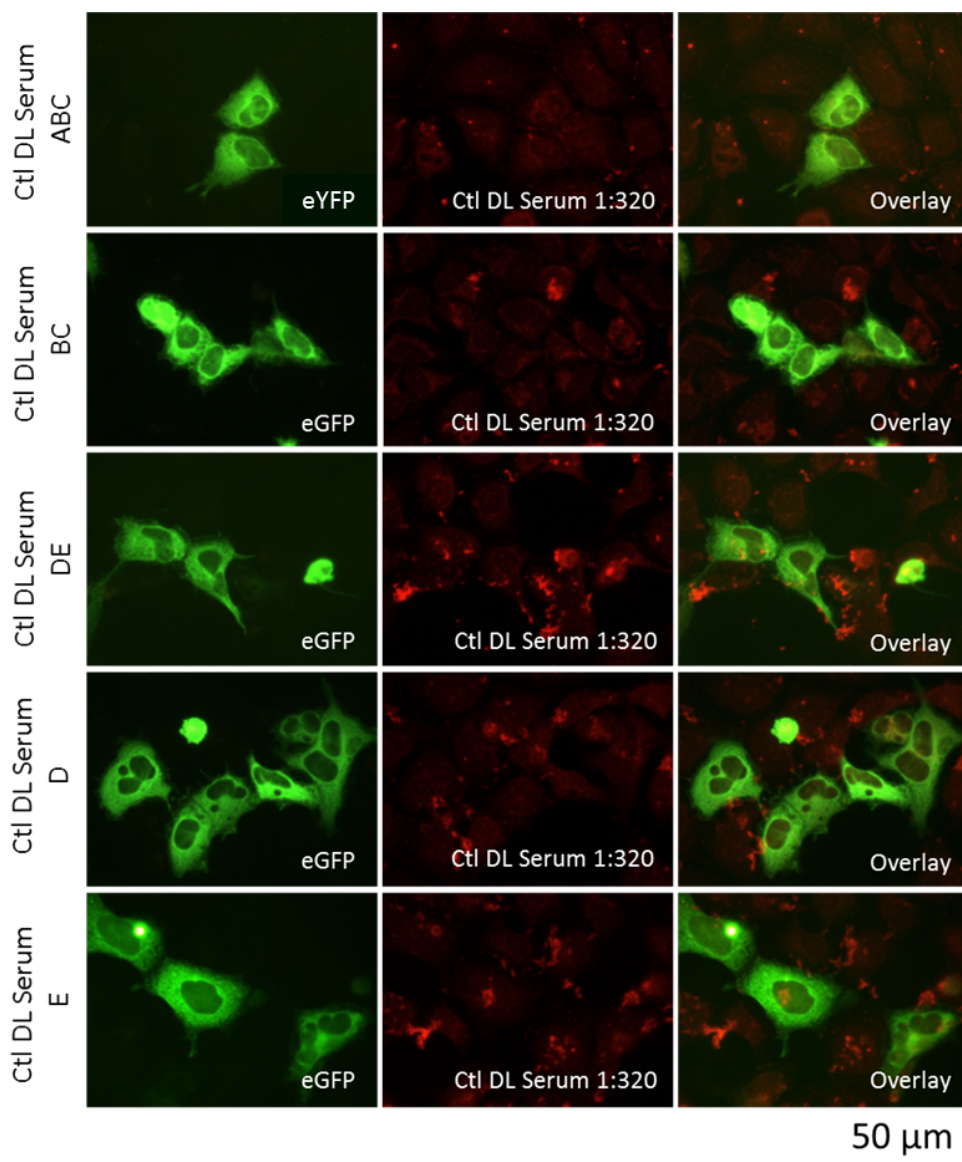


Abb. 19:

Der Liquor einer gesunden Kontrolle reagiert weder mit dem ABC- noch mit dem DE-Fragment

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (DE) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit CSF einer gesunden Kontrolle (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG, IgA mit Texas Red goat-anti-human-IgA detektiert. Das Signal von gebundenem IgG oder IgA ist mit dem eYFP/eGFP-Signal keiner der Konstrukte kolokalisiert (Mertens et al., 2018).

**Abb. 20:**

Das Serum von der gesunden Kontrolle Ctl DL reagiert mit keinem der Konstrukte

HEK293 Zellen wurden mit eYFP (ABC) oder eGFP (BC, DE, D, E) co-exprimierenden Synapsin-Fragmenten transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum von der gesunden Kontrolle Ctl DL (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundenes IgG anschließend mittels Alexa Fluor 594 anti-human IgG detektiert. Das Signal von gebundenem IgG ist mit dem eYFP/eGFP-Signal keiner der Konstrukte kolokalisiert.

Insgesamt zeigte die Mehrzahl der Patienten eine Immunreaktivität entweder gegen die A-Domäne oder die D-Domäne. In Tabelle 2 werden die Domänen-Spezifitäten der Antikörper aller getesteten Patienten noch einmal dargestellt.

Patient	ABC-Reaktivität	BC-Reaktivität	DE-Reaktivität	D-Reaktivität	E-Reaktivität
N12	+	-	-	-	-
N32	+	-	-	-	-
N45	-	-	-	-	-
N68	-	-	+	-	-
N82	-	-	-	-	-
N94	-	-	-	+	-
N141	-	-	+	+	-
N149	+	+	+	+	+
N171	-	-	+	+	-
N185a	+	-	-	-	-
N185b	+	-	-	-	-
N183	-	-	-	-	-
N189	+	-	-	-	-
N201	-	-	-	-	-
N203	+	-	-	-	-
N204	-	-	-	-	-
CIS117 Serum	-	-	+	+	-
Cis117 CSF	-	-	+	+	-
Indexpat. Serum	-	-	+(IgA)	+(IgA)	-
Indexpat. CSF	-	-	+(IgA)	+(IgA)	-

Tabelle 2:

Zusammenfassung der Ergebnisse des Tests auf Domänenspezifität von Antikörpern gegen Synapsin Ia mittels Immunfluoreszenz

Von den achtzehn untersuchten Patienten zeigen sechs eine A-Reaktivität, sechs eine D-Reaktivität und einer eine Reaktivität gegen alle untersuchten Fragmente bis auf die C-Domäne. Die Patienten, von denen sowohl Serum als auch Liquor zur Verfügung standen, zeigten in Serum und Liquor die gleiche Domänenspezifität, in beiden Fällen für die D-Domäne. Nur bei einem Patienten war die Anti-Synapsin-Reaktivität IgA-vermittelt, in allen anderen Fällen lagen IgG-Antikörper vor.

4.2 IgG-Subklassen bei Domänen-positiven Patienten

In der überwiegenden Mehrheit der Fälle war die gegen Synapsin I gerichtete Autoimmunität IgG-vermittelt. IgGs differenzieren sich in vier Subklassen, die sich in ihrer Fähigkeit zur Opsonierung und Neutralisierung und in ihrer Affinität zum Fc-Fragment unterscheiden. Um ein besseres Verständnis von einem möglichen Pathomechanismus zu gewinnen, wurden die bei den Domänen-positiven Patienten vorliegenden IgG-Subtypen untersucht. Hierfür wurden transfizierte HEK Zellen mit Serum und, soweit vorhanden, Liquor der Patienten über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mit spezifisch gegen die vier IgG-Subtypen gerichteten Sekundärantikörpern in einer Verdünnung von 1:300 gefärbt. Dabei zeigte sich ein gemischtes Bild. Nur in einem Fall lagen zwei verschiedene, in allen anderen Fällen nur jeweils eine IgG-Subklasse vor. Bei sieben Patienten lag im Serum IgG₄ vor, bei einem Patienten IgG₁ in Serum und Liquor und bei einem Patienten IgG₃ im Serum. Bei einem Patienten konnten zwei verschiedene Subklassen, IgG₁ und IgG₄, nachgewiesen werden. (exemplarische Darstellung an Hand einiger Patienten mit Negativkontrollen s. Abb. 21). Ein Patient war positiv für keine der Subklassen. IgG₂ wies keiner der untersuchten Patienten auf (für eine Zusammenfassung der Subtypen s. Tabelle 3).

Patient	IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄	Target Domain
CIS117 serum	+	-	-	-	D
CIS117 CSF	+	-	-	-	D
N12	-	-	-	+	A
N32	-	-	-	+	A
N68	-	-	-	+	D
N94	-	-	-	+	D
N141	-	-	-	+	D
N149	+	-	-	+	A,B,D,E
N171	-	-	+	-	D
N185a	-	-	-	+	A
N185b	-	-	-	+	A
N189	-	-	+	-	A

Tabelle 3:

Zusammenfassung der Tests Synapsin-Ia-Domänen positiver Patienten auf die vorliegenden IgG Subtypen

Sieben Patienten zeigten eine IgG₄ vermittelte Immunreaktivität, ein Patient hatte Antikörper vom Subtyp IgG₃, einer vom Subtyp IgG₁ und keiner vom Subtyp IgG₂. Ein Patient hatte Antikörper sowohl vom IgG₁- als auch IgG₄-Typ.

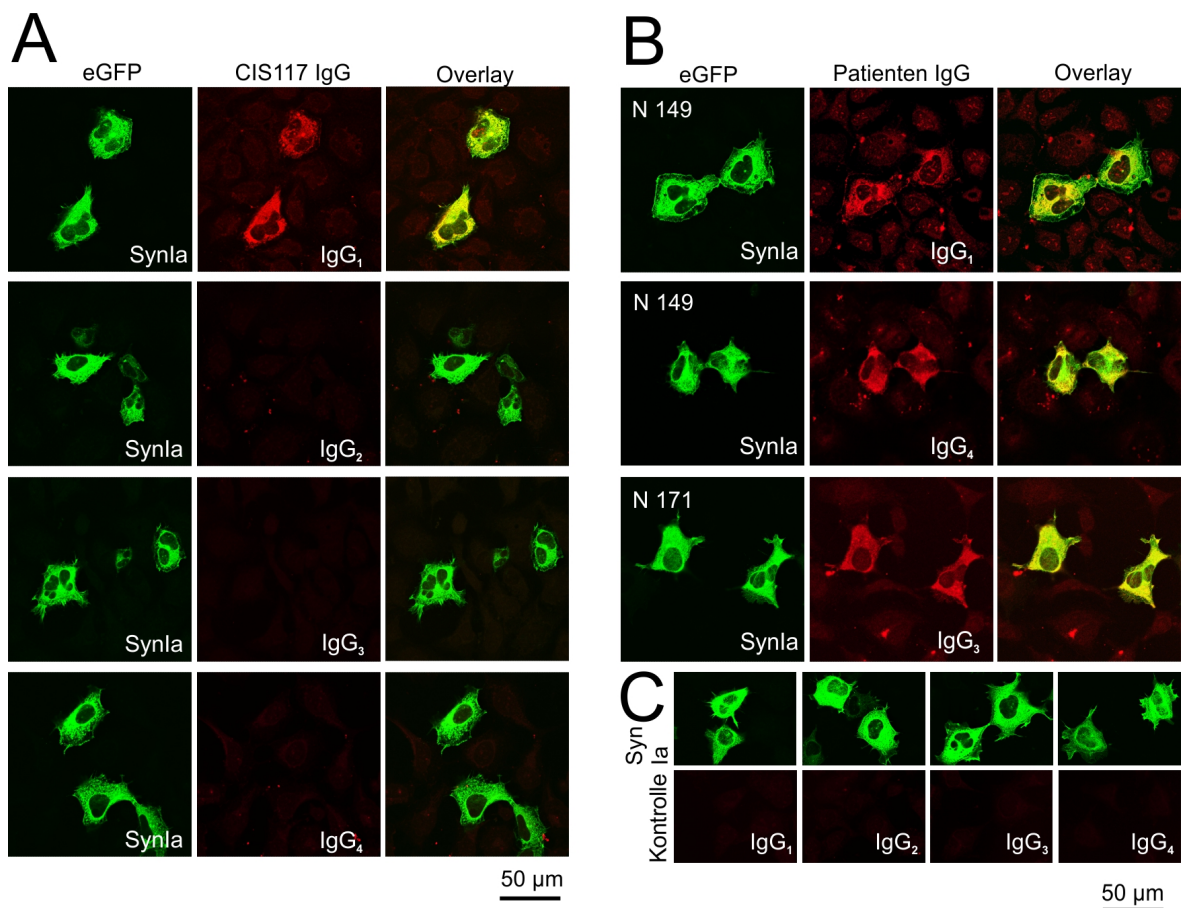


Abb.21:

Exemplarische Darstellung der gefundenen IgG Subklassen-Verteilungen der Patienten mit Antikörpern gegen Synapsin Ia Konstrukte

HEK293 Zellen wurden mit eGFP co-exprimierendem Ratten-Synapsin Ia transfiziert, fixiert und permeabilisiert. An der grünen Fluoreszenz ist die erfolgreiche Expression der auf dem Plasmid kodierten Proteine zu erkennen. Die transfizierten Zellen wurden mit Serum der Domänen-positiven Patienten und einer gesunden Kontrolle (Verdünnung 1:320) über Nacht bei 4°C inkubiert und gebundene IgG Subtypen anschließend mit Alexa Fluor 649 anti human IgG₁, IgG₂, IgG₃ oder IgG₄ detektiert. Die Aufnahmen erfolgten mit einem konfokalen Laser-Mikroskop

A: Die Serumprobe von Patient CIS117 zeigt eine deutliche Reaktivität für Antikörper der IgG₁ Unterklasse, die weitere Unterklassen IgG₂₋₄ konnten nicht detektiert werden. B: Die Serumprobe von Patient N149 zeigt mit einer deutliche Reaktivität für Antikörper der IgG₁ und IgG₄ Subklasse als einzige Probe eine Reaktivität für 2 verschiedenen Subklassen. Die Serumprobe von Patient N171 zeigt eine ausschließliche IgG₃ Reaktivität. C: Die Serumprobe einer gesunden Kontrolle zeigt keine Reaktivität für eine der IgG Subklassen mit Synapsin Ia.

4.3 IgA Antikörper im Liquor bei Patienten mit beginnenden Demenzen

Durch eine Kooperation mit dem ECR (Experimental and Clinical Research Center) der Charité wurde es möglich, eine größere Anzahl von Liquorproben hinsichtlich des Vorkommens von anti-Synapsin Autoantikörpern zu untersuchen. Die Hochschulambulanz Gedächtnissprechstunde des ECR stellte Liquorproben von 110 Patienten, die sich mit kognitiven Auffälligkeiten vorgestellt haben, sowie von 14 gesunden Kontrollen zur Verfügung. Die Diagnosen waren unterschiedlich und beinhalteten SMC (Subjective Memory Complaints) (13), Demenzen vom Alzheimer-Typ (40), frontotemporale Demenzformen (8), vaskuläre Demenzen (4), affektive Störungen mit kognitiven Beeinträchtigungen (18), Demenzen vom Mischtyp (5), Demenzen unklarer Ätiologie (19) und andere Formen (3). Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des Geschlechts (Fishers exakter Test, $p=0,54$) und des Alters (Mann-Whitney u Test, $p=0,61$). Für eine erste, praktikable Methode zum schnellen Testen aller Proben auf Synapsin Antikörper wurde zunächst der Western Blot verwendet. Es wurden eine SDS-Gelelektrophorese mit Gesamthirnhomogenat von Wildtyp-Mäusen sowie Triple-KO-Mäusen für Synapsin I, II und III (TKO) durchgeführt und die aufgetrennten Proteine im Semi-Dry-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Im Immunoblot mit Patienten Liquores in der Verdünnung 1:100 und einem gegen IgG gerichteten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper konnte für keinen Patienten eine Reaktivität gezeigt werden. Bei Verwendung eines Peroxidase-gekoppelten und gegen IgA gerichteten Sekundärantikörpers jedoch zeigten sich bei einigen Patientenproben Banden auf einer Höhe von etwas über 70 kDa. Diese Banden waren auf der Synapsin TKO Spur nicht nachzuweisen. Bei Auftragung einer Fraktion ungereinigter synaptischer Vesikel der Wildtyp-Maus, die besonders reich an synaptischen Proteinen ist, konnte eine Verstärkung des Signals gegenüber dem Wildtyp-Gesamthirnhomogenat gezeigt werden (exemplarisch an 4 Patienten gezeigt in Abbildung 22).

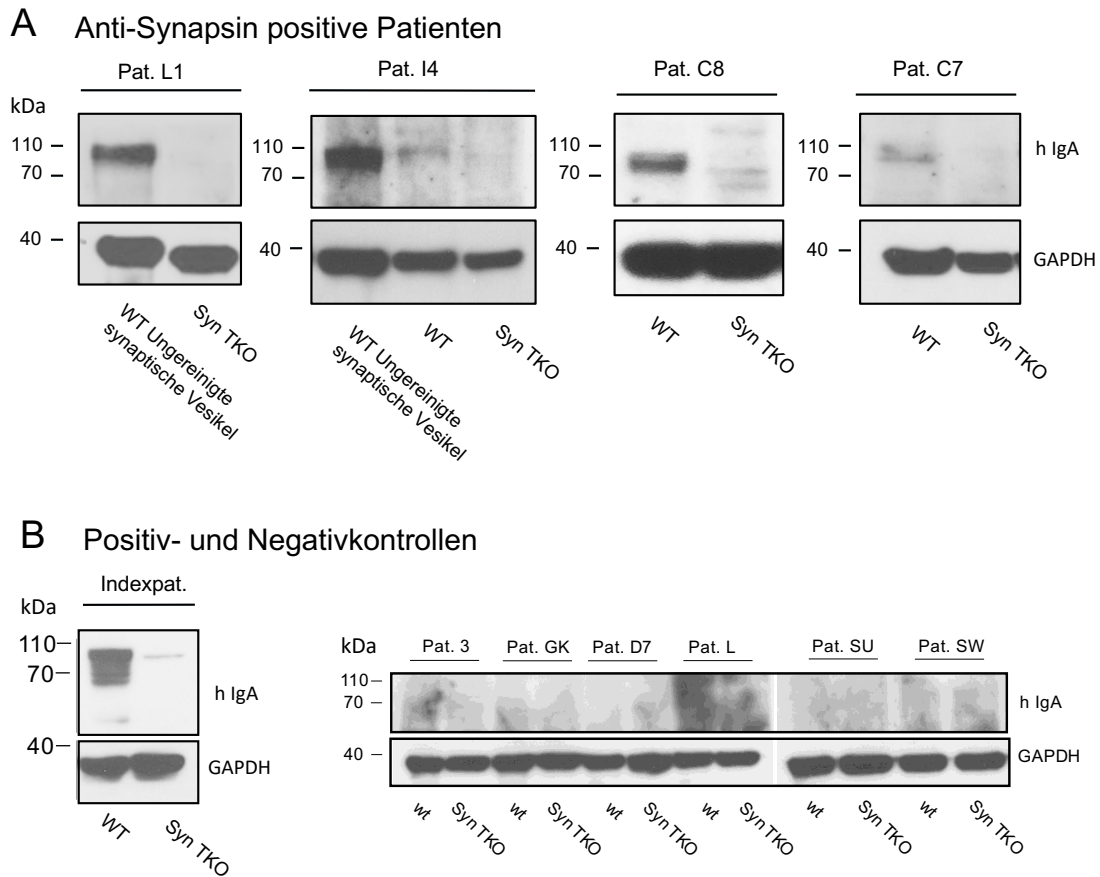


Abb. 22:

Immunblots zum Nachweis von anti-Synapsin-Antikörpern im CSF von Demenzpatienten

A: Exemplarisch dargestellt sind vier der positiven Patienten aus der Demenzkohorte. Es zeigt sich im Wildtyp- Gesamthirnhomogenat der Maus (Patient I4, C8 und C7) sowie in einer Fraktion synaptischer Vesikel aus dem Wildtyp Gehirn (Patient L1 und Patient I4) eine Bande etwas oberhalb von 70 kDa. In Patient I4 ist eine Verstärkung des Signals vom Homogenat zur Vesikelfraktion zu erkennen. Diese Bande ist im Gesamthirnhomogenat der Synapsin TKO Maus verschwunden.

B: Dargestellt ist das Bandenmuster des Indexpatienten, sowie der Probenaufrag von 6 Kontrollliquores. Negativkontrollen zeigen keine Bande im Wildtyp und der Indexpatient ist stark positiv im Wildtypgesamthirnhomogenat, während im Syn I KO Gesamthirnhomogenat die Banden zum größten Teil verschwunden sind. Als Sekundärantikörper für die Patientenserum wurde in allen Fällen anti-human-IgA-Antikörper verwendet, als Ladungskontrolle diente GAPDH.

Von den 110 untersuchten Patienten zeigten 5 (4,5%) eine anti-Synapsin typische Reaktion im Western Blot. Von den 14 untersuchten gesunden Kontrollen zeigen 2 (14,2%) eine anti-Synapsin typische Reaktion im Western Blot, wobei eine der Kontrollen auffällige Tau-Werte aufwies und bei der anderen Kontrolle eine Tumorerkrankung diagnostiziert wurde. Dies war bei $p=0,18$ im exakten Test nach Fisher nicht statistisch signifikant. Nähere Informationen zu den positiven Patienten sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Patient	Geschlecht	Geb.- datum	hTau [pg/mL]	β -Amyloid (1-42) [pg/mL]	β -Amyloid (1-40) [pg/mL]	Diagnose	Begleit-erkrankungen	MRT
L1	w	27.07.51	595	885	7831	Leichte kognitive Störung (MCI)	Keine	-
D7	w	21.07.34	373	299	5649	dementielles Syndrom, a e vom Alzheimer-Typ	keine Angaben	keine Angaben
I4	m	01.01.33	823	229	6806	Leichtes dementielles Syndrom a.e. vom Alz- heimer-Typ, leichtgradige depressive Episode	Presbyakusis, Dreifach-KHK mit multiplen Stents und Z.n. STEMI 2006	akzentuierte innere und äußere Liquorräume und mittel- bis hochgradige hippocampale Volumensminderung bds. (re>l) mit Erweiterung des Temporalthorns und der Fissura choroidalis
I6	w	22.07.65	188	459	3920	V.a. schwere depressive Episode mit psychotischen Symptomen DD Schizophrenie	Vitamin D Mangel, arterielle Hypertonie, gastroösophageale Refluxkrankheit	
C1	m	06.08.51	301	870	8005	gesunde Kontrolle	Hypercholesterinämie, Hyper- tension, benigne Prostata- hyperplasie, Schwerhörigkeit links, Aortenklappenstenose	-
C8	w	04.03.35	686	1710	15123	Depressive Episode mit objektiverbaren kognitiven Defiziten	Diabetes Typ II, COPD	Unauffällig
E7	m	31.07.46	209	1065	7935	gesunde Kontrolle	Parotistumor OP, Hypertonus, Hypercholesterinämie, Knoten in Schilddrüse	-
C7	w	27.02.47	384	445	7029	Leichte kognitive Störung bei V.a. beginnende chronisch neurode- generative Erkrankung	Z.n. Mamma-Karzinom OP (1980), Arterieller Hypertonus	Extern und frontoparietal betonte Atrophie, ausgeprägte Leukenzephalopathien periventrikulär und paraventrikulär bds.

Tbl. 4:

Anti-Synapsin-positive Probanden aus der Gedächtnissprechstunde:

Aufgeführt sind die anti-Synapsin-I-positiven Patienten und Kontrollen aus der Gedächtnissprechstunde mit Alter, Geschlecht, Diagnosen, Liquor- und MRT-Befunden. Farblich hervorgehobene Werte sind pathologisch. Abnahmzeitraum war zwischen 05/2018 und 10/18.

5. Diskussion:

5.1 Eignung der gewählten Methode

In der vorliegenden Arbeit sollten zunächst an Hand Zell-basierter Assays vorbeschriebene Antikörper gegen Synapsin I im Serum von Patienten mit verschiedenen psychiatrischen und neurologischen Diagnosen bezüglich ihrer Epitopspezifität charakterisiert werden. Hierfür wurden mit einzelnen Fragmenten des Proteins transfizierte HEK-Zellen genutzt. Methodisch spricht zunächst einmal die gut detektierbare Fluoreszenz der eYFP/eGFP-Tags der Synapsin-Fragmente für eine erfolgreiche Transfektion. Wie gezeigt wurden die einzelnen Domänen von spezifisch gegen sie gerichteten Antikörpern erkannt. Dies spricht für eine Spezifität in Expression und Detektierbarkeit der Teilstücke. Die Reaktivität der meisten anti-full-length-Synapsin positiven Patienten mit einigen, aber nicht allen, Fragmenten und die fehlende Reaktivität gesunder Kontrollen lassen die gewählte Methode für die Fragestellung grundsätzlich als geeignet erscheinen.

5.2 Domänenspezifität der Antikörper

Es scheint trotz des sehr variablen klinischen Bildes mit der A-Domäne und der D-Domäne eine Präferenz für zwei Domänen als antigene Epitope zu existieren. Sieben der 18 Seren waren für das ABC-Fragment, aber nicht für das BC-Fragment oder die C-Domäne positiv, was auf eine A-Reaktivität schließen lässt. Da Konstrukte für die isolierte A- oder B-Domäne nicht vorlagen, konnte eine isolierte A- oder B-Reaktivität nicht getestet werden.

Vier Seren und das Serum-Liquor-Paar reagierten mit Fragmenten, in denen die D-Domäne enthalten war. Dabei waren die Proben von drei Patienten wie zu erwarten für die D-Domäne und das DE-Fragment positiv. Überraschenderweise reagierte ein Serum nur auf die D-Domäne und nicht auf das DE-Fragment und ein anderes Serum nur auf das DE-Fragment, nicht aber auf die D- oder E-Domäne. Möglicherweise kann dieses Phänomen mit Faltungsunterschieden zwischen einzelnen Domänen und dem Gesamtprotein erklärt werden. Im Fall des Patienten N68, der nur auf die Kombination

aus D-Domäne und E-Domäne reagierte, aber mit keiner einzelnen Domäne, ist nicht sicher zu sagen, welcher Teil des Proteins das antigene Epitop ist. Da aber insgesamt eine Präferenz für die D-Domäne zu existieren scheint, ist eine D-Reaktivität als wahrscheinlicher einzuschätzen. Bis auf eine Ausnahme, Patient N149, hatten alle Patienten lediglich Antikörper gegen eine Domäne. In diesem Zusammenhang ist auffällig, dass Patient N149 mit Reaktivität gegen fast alle Domänen mit 1:100.000 den höchsten Antikörpertiter gegen das full-length-Protein hat. Insgesamt scheint es jedoch keine Korrelation zwischen Antikörpertiter und Ausmaß der Reaktivität gegen einzelne Domänen oder Anzahl der antigen wirkenden Domänen zu geben. So hat zum Beispiel Patient N183 mit 1:32.000 einen vergleichsweise hohen Titer, reagiert aber mit keinem der einzelnen Synapsinfragmente, während N12 trotz des niedrigen Titers von 1:320 eine A-Reaktivität zeigt. Gegen die C-Domäne, obwohl diese das längste Teilstück ist, waren in keinem Fall Antikörper gerichtet. Möglicherweise liegt dies daran, dass die C-Domäne der Teil des Proteins ist, der in Lipidmembranen inseriert und daher nicht immunologisch sichtbar wird (Südhof et al., 1989). Um die Domänenspezifität statistisch signifikant mit klinischen Charakteristika zu korrelieren, ist die Fallzahl zu gering. Es fällt lediglich auf, dass vier von sechs A-positiven Patienten mit einer bipolaren Störung diagnostiziert waren. Fünf von 18 Patienten zeigen eine Reaktivität für keine der Domänen. Dies kann möglicherweise ebenfalls mit Faltungsunterschieden zwischen dem full-length Protein und den Fragmenten erklärt werden. Eine andere Möglichkeit ist, dass das antigene Epitop bei den Domänen-negativen Patienten nicht innerhalb einer Domäne liegt, sondern das N-terminale Ende der C-Domäne und das C-terminale Ende der D-Domäne beinhaltet. Dieser Abschnitt wurde in keinem der Assays zusammenhängend exprimiert. Weiterhin kann eine gegenüber dem Gesamtprotein verminderte Affinität der Antikörper hinsichtlich der Domänen nicht ausgeschlossen werden, der Einsatz höherer Serumkonzentrationen als der angewendeten (1:320) resultierte jedoch in einer deutlichen Verschlechterung der Signal zu Hintergrund Färbung und erlaubte daher keine gesicherten Aussagen über das Bindungsverhalten. Für den Indexpatienten konnte eine intrathekale Antikörpersynthese durch Berechnung des Antikörperindex zwischen Liquor und Serum nachgewiesen werden (Piepgras et al., 2015). Für das einzige darüber hinaus verfügbare Liquor-Serum-Paar des Patienten CIS117 konnte bei einem Antikörpertiter im Liquor von 1:1000 und einem Antikörperindex von 19,6 ebenfalls eine intrathekale Synthese gezeigt werden. Aufgrund der nicht vorhandenen Liquorproben der anderen Patienten kann bislang keine generalisierte Aussage über das Auftreten von Antikörpern

im Liquor oder das Vorhandensein einer intrathekalen Synthese von anti-Synapsin Antikörpern in diesen Patientenkohorten getroffen werden.

5.3 IgG Subklassen:

Die Analyse der Subtypen ergab ein gemischtes Bild. Ein Patient war sowohl im Serum als auch im Liquor positiv für IgG₁, zwei Patienten für IgG₃, sieben Patienten für IgG₄ und ein Patient sowohl für IgG₁ als auch für IgG₄. Dabei ist auffällig, dass der einzige Patient mit mehr als einem Antikörpersubtyp, Patient N149, auch der einzige Patient mit Immunreaktivität gegen mehr als eine Domäne ist. Welche Antikörpersubklasse dabei mit welcher Domäne reagierte, konnte bislang nicht untersucht werden. Als einzigem Domänen-positiven Patienten, der auf IgG Subklassen getestet wurde, war bei N203 keine Zuordnung der Antikörper zu einer Subklasse möglich. Möglicherweise hängt dies mit dem niedrigen Titer dieses Patienten am unteren Rand des Testbereiches (1:320) zusammen.

Die unterschiedlichen IgG-Subtypen unterscheiden sich in ihrer Affinität zum Komplement-System und ihrer Fähigkeit zur Opsonierung. IgG₁ und IgG₃ sind potente Opsonine und aktivieren das Komplementsystem stark. IgG₄, der in dieser Patientenkohorte am weitesten verbreitete Subtyp, ist insgesamt der am wenigsten häufig vorkommende Antikörpertypus. Trotz des im Vergleich zu anderen Subtypen seltenen Auftretens ist eine Assoziation von IgG₄ mit vielen Autoimmunerkrankungen beschrieben, wobei die Pathogenität der Antikörper nicht in allen Fällen nachgewiesen ist (Koneczny, 2018). So kann IgG₄ Myasthenia Gravis verursachen (Huijbers et al., 2013). Eine Multisystem-Erkrankung, die prinzipiell jedes Organ betreffen kann, scheint im Zusammenhang mit IgG₄ zu stehen (Hamano et al., 2018). Betrachtet man den Formenkreis der Autoantikörperenzephalitiden, so findet man IgG₄ bei der anti-LGI₁ Enzephalitis (Arino et al., 2016), bei der anti-DPPX Enzephalitis (Hara et al., 2017) und bei der anti-Caspr2 Enzephalitis (van Sonderen et al., 2016). Die Fähigkeit zur Opsonierung ist bei IgG₄ schwach ausgeprägt und es findet kaum eine Komplement-Aktivierung statt. Eine ungewöhnliche Eigenschaft von IgG₄ ist die Bildung von Hybridantikörpern mit Affinität zu zwei unterschiedlichen Epitopen pro Antikörpermolekül. Alle IgG-Subklassen sind in der Lage, ihr Antigen zu neutralisieren.

IgG verteilt sich gut im extravasalen Raum, und scheint somit für eine Antikörpervermittelte Schädigung von Nervengewebe zunächst der ideale Kandidat zu sein. Wenn man bedenkt, dass das hier relevante Antigen intrazellulär befindet, ist ein Schädigungsmechanismus durch Opsonierung und anschließende Komplement- oder Phagozytenaktivierung nicht sehr wahrscheinlich. Am ehesten ist eine Schädigung durch Neutralisation des Antigens oder durch intrazelluläre Akkumulation von Antikörpern und nachfolgendem Zelltod denkbar.

5.4 Antikörper bei Demenzpatienten

Von den untersuchten 110 Patienten aus der Demenzsprechstunde waren fünf (4,5%) im Westernblot positiv auf Antikörper gegen Synapsin vom IgA Typ. Von den untersuchten 14 Kontrollpatienten waren zwei (14%) positiv. Relativierend muss angemerkt werden, dass eine der beiden Kontrollen ein auffälliges Tau-Protein im Liquor und die zweite Kontrollperson ein Tumorgeschehen aufweist. Keiner der untersuchten Patienten war IgG positiv. Aufgrund der bislang noch sehr geringen Kontrollzahl ist hieraus keine signifikante Schlussfolgerung zu ziehen. Auch war das Kollektiv der untersuchten Patienten sehr heterogen, es lagen unterschiedliche Demenzformen sowie affektive Störungen mit lediglich kognitiven Begleitsymptomen vor. Es hat sich aber gezeigt, dass nicht nur, wie von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, IgG-Antikörper gegen Synapsin, sondern auch, wie initial bei dem Indexpatienten, IgA-Antikörper ein möglicherweise relevantes Phänomen sind. Außerdem konnte das erste Mal das Vorkommen von Synapsin-Antikörpern im Liquor in weiteren als den vorab beschriebenen zwei Fällen gezeigt werden.

5.5 Pathogenetische Relevanz:

Durch das Auftreten von Anti-Synapsin-Antikörpern bei einem relevanten Anteil von Patienten mit neurologischen oder psychiatrischen Erkrankungen im Serum und bei einigen der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Demenz-Patienten im Liquor wird die Frage nach einer pathogenetischen Relevanz dieser Antikörper aufgeworfen. Das

antigene Protein Synapsin ist intrazellulär, daher ist zu diskutieren, wie es in Kontakt mit dem Immunsystem kommen kann und ob Antikörper dagegen eine pathogenetische Relevanz haben oder lediglich ein Epiphänomen darstellen.

Im Allgemeinen sind Antikörper gegen intrazelluläre Proteine bei autoimmunen Prozessen mit neuronaler Beteiligung wie bereits eingangs beschrieben eher von diagnostischer Bedeutung, während die Zellschädigung T-Zell-vermittelt ist. Im Fall unseres Indexpatienten ist allerdings auffällig, dass eine immunsuppressive Therapie zur Verbesserung der Symptomatik führte (Piepgras et al., 2015). Dies ist bei den klassischen T-Zell-vermittelten meist paraneoplastischen neurologischen Erkrankungen mit Antikörpern gegen intrazelluläre Proteine in der Regel nicht der Fall. Außerdem konnte keine zu Grunde liegende maligne Erkrankung festgestellt werden. Noch unpublizierte funktionelle Studien weisen auf eine pathogenetische Relevanz der IgA-Antikörper des Indexpatienten hin. In welchem Maße dies auch für das IgG der anderen Patienten oder das IgA der Demenzkohorte gilt, bzw. in wie weit der Indexpatient eine Sonderstellung einnimmt, bleibt zu untersuchen.

Andere Beispiele zeigen, dass eine Zellschädigung durch Antikörper gegen intrazelluläre Antigene nicht prinzipiell undenkbar ist. In der Einleitung wurden bereits anti-Amphiphysin-Antikörper (Geis et al., 2010; Werner et al., 2016) und anti-Yo-Antikörper (Greenlee et al., 2010) genannt, bei denen es zur Internalisierung und zur Zellschädigung durch Antikörper kommt. Die physiologische Relevanz eines solchen Prozesses könnte in der Clearance von pathologischen intrazellulären Proteinen liegen. So werden zum Beispiel IgG anti-Tau-Antikörper von Neuronen über das Fc-Fragment rezeptorvermittelt endozytiert und verbessern die Tau-Clearance. Dabei ist die Endozytoserate abhängig vom Gesamt-Tau und scheint somit epitopspezifisch von statten zu gehen (Congdon et al., 2013). Eine epitopspezifische Internalisierung konnte auch für anti-Amphiphysin-Antikörper gezeigt werden (Geis et al., 2010). Für den Fall, dass diese Antikörper eine für die klinische Symptomatik ursächliche Bedeutung haben, kann man sich die Vielgestalt der klinischen Bilder durch das nahezu ubiquitäre Vorkommen Synapsins im gesamten Nervensystem erklären.

Andererseits ist es auch möglich, dass aufgrund anderer Pathologien neuronale Zellen zerstört werden und Synapsin dadurch in den Extrazellulärraum gelangt. In diesem Fall

wären Antikörper gegen Synapsin lediglich Marker für einen bestehenden Zelluntergang, aber nicht die Ursache dafür. Dann könnte es lohnenswert sein, die Prävalenz von Anti-Synapsin-Antikörpern bei Patienten mit fortgeschrittener Demenz oder bei der hier untersuchten Kohorte zu einem späteren Zeitpunkt zu testen und Anti-Synapsin-Antikörper auf ihre Eignung als klinischen Marker zu überprüfen.

5.6 Detektion durch das Immunsystem

Synapsin scheint im Rahmen von neuronalen Reparaturvorgängen in Assoziation mit Exosomen von Gliazellen nach extrazellulär sezerniert zu werden (Wang et al., 2011). Exosomen sind kleine Vesikel mit einem Durchmesser unter 100 nm, die nicht direkt von der Plasmamembran abgeschnürt werden, sondern aus Multivesicular Bodies sezerniert werden. Exosomen neuronaler Herkunft können nicht nur in den Liquor gelangen, sondern sind auch aus dem Serum isolierbar. Exosomal sezerniertes Synapsin im Serum ist also eine Möglichkeit für periphere Immunzellen, mit Synapsin in Berührung zu kommen.

Verschiedene experimentelle Daten haben in der Vergangenheit dazu geführt, eine unter physiologischen Bedingungen strikte Trennung zwischen ZNS und peripherem Immunsystem anzunehmen. So wird ins Gehirn transplantiertes Fremdgewebe zunächst nicht abgestoßen, man stieß nicht auf klassische Antigen-präsentierende Zellen, wie zum Beispiel dendritische Zellen, und das Gehirnparanchym ist nicht mit lymphatischen Gefäßen versorgt. Mittlerweile ist eher von einer immunologischen Sonderstellung als von einer unüberwindbaren Barriere auszugehen. Es gibt lymphatische Gefäße in den Meningen, die zentrale Antigene in die nasale Mukosa und letztendlich in die zervikalen Lymphknoten drainieren. Diese lymphatischen Gefäße kommunizieren mit dem subarachnoidalen Raum und mit dem sogenannten perivaskulären Raum, der das Hirnparenchym versorgende arterielle Gefäße umgibt (Kida et al., 1993; Yamada et al., 1991). Es konnte auch gezeigt werden, dass in den CSF injizierte dendritische Zellen in die zervikalen Lymphknoten wandern, interessanterweise bevorzugt in die B-Zell-Follikel (Hatterer et al., 2006). In den Meningen befinden sich zahlreiche lymphatische Zellen, die dort gut lokalisiert sind, um das ZNS immunologisch überwachen. Bei psychologischem Stress oder kognitiven Herausforderungen findet eine vermehrte

Wanderung von T-Zellen zum Plexus choroideus statt, der unter diesen Umständen verstärkt das Adhäsionsmolekül ICAM-1 exprimiert (Derecki et al., 2010; Lewitus et al., 2008). Sowohl dieser immunologische Außenposten in den Meningen an den Grenzen des ZNS als auch die peripher gelegenen zervikalen Lymphknoten sind Orte, an denen das Immunsystem in Kontakt mit Synapsin kommen könnte, nachdem dies zum Beispiel über Exosomen in den Extrazellulärraum gelangt. Wegen der engen Verbindung zum Liquorsystem würde man in diesem Fall allerdings die Präsenz des Antigens im Liquor erwarten. Präliminäre Daten aus einer massenspektrometrischen Untersuchung des Liquors des Indexpatienten konnten dies zunächst nicht bestätigen.

5.7 Physiologische Autoimmunität

Im Allgemeinen wird Autoimmunität als ein unerwünschtes, pathologisches Phänomen betrachtet, bei dem die Kontrollmechanismen des Immunsystems versagt haben. Beginnend mit Irun Cohens Theorie des immunologischen Humunculus gibt es aber auch Stimmen, die die Existenz einer physiologischen, nützlichen Autoimmunität insbesondere gegen neuronale Antigene postulieren (Cohen, 1992; Kipnis et al., 2012; Nataf, 2017a). Mäuse mit SCID (severe combined immune deficit) zeigen kognitive Einschränkungen (Brynskikh et al., 2008). Ebenso sind Mäuse, deren CD4⁺-T-Zell-Repertoire ausschließlich gegen Albumin gerichtet ist, gegenüber Wildtyp-Mäusen im Morrison-Water-Maze schlechter trainierbar. Ihre Performance verbesserte sich nach Verabreichung von Wildtyp-Splenozyten, sowie interessanterweise auch nach Verabreichung von ausschließlich Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Radjavi et al., 2014). Bei kognitiven Herausforderungen sammeln sich CD4⁺ T-Zellen in den Meningen. Verhindert man dies mittels Immunmodulation, resultiert daraus ein proinflammatorischer Phänotyp meningealer myeloider Zellen und kognitive Einschränkungen der betroffenen Mäuse (Derecki et al., 2010). Eine funktionierende Population autoreaktiver T-Zellen gegen neuronale Antigene scheint also eine neuroprotektive und prokognitive Wirkung zu haben. Für die humorale Immunabwehr gibt es weniger Daten. Eine Untersuchung der Antikörperrepertoires von Neugeborenen und ihren Müttern zeigte, dass diese Neugeborenen ein IgG-Repertoire hatten, das dem ihrer Mütter sehr ähnlich war. Dies ist wenig überraschend, da IgG die Plazenta überqueren kann. In ihrem IgM-Repertoire, das von den Neugeborenen selbst

kommen muss, da IgM nicht plazentagängig ist, gab es große Unterschiede zum mütterlichen IgM, aber große Ähnlichkeiten zwischen den verschiedenen Neugeborenen und ein großer Teil dieser IgM-Antikörper war autoreaktiv. Dies spricht dafür, dass natürliche Autoantikörper zwischen den verschiedenen Menschen ähnlich sind und häufig eben autoimmun (Merbl et al., 2007).

Die Beobachtung, dass es zwar unzählbar viele mögliche Zielstrukturen für Autoimmunität gibt, aber nur wenige davon häufig die Auslöser für Autoimmunerkrankungen sind und diese relevanten Autoantigene häufig neuronalen Ursprungs sind, hat zu einer Theorie für T-Zell vermittelte Autoimmunerkrankungen geführt. Eine physiologische Autoimmunität gegen diese Strukturen ist unter normalen Bedingungen streng kontrolliert und hat nützliche Effekte. Versagen aus irgendeinem Grund diese Kontrollmechanismen, ist die Konsequenz eine Autoimmunerkrankung (Nataf, 2017a; Nataf, 2017b). Vielleicht ist ein ähnlicher Mechanismus auch für antikörpervermittelte Autoimmunität denkbar. Demnach gäbe es autoreaktive Antikörper, deren Vorliegen physiologisch ist. Veränderung in der Feinregulation des Immunsystems, beispielsweise durch eine maligne Erkrankung, führen zum Kippen in die pathologische Autoimmunität.

5.8 Ausblick:

Zur Klärung der Bedeutung dieser Antikörper, insbesondere im Hinblick auf eine mögliche Pathogenität, sind funktionelle Untersuchungen notwendig. Zurzeit laufen Versuche zur Inkubation von Neuronenkulturen mit Patientenseren und –liquores, mit nachfolgender elektrophysiologischer Analyse der postsynaptischen Ströme und Potentiale. Sollte sich hier ein Unterschied zwischen Patienten und gesunden Kontrollen zeigen, wäre dieser Versuch mit Synapsin KO Neuronen zu wiederholen. Dabei würde man im Falle einer pathogenetischen Relevanz der anti-Synapsin-Antikörper das Verschwinden dieses Unterschieds erwarten.

Darüber hinaus ist nicht bekannt, wie die Antikörper, so sie denn pathogen sind, an den Schädigungsort gelangen. Um das intrazellulär gelegene Synapsin zu erreichen, müssen die Antikörper in die Zelle gelangen, also internalisiert werden. Ob dies rezeptorvermittelt

geschieht, wie für andere Antikörper bekannt, oder unspezifisch erfolgt, ist eine Frage, die man in der Neuronenkultur unter Einsatz von Endozytose-Hemmstoffen untersuchen könnte.

Über die Prävalenz von anti-Synapsin-Antikörpern bei Demenzpatienten kann zum gegebenen Zeitpunkt noch keine Aussage gemacht werden. Dennoch erscheinen die präliminären Ergebnisse interessant und eine weitere Untersuchung dieser Fragestellung mittels Tests einer statistisch ausreichenden Anzahl von Kontrollpatienten und eventuell einer Verlaufskontrolle nach einigen Jahren angebracht. Auch für diese Patienten könnten Serumproben untersucht und Antikörpertiter, zwecks Nachweises oder Ausschluss einer intrathekalen Synthese, bestimmt werden.

6. Abkürzungen

AI: Antikörperindex

ALPS: ArfGAP1 lipid-packing sensor

BCA: Bicinchoninsäure

BSA: Bovines Serumalbumin

CIS: Clinically isolated syndrome

Caspr 2: contactin associated protein 2

CaMK: Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Kinasen

CD20: Cluster of differentiation 20

CSF: Cerebrospinal fluid

DNA: Desoxyribonukleinsäure

DPPX: dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6

DTT: Dithiothreitol

ECL: Enhanced-Chemiluminescence-Reagenzien

EEG: Elektroenzephalogramm

eGFP: enhanced green fluorescent protein

EPSC: excitatory post synaptic current

eYFP: enhanced yellow fluorescent protein

GABA: Gammaaminobutyrat,

HEK-Zellen: Human Embryonic Kidney-Zellen

HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure

Ig: Immunglobulin

IPSC: inhibitory post synaptic current

kDA: kilo Dalton

K.O.: knock-out

LG11: leucin rich glioma-inactivated protein 1

LTP: Long Term Potentiation

MAP-Kinase: Mitogen Activated Protein Kinase

MCI: Mild Cognitive Impairment

MRT: Magnet Resonanz Tomographie

MS: Multiple Sklerose

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

Abkürzungen

PBS: phosphate buffered saline

PKA: Proteinkinase A

PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid

PPF: Paired Pulse Facilitation

PTP: Posttetanische Potenzierung

RP: Reserve Pool

RPP: Readily Releasable Pool

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SMC: subjective memory complaints

STP: Short Term Plasticity

SV: synaptische Vesikel

Syn: Synapsin

TEMED: N,N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

TH-Zellen: T-Helferzellen

ZNS: Zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- ANCES, B. M., VITALIANI, R., TAYLOR, R. A., LIEBESKIND, D. S., VOLOSCHIN, A., HOUGHTON, D. J., GALETTA, S. L., DICHTER, M., ALAVI, A., ROSENFELD, M. R. & DALMAU, J. 2005. Treatment-responsive limbic encephalitis identified by neuropil antibodies: MRI and PET correlates. *Brain*, 128, 1764-77.
- ARINO, H., ARMANGUE, T., PETIT-PEDROL, M., SABATER, L., MARTINEZ-HERNANDEZ, E., HARA, M., LANCASTER, E., SAIZ, A., DALMAU, J. & GRAUS, F. 2016. Anti-LGI1-associated cognitive impairment: Presentation and long-term outcome. *Neurology*, 87, 759-65.
- ARMANGUE, T., PETIT-PEDROL, M. & DALMAU, J. 2012. Autoimmune encephalitis in children. *J Child Neurol*, 27, 1460-9.
- AWIZIO, A. K., ONOFRI, F., BENFENATI, F. & BONACCURSO, E. 2007. Influence of synapsin I on synaptic vesicles: an analysis by force-volume mode of the atomic force microscope and dynamic light scattering. *Biophys J*, 93, 1051-60.
- BAHLER, M. & GREENGARD, P. 1987. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature*, 326, 704-7.
- BHANGU, P. S., GENEVER, P. G., SPENCER, G. J., GREWAL, T. S. & SKERRY, T. M. 2001. Evidence for targeted vesicular glutamate exocytosis in osteoblasts. *Bone*, 29, 16-23.
- BLOOM, O., EVERGREN, E., TOMILIN, N., KJAERULFF, O., LOW, P., BRODIN, L., PIERIBONE, V. A., GREENGARD, P. & SHUPLIAKOV, O. 2003. Colocalization of synapsin and actin during synaptic vesicle recycling. *J Cell Biol*, 161, 737-47.
- BOIDO, D., FARISELLO, P., CESCA, F., FERREA, E., VALTORTA, F., BENFENATI, F. & BALDELLI, P. 2010. Cortico-hippocampal hyperexcitability in synapsin I/II/III knockout mice: age-dependency and response to the antiepileptic drug levetiracetam. *Neuroscience*, 171, 268-83.
- BRYNSKIKH, A., WARREN, T., ZHU, J. & KIPNIS, J. 2008. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. *Brain Behav Immun*, 22, 861-9.
- BURNETTE, W. N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- CARVAJAL-GONZALEZ, A., LEITE, M. I., WATERS, P., WOODHALL, M., COUTINHO, E., BALINT, B., LANG, B., PETTINGILL, P., CARR, A., SHEERIN, U. M., PRESS, R., LUNN, M. P., LIM, M., MADDISON, P., MEINCK, H. M., VANDENBERGHE, W. & VINCENT, A. 2014. Glycine receptor antibodies in PERM and related syndromes: characteristics, clinical features and outcomes. *Brain*, 137, 2178-92.
- CAVALLERI, G. L., WEALE, M. E., SHIANN, K. V., SINGH, R., LYNCH, J. M., GRINTON, B., SZOEKE, C., MURPHY, K., KINIRONS, P., O'ROURKE, D., GE, D., DEPOND, C., CLAEYS, K. G., PANDOLFO, M., GUMBS, C., WALLEY, N., MCNAMARA, J., MULLEY, J. C., LINNEY, K. N., SHEFFIELD, L. J., RADTKE, R. A., TATE, S. K., CHISSOE, S. L., GIBSON, R. A., HOSFORD, D., STANTON, A., GRAVES, T. D., HANNA, M. G., ERIKSSON, K., KANTANEN, A. M., KALVIAINEN, R., O'BRIEN, T. J., SANDER, J. W., DUNCAN, J. S., SCHEFFER, I. E., BERKOVIC, S. F., WOOD, N. W., DOHERTY, C. P., DELANTY, N., SISODIYA, S. M. & GOLDSTEIN, D. B. 2007. Multicentre search for genetic susceptibility loci in sporadic epilepsy syndrome and seizure types: a case-control study. *Lancet Neurol*, 6, 970-80.
- CESCA, F., BALDELLI, P., VALTORTA, F. & BENFENATI, F. 2010. The synapsins: key actors of synapse function and plasticity. *Prog Neurobiol*, 91, 313-48.

- CHEETHAM, J. J., MURRAY, J., RUHKALOVA, M., CUCCIA, L., MCALONEY, R., INGOLD, K. U. & JOHNSTON, L. J. 2003. Interaction of synapsin I with membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 309, 823-9.
- CHIAPPALONE, M., CASAGRANDE, S., TEDESCO, M., VALTORTA, F., BALDELLI, P., MARTINOIA, S. & BENFENATI, F. 2009. Opposite changes in glutamatergic and GABAergic transmission underlie the diffuse hyperexcitability of synapsin I-deficient cortical networks. *Cereb Cortex*, 19, 1422-39.
- CHIN, L. S., LI, L., FERREIRA, A., KOSIK, K. S. & GREENGARD, P. 1995. Impairment of axonal development and of synaptogenesis in hippocampal neurons of synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9230-4.
- COHEN, I. R. 1992. The cognitive paradigm and the immunological homunculus. *Immunol Today*, 13, 490-4.
- CONGDON, E. E., GU, J., SAIT, H. B. & SIGURDSSON, E. M. 2013. Antibody uptake into neurons occurs primarily via clathrin-dependent Fcγ receptor endocytosis and is a prerequisite for acute tau protein clearance. *J Biol Chem*, 288, 35452-65.
- CORRADI, A., ZANARDI, A., GIACOMINI, C., ONOFRI, F., VALTORTA, F., ZOLI, M. & BENFENATI, F. 2008. Synapsin-I- and synapsin-II-null mice display an increased age-dependent cognitive impairment. *J Cell Sci*, 121, 3042-51.
- CRUCEANU, C., ALDA, M., GROF, P., ROULEAU, G. A. & TURECKI, G. 2012. Synapsin II is involved in the molecular pathway of lithium treatment in bipolar disorder. *PLoS One*, 7, e32680.
- CRUCEANU, C., ALDA, M., NAGY, C., FREEMANTLE, E., ROULEAU, G. A. & TURECKI, G. 2013. H3K4 tri-methylation in synapsin genes leads to different expression patterns in bipolar disorder and major depression. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16, 289-99.
- CZERNIK, A. J., PANG, D. T. & GREENGARD, P. 1987. Amino acid sequences surrounding the cAMP-dependent and calcium/calmodulin-dependent phosphorylation sites in rat and bovine synapsin I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7518-22.
- DALMAU, J., FURNEAUX, H. M., ROSENBLUM, M. K., GRAUS, F. & POSNER, J. B. 1991. Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy. *Neurology*, 41, 1757-64.
- DALMAU, J., GLEICHMAN, A. J., HUGHES, E. G., ROSSI, J. E., PENG, X., LAI, M., DESSAIN, S. K., ROSENFELD, M. R., BALICE-GORDON, R. & LYNCH, D. R. 2008. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*, 7, 1091-8.
- DARNELL, R. B. & POSNER, J. B. 2003. Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *N Engl J Med*, 349, 1543-54.
- DAVIS, B. J. 1964. DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. *Ann N Y Acad Sci*, 121, 404-27.
- DE CAMILLI, P., CAMERON, R. & GREENGARD, P. 1983. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol*, 96, 1337-54.
- DE CAMILLI, P., UEDA, T., BLOOM, F. E., BATTENBERG, E. & GREENGARD, P. 1979. Widespread distribution of protein I in the central and peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5977-81.
- DERECKI, N. C., CARDANI, A. N., YANG, C. H., QUINNIES, K. M., CRIHFELD, A., LYNCH, K. R. & KIPNIS, J. 2010. Regulation of learning and memory by meningeal immunity: a key role for IL-4. *J Exp Med*, 207, 1067-80.

- DRIN, G., CASELLA, J. F., GAUTIER, R., BOEHMER, T., SCHWARTZ, T. U. & ANTONNY, B. 2007. A general amphipathic alpha-helical motif for sensing membrane curvature. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 138-46.
- DYCK, B. A., BEYAERT, M. G., FERRO, M. A. & MISHRA, R. K. 2011. Medial prefrontal cortical synapsin II knock-down induces behavioral abnormalities in the rat: examining synapsin II in the pathophysiology of schizophrenia. *Schizophr Res*, 130, 250-9.
- FARISELLO, P., BOIDO, D., NIEUS, T., MEDRIHAN, L., CESCA, F., VALTORTA, F., BALDELLI, P. & BENFENATI, F. 2013. Synaptic and extrasynaptic origin of the excitation/inhibition imbalance in the hippocampus of synapsin I/II/III knockout mice. *Cereb Cortex*, 23, 581-93.
- FASSIO, A., MERLO, D., MAPELLI, J., MENEGON, A., CORRADI, A., METE, M., ZAPPETTINI, S., BONANNO, G., VALTORTA, F., D'ANGELO, E. & BENFENATI, F. 2006. The synapsin domain E accelerates the exoendocytotic cycle of synaptic vesicles in cerebellar Purkinje cells. *J Cell Sci*, 119, 4257-68.
- FASSIO, A., PATRY, L., CONGIA, S., ONOFRI, F., PITON, A., GAUTHIER, J., POZZI, D., MESSA, M., DEFRANCHI, E., FADDA, M., CORRADI, A., BALDELLI, P., LAPOINTE, L., ST-ONGE, J., MELOCHE, C., MOTTRON, L., VALTORTA, F., KHOA NGUYEN, D., ROULEAU, G. A., BENFENATI, F. & COSSETTE, P. 2011a. SYN1 loss-of-function mutations in autism and partial epilepsy cause impaired synaptic function. *Hum Mol Genet*, 20, 2297-307.
- FASSIO, A., RAIMONDI, A., LIGNANI, G., BENFENATI, F. & BALDELLI, P. 2011b. Synapsins: from synapse to network hyperexcitability and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol*, 22, 408-15.
- FERREIRA, A., KAO, H. T., FENG, J., RAPOPORT, M. & GREENGARD, P. 2000. Synapsin III: developmental expression, subcellular localization, and role in axon formation. *J Neurosci*, 20, 3736-44.
- FLORANCE, N. R., DAVIS, R. L., LAM, C., SZPERKA, C., ZHOU, L., AHMAD, S., CAMPEN, C. J., MOSS, H., PETER, N., GLEICHMAN, A. J., GLASER, C. A., LYNCH, D. R., ROSENFELD, M. R. & DALMAU, J. 2009. Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis in children and adolescents. *Ann Neurol*, 66, 11-8.
- FONT, B. & AUBERT-FOUCHER, E. 1989. Detection by chemical cross-linking of bovine brain synapsin I self-association. *Biochem J*, 264, 893-9.
- FRIED, G., NESTLER, E. J., DE CAMILLI, P., STJARNE, L., OLSON, L., LUNDBERG, J. M., HOKFELT, T., OUIOMET, C. C. & GREENGARD, P. 1982. Cellular and subcellular localization of protein I in the peripheral nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 2717-21.
- GARCIA, C. C., BLAIR, H. J., SEAGER, M., COULTHARD, A., TENNANT, S., BUDDLES, M., CURTIS, A. & GOODSHIP, J. A. 2004. Identification of a mutation in synapsin I, a synaptic vesicle protein, in a family with epilepsy. *J Med Genet*, 41, 183-6.
- GEIS, C., WEISHAUPT, A., HALLERMANN, S., GRUNEWALD, B., WESSIG, C., WULTSCH, T., REIF, A., BYTS, N., BECK, M., JABLONKA, S., BOETTGER, M. K., UCEYLER, N., FOUQUET, W., GERLACH, M., MEINCK, H. M., SIREN, A. L., SIGRIST, S. J., TOYKA, K. V., HECKMANN, M. & SOMMER, C. 2010. Stiff person syndrome-associated autoantibodies to amphiphysin mediate reduced GABAergic inhibition. *Brain*, 133, 3166-80.
- GITLER, D., TAKAGISHI, Y., FENG, J., REN, Y., RODRIGUIZ, R. M., WETSEL, W. C., GREENGARD, P. & AUGUSTINE, G. J. 2004a. Different presynaptic roles of synapsins at excitatory and inhibitory synapses. *J Neurosci*, 24, 11368-80.
- GITLER, D., XU, Y., KAO, H. T., LIN, D., LIM, S., FENG, J., GREENGARD, P. & AUGUSTINE, G. J. 2004b. Molecular determinants of synapsin targeting to presynaptic terminals. *J Neurosci*, 24, 3711-20.

- GODENSCHWEGE, T. A., REISCH, D., DIEGELMANN, S., EBERLE, K., FUNK, N., HEISENBERG, M., HOPPE, V., HOPPE, J., KLAGGES, B. R., MARTIN, J. R., NIKITINA, E. A., PUTZ, G., REIFEGERSTE, R., REISCH, N., RISTER, J., SCHAUPP, M., SCHOLZ, H., SCHWARZEL, M., WERNER, U., ZARS, T. D., BUCHNER, S. & BUCHNER, E. 2004. Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur J Neurosci*, 20, 611-22.
- GOMEZ-PINILLA, F., SO, V. & KESSLAK, J. P. 2001. Spatial learning induces neurotrophin receptor and synapsin I in the hippocampus. *Brain Res*, 904, 13-9.
- GRANEROD, J., AMBROSE, H. E., DAVIES, N. W., CLEWLEY, J. P., WALSH, A. L., MORGAN, D., CUNNINGHAM, R., ZUCKERMAN, M., MUTTON, K. J., SOLOMON, T., WARD, K. N., LUNN, M. P., IRANI, S. R., VINCENT, A., BROWN, D. W. & CROWCROFT, N. S. 2010. Causes of encephalitis and differences in their clinical presentations in England: a multicentre, population-based prospective study. *Lancet Infect Dis*, 10, 835-44.
- GREENLEE, J. E., CLAWSON, S. A., HILL, K. E., WOOD, B. L., TSUNODA, I. & CARLSON, N. G. 2010. Purkinje cell death after uptake of anti-Yo antibodies in cerebellar slice cultures. *J Neuropathol Exp Neurol*, 69, 997-1007.
- HAMANO, H., TANAKA, E., ISHIZAKA, N. & KAWA, S. 2018. IgG4-related Disease - A Systemic Disease that Deserves Attention Regardless of One's Subspecialty. *Intern Med*, 57, 1201-1207.
- HARA, M., ARINO, H., PETIT-PEDROL, M., SABATER, L., TITULAER, M. J., MARTINEZ-HERNANDEZ, E., SCHREURS, M. W., ROSENFELD, M. R., GRAUS, F. & DALMAU, J. 2017. DPPX antibody-associated encephalitis: Main syndrome and antibody effects. *Neurology*, 88, 1340-1348.
- HATTERER, E., DAVOUST, N., DIDIER-BAZES, M., VUAILLAT, C., MALCUS, C., BELIN, M. F. & NATAF, S. 2006. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood*, 107, 806-12.
- HAYCOCK, J. W., GREENGARD, P. & BROWNING, M. D. 1988. Cholinergic regulation of protein III phosphorylation in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurosci*, 8, 3233-9.
- HIROKAWA, N., SOBUE, K., KANDA, K., HARADA, A. & YORIFUJI, H. 1989. The cytoskeletal architecture of the presynaptic terminal and molecular structure of synapsin 1. *J Cell Biol*, 108, 111-26.
- HO, M. F., BAHLER, M., CZERNIK, A. J., SCHIEBLER, W., KEZDY, F. J., KAISER, E. T. & GREENGARD, P. 1991. Synapsin I is a highly surface-active molecule. *J Biol Chem*, 266, 5600-7.
- HÖLTJE, M., MERTENS, R., SCHOU, M. B., SAETHER, S. G., KOCHOVA, E., JARIUS, S., PRÜSS, H., KOMOROWSKI, L., PROBST, C., PAUL, F., BELLMANN-STROBL, J., GITLER, D., BENFENATI, F., PIEPGRAS, J., AHNERT-HILGER, G. & RUPRECHT, K. 2017. Synapsin-antibodies in psychiatric and neurological disorders: Prevalence and clinical findings. *Brain Behav Immun*, 66, 125-134.
- HOSAKA, M. & SÜDHOF, T. C. 1999. Homo- and heterodimerization of synapsins. *J Biol Chem*, 274, 16747-53.
- HUGHES, E. G., PENG, X., GLEICHMAN, A. J., LAI, M., ZHOU, L., TSOU, R., PARSONS, T. D., LYNCH, D. R., DALMAU, J. & BALICE-GORDON, R. J. 2010. Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurosci*, 30, 5866-75.
- HUIJBERS, M. G., ZHANG, W., KLOOSTER, R., NIKS, E. H., FRIESE, M. B., STRAASHEIJM, K. R., THIJSEN, P. E., VROLIJK, H., PLOMP, J. J., VOGELS, P., LOSEN, M., VAN DER MAAREL, S. M., BURDEN, S. J. & VERSCHUUREN, J. J. 2013. MuSK IgG4 autoantibodies cause myasthenia gravis by inhibiting binding between MuSK and Lrp4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20783-8.
- HUMEAU, Y., DOUSSAU, F., VITIELLO, F., GREENGARD, P., BENFENATI, F. & POULAIN, B. 2001. Synapsin controls both reserve and releasable synaptic vesicle pools during neuronal activity and short-term plasticity in Aplysia. *J Neurosci*, 21, 4195-206.

- HUTTNER, W. B., DEGENNARO, L. J. & GREENGARD, P. 1981. Differential phosphorylation of multiple sites in purified protein I by cyclic AMP-dependent and calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 256, 1482-8.
- HUTTNER, W. B. & GREENGARD, P. 1979. Multiple phosphorylation sites in protein I and their differential regulation by cyclic AMP and calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 5402-6.
- JOVANOVIĆ, J. N., BENFENATI, F., SIOW, Y. L., SIHRA, T. S., SANGHERA, J. S., PELECH, S. L., GREENGARD, P. & CZERNIK, A. J. 1996. Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3679-83.
- KAO, H. T., LI, P., CHAO, H. M., JANOSCHKA, S., PHAM, K., FENG, J., MCEWEN, B. S., GREENGARD, P., PIERIBONE, V. A. & PORTON, B. 2008. Early involvement of synapsin III in neural progenitor cell development in the adult hippocampus. *J Comp Neurol*, 507, 1860-70.
- KETZEF, M. & GITLER, D. 2014. Epileptic synapsin triple knockout mice exhibit progressive long-term aberrant plasticity in the entorhinal cortex. *Cereb Cortex*, 24, 996-1008.
- KETZEF, M., KAHN, J., WEISSBERG, I., BECKER, A. J., FRIEDMAN, A. & GITLER, D. 2011. Compensatory network alterations upon onset of epilepsy in synapsin triple knock-out mice. *Neuroscience*, 189, 108-22.
- KIDA, S., PANTAZIS, A. & WELLER, R. O. 1993. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19, 480-8.
- KIELLAND, A., ERISIR, A., WALAAS, S. I. & HEGGELUND, P. 2006. Synapsin utilization differs among functional classes of synapses on thalamocortical cells. *J Neurosci*, 26, 5786-93.
- KIPNIS, J., GADANI, S. & DERECKI, N. C. 2012. Pro-cognitive properties of T cells. *Nat Rev Immunol*, 12, 663-9.
- KONECZNY, I. 2018. A New Classification System for IgG4 Autoantibodies. *Front Immunol*, 9, 97.
- KRABBEN, L., FASSIO, A., BHATIA, V. K., PECHSTEIN, A., ONOFRI, F., FADDA, M., MESSA, M., RAO, Y., SHUPLIAKOV, O., STAMOU, D., BENFENATI, F. & HAUCKE, V. 2011. Synapsin I senses membrane curvature by an amphipathic lipid packing sensor motif. *J Neurosci*, 31, 18149-54.
- KUSHNER, S. A., ELGERSMA, Y., MURPHY, G. G., JAARSMA, D., VAN WOERDEN, G. M., HOJJATI, M. R., CUI, Y., LEBOUTILLIER, J. C., MARRONE, D. F., CHOI, E. S., DE ZEEUW, C. I., PETIT, T. L., POZZO-MILLER, L. & SILVA, A. J. 2005. Modulation of presynaptic plasticity and learning by the H-ras/extracellular signal-regulated kinase/synapsin I signaling pathway. *J Neurosci*, 25, 9721-34.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680.
- LAI, M., HUGHES, E. G., PENG, X., ZHOU, L., GLEICHMAN, A. J., SHU, H., MATA, S., KREMENS, D., VITALIANI, R., GESCHWIND, M. D., BATALLER, L., KALB, R. G., DAVIS, R., GRAUS, F., LYNCH, D. R., BALICE-GORDON, R. & DALMAU, J. 2009. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Ann Neurol*, 65, 424-34.
- LANCASTER, E., MARTINEZ-HERNANDEZ, E. & DALMAU, J. 2011. Encephalitis and antibodies to synaptic and neuronal cell surface proteins. *Neurology*, 77, 179-89.
- LEWITUS, G. M., COHEN, H. & SCHWARTZ, M. 2008. Reducing post-traumatic anxiety by immunization. *Brain Behav Immun*, 22, 1108-14.
- LEYPOLDT, F., ARMANGUE, T. & DALMAU, J. 2015. Autoimmune encephalopathies. *Ann N Y Acad Sci*, 1338, 94-114.
- LI, L., CHIN, L. S., SHUPLIAKOV, O., BRODIN, L., SIHRA, T. S., HVALBY, O., JENSEN, V., ZHENG, D., MCNAMARA, J. O., GREENGARD, P. & ET AL. 1995. Impairment of synaptic vesicle clustering and

- of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9235-9.
- LOHMANN, S. M., UEDA, T. & GREENGARD, P. 1978. Ontogeny of synaptic phosphoproteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 4037-41.
- MANDELL, J. W., CZERNIK, A. J., DE CAMILLI, P., GREENGARD, P. & TOWNES-ANDERSON, E. 1992. Differential expression of synapsins I and II among rat retinal synapses. *J Neurosci*, 12, 1736-49.
- MANTO, M., DALMAU, J., DIDELOT, A., ROGEMOND, V. & HONNORAT, J. 2010. In vivo effects of antibodies from patients with anti-NMDA receptor encephalitis: further evidence of synaptic glutamatergic dysfunction. *Orphanet J Rare Dis*, 5, 31.
- MATSUBARA, M., KUSUBATA, M., ISHIGURO, K., UCHIDA, T., TITANI, K. & TANIGUCHI, H. 1996. Site-specific phosphorylation of synapsin I by mitogen-activated protein kinase and Cdk5 and its effects on physiological functions. *J Biol Chem*, 271, 21108-13.
- MATSUMOTO, K., EBIHARA, K., YAMAMOTO, H., TABUCHI, H., FUKUNAGA, K., YASUNAMI, M., OHKUBO, H., SHICHIRI, M. & MIYAMOTO, E. 1999. Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem*, 274, 2053-9.
- MATUS-LEIBOVITCH, N., NEVO, I. & VOGEL, Z. 1997. Differential distribution of synapsin IIa and IIb mRNAs in various brain structures and the effect of chronic morphine administration on the regional expression of these isoforms. *Brain Res Mol Brain Res*, 45, 301-16.
- MERBL, Y., ZUCKER-TOLEDANO, M., QUINTANA, F. J. & COHEN, I. R. 2007. Newborn humans manifest autoantibodies to defined self molecules detected by antigen microarray informatics. *J Clin Invest*, 117, 712-8.
- MICHELS, B., DIEGELMANN, S., TANIMOTO, H., SCHWENKERT, I., BUCHNER, E. & GERBER, B. 2005. A role for Synapsin in associative learning: the Drosophila larva as a study case. *Learn Mem*, 12, 224-31.
- MONSTAD, S. E., KNUDSEN, A., SALVESEN, H. B., AARSETH, J. H. & VEDELER, C. A. 2009. Onconeural antibodies in sera from patients with various types of tumours. *Cancer Immunol Immunother*, 58, 1795-800.
- NATAF, S. 2017a. Autoimmunity as a Driving Force of Cognitive Evolution. *Front Neurosci*, 11, 582.
- NATAF, S. 2017b. Evolution, immunity and the emergence of brain superautoantigens. *F1000Res*, 6, 171.
- NESTLER, E. J. & GREENGARD, P. 1982. Distribution of protein I and regulation of its state of phosphorylation in the rabbit superior cervical ganglion. *J Neurosci*, 2, 1011-23.
- OHKAWA, T., FUKATA, Y., YAMASAKI, M., MIYAZAKI, T., YOKOI, N., TAKASHIMA, H., WATANABE, M., WATANABE, O. & FUKATA, M. 2013. Autoantibodies to epilepsy-related LGI1 in limbic encephalitis neutralize LGI1-ADAM22 interaction and reduce synaptic AMPA receptors. *J Neurosci*, 33, 18161-74.
- OLSON, B. J. & MARKWELL, J. 2007. Assays for determination of protein concentration. *Curr Protoc Protein Sci*, Chapter 3, Unit 3.4.
- ONOFRI, F., MESSA, M., MATAFORA, V., BONANNO, G., CORRADI, A., BACHI, A., VALTORTA, F. & BENFENATI, F. 2007. Synapsin phosphorylation by SRC tyrosine kinase enhances SRC activity in synaptic vesicles. *J Biol Chem*, 282, 15754-67.
- PERDAHL, E., ADOLFSSON, R., ALAFUZOFF, I., ALBERT, K. A., NESTLER, E. J., GREENGARD, P. & WINBLAD, B. 1984. Synapsin I (protein I) in different brain regions in senile dementia of Alzheimer type and in multi-infarct dementia. *J Neural Transm*, 60, 133-41.

- PETIT-PEDROL, M., ARMANGUE, T., PENG, X., BATALLER, L., CELLUCCI, T., DAVIS, R., MCCRACKEN, L., MARTINEZ-HERNANDEZ, E., MASON, W. P., KRUEER, M. C., RITACCO, D. G., GRISOLD, W., MEANEY, B. F., ALCALA, C., SILLEVIS-SMITT, P., TITULAER, M. J., BALICE-GORDON, R., GRAUS, F. & DALMAU, J. 2014. Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABAA receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol*, 13, 276-86.
- PIEPGRAS, J., HÖLTJE, M., OTTO, C., HARMS, H., SATAPATHY, A., CESCA, F., BENFENATI, F., GITLER, D., PICH, A., ZANDER, J. F., AHNERT-HILGER, G. & RUPRECHT, K. 2015. Intrathecal immunoglobulin A and G antibodies to synapsin in a patient with limbic encephalitis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2, e169.
- PIERIBONE, V. A., SHUPLIAKOV, O., BRODIN, L., HILFIKER-ROTHENFLUH, S., CZERNIK, A. J. & GREENGARD, P. 1995. Distinct pools of synaptic vesicles in neurotransmitter release. *Nature*, 375, 493-7.
- POLAK, T., SCHLAF, G., SCHOLL, U., KROME-CESAR, C., MADER, M., FELGENHAUER, K. & WEBER, F. 2001. Characterization of the human T cell response against the neuronal protein synapsin in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 115, 176-81.
- POPE, B. & KENT, H. M. 1996. High efficiency 5 min transformation of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, 24, 536-7.
- PORTON, B., KAO, H. T. & GREENGARD, P. 1999. Characterization of transcripts from the synapsin III gene locus. *J Neurochem*, 73, 2266-71.
- PRÜSS, H., HÖLTJE, M., MAIER, N., GOMEZ, A., BUCHERT, R., HARMS, L., AHNERT-HILGER, G., SCHMITZ, D., TERBORG, C., KOPP, U., KLINGBEIL, C., PROBST, C., KOHLER, S., SCHWAB, J. M., STOECKER, W., DALMAU, J. & WANDINGER, K. P. 2012. IgA NMDA receptor antibodies are markers of synaptic immunity in slow cognitive impairment. *Neurology*, 78, 1743-53.
- QIN, S., HU, X. Y., XU, H. & ZHOU, J. N. 2004. Regional alteration of synapsin I in the hippocampal formation of Alzheimer's disease patients. *Acta Neuropathol*, 107, 209-15.
- RADJAVI, A., SMIRNOV, I. & KIPNIS, J. 2014. Brain antigen-reactive CD4+ T cells are sufficient to support learning behavior in mice with limited T cell repertoire. *Brain Behav Immun*, 35, 58-63.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- ROMANO, C., NICHOLS, R. A., GREENGARD, P. & GREENE, L. A. 1987. Synapsin I in PC12 cells. I. Characterization of the phosphoprotein and effect of chronic NGF treatment. *J Neurosci*, 7, 1294-9.
- ROSAHL, T. W., GEPPERT, M., SPILLANE, D., HERZ, J., HAMMER, R. E., MALENKA, R. C. & SÜDHOF, T. C. 1993. Short-term synaptic plasticity is altered in mice lacking synapsin I. *Cell*, 75, 661-70.
- ROSAHL, T. W., SPILLANE, D., MISSLER, M., HERZ, J., SELIG, D. K., WOLFF, J. R., HAMMER, R. E., MALENKA, R. C. & SÜDHOF, T. C. 1995. Essential functions of synapsins I and II in synaptic vesicle regulation. *Nature*, 375, 488-93.
- ROUSSEAU, A., BENYAHIA, B., DALMAU, J., CONNAN, F., GUILLET, J. G., DELATTRE, J. Y. & CHOPPIN, J. 2005. T cell response to Hu-D peptides in patients with anti-Hu syndrome. *J Neurooncol*, 71, 231-6.
- RÜCHEL, R., STEERE, R. L. & ERBE, E. F. 1978. Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels. *Journal of Chromatography A*, 166, 563-575.

- SCHOU, M., SAETHER, S. G., BOROWSKI, K., TEEGEN, B., KONDZIELLA, D., STOECKER, W., VAALER, A. & REITAN, S. K. 2016. Prevalence of serum anti-neuronal autoantibodies in patients admitted to acute psychiatric care. *Psychol Med*, 46, 3303-3313.
- SILLEVIS SMITT, P. A., MANLEY, G. T. & POSNER, J. B. 1995. Immunization with the paraneoplastic encephalomyelitis antigen HuD does not cause neurologic disease in mice. *Neurology*, 45, 1873-8.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- STAPLE, J. K., OSEN-SAND, A., BENFENATI, F., PICH, E. M. & CATSICAS, S. 1997. Molecular and functional diversity at synapses of individual neurons in vitro. *Eur J Neurosci*, 9, 721-31.
- STONE, L. M., BROWNING, M. D. & FINGER, T. E. 1994. Differential distribution of the synapsins in the rat olfactory bulb. *J Neurosci*, 14, 301-9.
- SÜDHOF, T. C. 1990. The structure of the human synapsin I gene and protein. *J Biol Chem*, 265, 7849-52.
- SÜDHOF, T. C., CZERNIK, A. J., KAO, H. T., TAKEI, K., JOHNSTON, P. A., HORIUCHI, A., KANAZIR, S. D., WAGNER, M. A., PERIN, M. S., DE CAMILLI, P. & ET AL. 1989. Synapsins: mosaics of shared and individual domains in a family of synaptic vesicle phosphoproteins. *Science*, 245, 1474-80.
- TSOU, K. & GREENGARD, P. 1982. Regulation of phosphorylation of proteins I, IIIa, and IIIb in rat neurohypophysis in vitro by electrical stimulation and by neuroactive agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 6075-9.
- ULLRICH, B. & SÜDHOF, T. C. 1995. Differential distributions of novel synaptotagmins: comparison to synapsins. *Neuropharmacology*, 34, 1371-7.
- VACCARO, P., DENTE, L., ONOFRI, F., ZUCCONI, A., MARTINELLI, S., VALTORTA, F., GREENGARD, P., CESARENI, G. & BENFENATI, F. 1997. Anti-synapsin monoclonal antibodies: epitope mapping and inhibitory effects on phosphorylation and Grb2 binding. *Brain Res Mol Brain Res*, 52, 1-16.
- VAN SONDEREN, A., ARINO, H., PETIT-PEDROL, M., LEYPOLDT, F., KORTVELYESSY, P., WANDINGER, K. P., LANCASTER, E., WIRTZ, P. W., SCHREURS, M. W., SILLEVIS SMITT, P. A., GRAUS, F., DALMAU, J. & TITULAER, M. J. 2016. The clinical spectrum of Caspr2 antibody-associated disease. *Neurology*, 87, 521-8.
- VAWTER, M. P., THATCHER, L., USEN, N., HYDE, T. M., KLEINMAN, J. E. & FREED, W. J. 2002. Reduction of synapsin in the hippocampus of patients with bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 7, 571-8.
- VOLTZ, R., DALMAU, J., POSNER, J. B. & ROSENFELD, M. R. 1998. T-cell receptor analysis in anti-Hu associated paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurology*, 51, 1146-50.
- WANG, S., CESCO, F., LOERS, G., SCHWEIZER, M., BUCK, F., BENFENATI, F., SCHACHNER, M. & KLEENE, R. 2011. Synapsin I is an oligomannose-carrying glycoprotein, acts as an oligomannose-binding lectin, and promotes neurite outgrowth and neuronal survival when released via glia-derived exosomes. *J Neurosci*, 31, 7275-90.
- WEICHSELBAUM, T. E. 1946. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pathol*, 10, 40-9.
- WERNER, C., PAULI, M., DOOSE, S., WEISHAUPT, A., HASELMANN, H., GRUNEWALD, B., SAUER, M., HECKMANN, M., TOYKA, K. V., ASAN, E., SOMMER, C. & GEIS, C. 2016. Human autoantibodies to amphiphysin induce defective presynaptic vesicle dynamics and composition. *Brain*, 139, 365-79.

- WIECHELMAN, K. J., BRAUN, R. D. & FITZPATRICK, J. D. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem*, 175, 231-7.
- YAMADA, S., DEPASQUALE, M., PATLAK, C. S. & CSERR, H. F. 1991. Albumin outflow into deep cervical lymph from different regions of rabbit brain. *Am J Physiol*, 261, H1197-204.
- ZURMOHLE, U., HERMS, J., SCHLINGENSIEPEN, R., BRYSCH, W. & SCHLINGENSIEPEN, K. H. 1996. Changes in the expression of synapsin I and II messenger RNA during postnatal rat brain development. *Exp Brain Res*, 108, 441-9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sarah Melchert, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von Autoantikörpern gegen das neuronale Protein Synapsin hinsichtlich ihrer Epitopspezifität und ihrer Klassenzugehörigkeit“ Selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgter Publikation

Sarah Melchert hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Autoren:

Robert Mertens*, Sarah Melchert*, Daniel Gitler, Morten Brix Schou, Sverre Georg Saether, Arne Vaaler, Johannes Piepgras, Elena Kochova, Fabio Benfenati, Gudrun Ahnert-Hilger, Klemens Ruprecht, Markus Höltje

*gleichberechtigte Autoren

Titel:

Epitope specificity of anti-synapsin autoantibodies: Differential targeting of synapsin I domains

Zeitschrift:

Plos One

Erscheinungsdatum:

13.12.2018

Beitrag im Einzelnen:

In der vorliegenden Publikation wurden die Epitopspezifität und Verteilung der IgG-Unterklassen von Autoantikörpern gegen das synaptische Protein Synapsin in Blutseren und Liquorproben von Patienten mit unterschiedlichen psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen untersucht.

Nachdem Herr Mertens die initialen Versuche zur Eignung des verwendeten Zell-basierten Assays an Patientenseren erfolgreich durchgeführt hatte, wurden von mir eigenständig sämtliche zur Verfügung stehenden Serum- und Liquorproben mit Autoantikörpern gegen Synapsin wiederholt (4-8 unabhängige Versuchsdurchläufe je Synapsin-Konstrukt wurden ausgewertet) an transfizierten HEK Zellen ausgetestet, um eine sichere Aussage über die Reaktivität mit den einzelnen Konstrukten erhalten zu können. Zusätzlich wurden von mir kompetente E.coli Zellen mit Plasmid DNA re-transformiert, um die Synapsin-Konstrukte in für die Versuche ausreichender Menge bereitzustellen. Weiterhin führte ich sämtliche Versuche durch, um Aussagen über die Verteilung der IgG Subklassen hinsichtlich ihrer Verteilung zwischen den Patienten und der Reaktivität gegen die individuellen Synapsin-Domänen treffen zu können. Hierfür wurden Subklassenspezifische Sekundärantikörper in der Immunfluoreszenz verwendet. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sowie die Erstellung der Abbildungen für die Publikation wurden von mir unter Mithilfe von Herrn Höltje durchgeführt. Weiterhin war ich an der Konzeption und Revision des Manuskriptes beteiligt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

Publikationsliste:

Mertens, R., Melchert, S., Gitler D., Schou, M. B., Saether, S. G., Vaaler, A., Piepgras J., Kochova, E., Benfenati, F., Ahnert-Hilger, G., Ruprecht, K. & Höltje, M. 2018. Epitope specificity of anti-synapsin autoantibodies: Differential targeting of synapsin I domains. *PLoS One*, 13, e0208636.

Danksagung:

Ich danke PD Dr. Markus Höltje für die Bereitstellung des Themas und für die engagierte Betreuung. Außerdem danke ich den Kollegen für das angenehme Arbeitsklima, insbesondere Marion Möbes, Birgit Metze und Antje Dräger für die tatkräftige Unterstützung und Prof. Grudrun Ahnert-Hilger für die interessanten Anregungen. Mein Dank geht auch an meine Freunde und meine Familie für Beistand und Unterstützung.