

Aus dem Institut für Neuropathologie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. W. J. Schulz-Schaeffer

**Detektion von pathologischen α -Synukleinaggregaten in der
Unterkieferspeicheldrüse zur Diagnose
der Parkinson-Krankheit**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Mykola Gorbachuk

geb. am: 14.12.1994 in Slowjansk

Tag der Promotion: 14.12.2022

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. J. Schulz-Schaeffer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Riemenschneider

Widmung

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
1.1. Deutsche Zusammenfassung	1
1.2. Abstract.....	2
2. EINLEITUNG	4
2.2. Neurodegenerative Erkrankungen	4
2.3. Morbus Parkinson.....	5
2.3.1 Terminologie.....	5
2.3.2 Epidemiologie	6
2.3.3 Klinik des Morbus Parkinson.....	7
2.3.4 Pathophysiologie.....	10
2.3.5 α -Synuklein als synaptisches Protein.....	13
2.3.6 Genetische Varianten	18
2.3.7 Diagnose	19
2.4. Ziel der Arbeit / Fragestellung.....	23
2.5. Material und Probenherkunft.....	24
2.5.3 Probenherkunft.....	24
2.5.4 Verwendetes Material	26
2.6. Methoden	27
2.6.5 Probeentnahme und Probenaufbereitung	27
2.6.6 Immunhistochemische Färbungen	27
2.6.7 Paraffin Embedded Tissue Blot	32
2.6.8 Statistische Auswertung.....	35

3. ERGEBNISSE	36
3.2. Deskriptiver Befund der Durchlichtmikroskopie	36
3.2.9 HE Färbung.....	36
3.2.10 Immunhistochemische Färbung.....	36
3.3. Deskriptiver Befund mittels Auflichtmikroskopie (PET-Blot)	41
3.4. Detektion der α -Synukleinaggregaten	44
3.5. Mindestfläche der Speicheldrüsenbiopsie	49
4. DISKUSSION	55
4.2. Die Unterkieferspeicheldrüse als geeignetes Organ für eine Biopsie mit neuronalem Gewebe	59
4.3. Methode der Wahl	59
4.4. Prävalenz und Korrelation zur Erkrankungsdauer.....	61
4.5. Biopsie-Mindestfläche	63
4.6. Fazit	65
5. LITERATURVERZEICHNIS	66
6. ANHANG.....	79
6.2. Abkürzungsverzeichnis.....	79
6.3. Lösungen.....	80
6.3.11 Histologische Lösungen.....	80
6.3.12 Reagenzien Immunhistochemischen Färbungen.....	80
6.3.13 Reagenzien und Lösungen für PET-Blot	81
6.4. Verwendete Chemikalien.....	82

6.5. Grafikverzeichnis.....	82
6.6. Abbildungsverzeichnis	83
6.7. Tabellenverzeichnis	83
7. PUBLIKATION / DANKSAGUNG	85
7.2. Publikation.....	85
7.3. Danksagung	86
8. LEBENSLAUF	87

1. Zusammenfassung

1.1. Deutsche Zusammenfassung

Trotz der Einführung gut definierter Diagnosekriterien, bleibt die klinische Diagnose der idiopathischen Parkinson-Krankheit und Lewy-Körperchen Demenz, vor allem im frühen Stadium der Erkrankung, weiterhin anspruchsvoll. Eine zentrale Herausforderung der Parkinson-Forschung besteht daher darin, zuverlässige Biomarker für die Diagnose zu identifizieren und zu validieren. In dieser Studie wurde die Eignung der Unterkieferspeicheldrüsenbiopsie für Diagnose der idiopathischen Parkinson-Krankheit und Lewy-Körperchen Demenz überprüft. Dafür wurde das Vorkommen der α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse untersucht und die verschiedenen Methoden zum Nachweis dieser Aggregate für die Unterkieferspeicheldrüse adaptiert und miteinander verglichen.

Bei 12 von 14 Fällen der Untersuchungsgruppe ließen sich unabhängig von der Nachweismethode oder dem verwendeten Antikörper immunreaktive Strukturen nachweisen. Es wurde jedoch gezeigt, dass durch eine hohe Proteinase K Konzentration bei der Vorbehandlung und durch die Bindungsfähigkeit der Nitrozellulosemembran die Paraffin Embedded Tissue Blot (PET-Blot) Färbung in der Lage ist, deutlich mehr Aggregate zu detektieren als die konventionelle Immunhistochemie. Da die Ergebnisse daraufhin deuten, dass nicht alle α -Synukleinaggregate mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein markiert werden können, sollte im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik die PET-Blot Färbung mit dem 10D2 Antikörper verwendet werden. Die Menge der mit dieser Methode sichtbar gemachten α -Synukleinaggregate ist im Vergleich zu den anderen Methoden deutlich größer.

Die Größe der Biopsie ist ein entscheidender Parameter. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Mindestgröße der Biopsie von der Nachweismethode und dem verwendeten Antikörper abhängt. Die für die Detektion der α -Synuklein-Pathologie mit der PET-Blot Färbung mit dem 10D2 Antikörper ausgerechnete Gewebs-Mindestfläche beträgt 6,63 mm². Ein Gewebstück mit solcher Schnittfläche kann problemlos mit einer konventionellen Nadelbiopsie gewonnen werden. Die ausgerechneten Mindestgrößen bei Verwendung anderer Nachweismethoden sind fast doppelt so groß. Darüber hinaus verdeutlichen die Ergebnisse dieser Studie, dass α -Synukleinaggregate nicht auf größere Nerven beschränkt sind und in den kleinen Neuriten des Submandibularis-Drüsengewebes in signifikanter Menge nachgewiesen werden können. Demnach können auch Biopsie-Proben ausschließlich mit Drüsenparenchym ohne

Nervenfaszikel für eine neuropathologische Diagnose der Parkinson-Krankheit oder Lewy-Körperchen Demenz verwendet werden.

Die Ergebnisse dieser Studie weisen darauf hin, dass die Unterkieferspeicheldrüse eine geeignete Biopsiestelle für den α -Synuklein-Aggregatnachweis bei der Parkinson-Krankheit und Lewy-Körperchen Demenz Diagnostik ist. Sie liefern zudem grundlegende Informationen zu Nachweismethode und Biopsie-Mindestfläche für weitere Studien an lebenden Patienten. Von besonderer Bedeutung ist der Hinweis, dass nur ein Teil der α -Synukleinaggregate mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein detektiert werden kann. Das abschließende Ziel ist die Ermöglichung der Verwendung der Unterkieferspeicheldrüsen-Nadelbiopsien sowohl als diagnostischer Biomarker für die idiopathische Parkinson-Krankheit und die Lewy-Körperchen Demenz als auch als Mittel zur Validierung anderer potenzieller Biomarker für diese Krankheiten.

1.2. Abstract

Detection of pathological α -synuclein aggregates in the submandibular gland for the diagnosis of Parkinson's disease.

The sensitivity of clinical diagnosis of Parkinson's disease (PD) and Lewy body dementia (DLB) especially in the initial phase remains unsatisfactory. A key challenge is therefore to identify and validate biomarkers that would enable a reliable diagnosis at early stages of the disease. In this study the suitability of the submandibular gland for diagnostic biopsies in PD was reviewed and staining methods were compared in their ability to detect α -synuclein aggregates.

Immunoreactive structures were present in 12 out of 14 diagnostic group cases and in none of the controls regardless of staining method or antibody. It was shown that due to a high proteinase K concentration during pretreatment and the binding ability of the nitrocellulose membrane, Paraffin-Embedded-Tissue-Blot (PET-Blot) staining is able to detect significantly more aggregates than conventional immunohistochemistry. Because the results indicate that not all α -synuclein aggregates can be labeled with an antibody against phosphorylated α -synuclein, PET-Blot staining with the 10D2 antibody should be used for neuropathological diagnosis. The amount of α -synuclein aggregates visualized by this method was significantly larger compared with the other staining methods.

The size of the biopsy is a crucial issue. In this study, it was shown that the minimum size of the biopsy depends on the staining method and the antibody used. The minimum tissue size calculated for the detection of α -synuclein pathology in the submandibular gland by PET-Blot staining with the 10D2 antibody is 6.63 mm². A piece of tissue of this size can be easily obtained with a conventional needle biopsy. The calculated minimum biopsy size using other methods was almost twice as large. Furthermore, the results of this study illustrate that α -synuclein aggregates are not restricted to larger nerves and can be detected in significant amounts in the small neurites of submandibular gland tissue. Accordingly, biopsy specimens containing only glandular parenchyma without nerve fascicles can also be used for a neuropathological diagnosis of PD and DLB.

The results of this study indicate the feasibility of submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson's disease or Lewy body dementia. They also provide essential information on staining method and biopsy size for further studies especially on living patients. Of particular importance is the indication that only a portion of α -synuclein aggregates can be detected with an antibody against phosphorylated α -synuclein. The final goal is to enable the use of the submandibular gland needle biopsies both as a diagnostic biomarker for iPD and DLB and as means to validate other potential biomarkers for these diseases.

2. Einleitung

2.2. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind eine Vielzahl von Erkrankungen, die durch eine progressive Dysfunktion und den Zelltod von Neuronen charakterisiert sind. Diese betreffen zusätzlich zum zentralen Nervensystem auch das periphere und enterische Nervensystem. Erkrankungen mit einer bekannten vaskulären, toxischen, metabolischen, infektiösen oder autoimmunen Ursache sind per Definition aus dieser Gruppe ausgeschlossen (SANDMANN-KEIL, BRAAK, 2005; ELLISON et al., 2013). Neurodegenerative Erkrankungen beginnen an bestimmten Induktionsstellen und breiten sich von dort in andere Regionen des menschlichen Nervensystems aus. So finden sich beim Morbus Alzheimer die ersten pathologischen Veränderungen in der transenthorinalen Region im Temporallappen. Von hier dringt die Pathologie in das Ammonshorn und Neokortex ein (BRAAK, BRAAK, 1995). Beim Morbus Parkinson sind die Läsionen initial in den Nuclei dorsalis nervi vagi und nervi glossopharyngei und im Nucleus olfactorius anterior zu finden. Heutzutage wird auch diskutiert, ob die α -Synuklein Pathologie prionenartig aus dem enterischen Nervensystem zum Nucleus dorsalis nervi vagi und daraus in die rostralen Regionen des Nervensystems aufsteigt (BRAAK et al., 2003; CERSOSIMO, BENARROCH, 2012). Obwohl die genaueren Mechanismen der Ausbreitung bei den Neurodegenerativen Erkrankungen noch nicht bekannt sind, werden viele Möglichkeiten aktiv diskutiert: z.B. beim Morbus Parkinson der retrograde axonale Transport (MAHLKNECHT et al., 2015; SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Neurodegenerative Erkrankungen betreffen primär nur prädisponierte Nervenzelltypen in bestimmten Regionen des menschlichen Nervensystems, was zu der für die Erkrankung typischen Symptomatik führt (BRAAK et al., 2004). So sind es bei der amyotrophen Lateralsklerose die Motoneuronen der Vorderhörner im Rückenmark und die Motoneurone des motorischen Kortex, was den zunehmenden Ausfall der Innervation der Skelettmuskulatur zur Folge hat. Es gibt eine bemerkenswerte Überlappung in klinischen und pathologischen Merkmalen von neurodegenerativen Erkrankungen. Bestimmte klinische Phänotypen sind mit verschiedenen Typen von pathologischen Veränderungen assoziiert. So entstehen die klinischen Merkmale vom Parkinson-Syndrom am häufigsten wegen der Ansammlung von fehlgefaltetem α -Synuklein in der Synapse. Sie können aber z.B. auch durch einige Krankheiten, die durch neurofibrilläre Tangles charakterisiert sind (z.B. progressive supranukleäre Blickparese), hervorgerufen werden. Dies führt dazu, dass die Patienten oft falsch diagnostiziert werden. Auf der anderen Seite kann eine neurodegenerative Erkrankung mehrere klinische Phänotypen haben. Die Region des menschlichen Nervensystems, die durch eine bestimmte Pathologie befallen ist, macht die Symptomatik aus: z.B. können synaptische α -

Synukleinaggregate Demenz, typische motorische Symptome vom Morbus Parkinson oder ein vegetatives Symptom, wie die Obstipation, verursachen (ELLISON et al., 2013).

2.3. Morbus Parkinson

2.3.1 Terminologie

Im Jahr 1817 veröffentlichte James Parkinson seine Monographie: "An essay on the shaking palsy" (Ein Aufsatz über die Schüttellähmung). In diesem Bericht beschrieb er eine neurologische Erkrankung, die aus einem Ruhetremor und einer besonderen Form einer progressiven motorischen Behinderung besteht. Später wurde diese Erkrankung nach ihm benannt. Bemerkenswert ist, dass seine eindringlichen Beobachtungen auf nur sechs Individuen basierten, von denen er drei nur auf den Straßen von London gesehen hat (SAMII et al., 2004). Heute unterscheidet man die idiopathische Parkinson-Krankheit, die familiäre Parkinson-Krankheit, das sekundäre Parkinson-Syndrom sowie das atypische Parkinson-Syndrom (auch Parkinson-Plus-Syndrom genannt). Die aktuelle Definition des Parkinson-Syndroms besagt, dass das Kardinalsymptom die Bradykinese oder Akinese mit wenigstens einem der anderen Symptome aus Rigor, Tremor oder der posturalen Instabilität, zusammen auftritt. Daneben sind verschiedene vegetative, psychische und kognitive Störungen möglich. Der häufigste Grund (ca. 75% der Fälle) für die oben genannten Symptome ist die idiopathische Parkinson-Krankheit. Bei genetisch bedingten, also vererbaren Formen, spricht man von einer familiären Parkinson-Krankheit. Liegt indes eine bestimmbar äußere Ursache zugrunde, spricht man von einem sekundären oder symptomatischen Parkinson-Syndrom. So kann ein sekundäres Parkinson-Syndrom medikamenteninduziert (z.B. durch Neuroleptika mit Dopamin-Antagonismus) oder toxininduziert (z.B. durch MPTP) sein. Es kann eine vaskuläre (z.B. bei der zerebralen Mikroangiopathie), eine posttraumatische (z.B. bei der Boxerkrankheit), eine entzündliche (z.B. bei der fortschreitenden HIV-Enzephalopathie) oder eine metabolische (z.B. beim Morbus Gaucher) Ursache zugrunde liegen. Parkinson-Plus-Syndrome beziehen sich auf Krankheiten, die Parkinsonismus in Kombination mit anderen klinischen Symptomen aufweisen. Dazu gehören die Demenz mit Lewy-Körpern, Multisystematrophie, progressive supranukleäre Lähmung (PSP) und die kortikobasale Degeneration. Interessanterweise gehören die PSP und die kortikobasale Degeneration zu den sogenannten Tauopathien und haben im Gegensatz zum Morbus Parkinson eine äußerst unterschiedliche Pathophysiologie. Ungefähr 8% aller Patienten, die klinisch mit der Parkinson-Krankheit diagnostiziert werden, sind an PSP erkrankt und ca. 20% an MSA (SAMII et al., 2004; ELLISON et al., 2013). Dies zeigt, dass die klinische Diagnose von Morbus Parkinson bisher nicht genau ist und unterstreicht die Wichtigkeit der Suche nach zuverlässigen Biomarkern zur Diagnosesicherung.

2.3.2 Epidemiologie

Mit einer Prävalenz von 1% bei den über 60-Jährigen und 4% bei den über 85-Jährigen ist die Parkinson-Krankheit weltweit gesehen die am zweithäufigsten vorkommende neurodegenerative Erkrankung (DE LAU, BRETELER, 2006). Das mittlere Erkrankungsalter beträgt 61 Jahre und die mittlere Erkrankungsdauer beträgt ca. 13 Jahre (ELLISON et al., 2013). Die Mortalität bei betroffenen Personen ist zwei- bis fünfmal höher als bei gleichaltrigen Kontrollen. Dies zeigt, dass die Lebenserwartung deutlich verringert ist (MORENS et al., 1996). Es wird in der Tat prognostiziert, dass neurodegenerative Erkrankungen (Parkinson-Krankheit, Motoneuron-Krankheit und Demenz) bis zum Jahr 2040 Krebs als am zweithäufigsten vorkommende Todesursache bei betagten Personen übertreffen werden (LILIENFELD, PERL, 1994). Die Inzidenz steigt mit dem Alter und beträgt in Nordamerika und Europa 7-19 / 100.000 pro Jahr. Die Parkinson-Krankheit tritt weltweit in allen ethnischen Gruppen auf und betrifft beide Geschlechter in etwa gleich. Diskutiert wird eine leicht höhere Prävalenz im männlichen Geschlecht (ZHANG, ROMAN, 1993). Manifestieren sich die Krankheitszeichen vor dem 40. Lebensjahr, so spricht man von „young onset Parkinson’s disease“. Dies ist der Fall bei fünf bis zehn Prozent der Patienten (LANG, LOZANO, 1998). Obwohl alle ethnischen Gruppen von der Parkinson-Krankheit betroffen sind liegt die Inzidenz bei den Weißen deutlich höher als bei den Afrikanern und Asiaten (LANG, LOZANO, 1998). In der Literatur finden sich unterschiedliche Daten zur Prävalenz von Morbus Parkinson bei verschiedenen ethnischen Gruppen. Bei den Weißen variiert die Prävalenz je nach Quelle zwischen 100-600/100.000 Einwohner (ERREA et al., 1999; ELLISON et al., 2013); bei den Asiaten beträgt die Prävalenz 146/100.000 E. (YAMAWAKI et al., 2009) und bei den Farbigen 67/100.000 E (ELLISON et al., 2013). In Australien wird eine besonders hoher Prävalenz beschrieben: bis zu 414/100.000E. In Australien gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten und Kontrollgruppen bei variierender Exposition gegenüber Herbiziden und Pestiziden, Kopfverletzungen, Rauchen oder Depressionen. Der einzige signifikante Risikofaktor für Parkinson-Krankheit war eine positive Familienanamnese (MCCANN et al., 1998). Dies deutet darauf hin, dass es sich um eine vermehrte Prävalenz von familiärem Morbus Parkinson handelt. Die Ursache dafür könnte die Tatsache sein, dass Australien für eine sehr lange Zeit schwer erreichbar war und die Einwanderung für Landfremde eingeschränkt war. Dies führte zu einem kleineren Genpool und im Endeffekt dazu, dass genetische Krankheiten wie der familiäre Morbus Parkinson vermehrt auftraten. Interessanterweise weisen afrikanische Farbige eine viel geringere Prävalenz von Morbus Parkinson auf als amerikanische Farbige, aber die Prävalenz von Lewy-Körpern in den Gehirnen von Nigerianern ist ähnlich wie in westlichen Populationen. Diese Erkenntnis spricht gegen einen ätiologischen Faktor, der für die industrialisierte Umwelt spezifisch ist (JENDROSKA et al., 1994). Die niedrigere Prävalenz von Morbus Parkinson

unter Afrikaner könnte dadurch erklärt werden, dass die Mittlere Lebenserwartung in Afrika niedriger ist als in den USA ist und nicht alle afrikanischen Patienten, die eine Synuklein-Pathologie haben, das Erstmanifestationsalter erreichen. Eine weitere Ursache dafür könnte der schlechtere Zustand des medizinischen Systems in Afrika sein: weniger Leute, die tatsächlich Morbus Parkinson hatten, konnten fachliche medizinische Hilfe aufsuchen und richtig diagnostiziert werden, was die Ergebnisse von statistischen Metaanalyse Studien beeinflussen könnte. Eine ländliche Umgebung wurde im Allgemeinen, wenn auch nicht immer, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit an PD zu erkranken in Verbindung gebracht. Die Verwendung von Herbiziden oder Pestiziden und die Exposition gegenüber Brunnenwasser kommen als Risikofaktoren für Morbus Parkinson in Frage (LANG, LOZANO, 1998). Tatsächlich hat eine französische Studie von 2018 gezeigt, dass Landwirte, die mit Dithiocarbamat-Fungiziden, Rotenon oder den Herbiziden Diquat und Paraquat gearbeitet haben, ein erhöhtes Risiko haben, Morbus Parkinson zu entwickeln (POUCHIEU et al., 2018).

2.3.3 Klinik des Morbus Parkinson

Braak und Kollegen haben ein Staging-Schema der PD-Pathologie mit Beginn der α -Synuklein-Pathologie im kaudalen Hirnstamm, dem Bulbus olfactorius und der anschließenden Ausbreitung zum Kortex über das Mittelhirn vorgeschlagen (BRAAK et al., 2003). Diese Hypothese wurde durch mehrere Studien erweitert, die eine frühe Beteiligung des peripheren autonomen Nervensystems bei PD nahelegen (DICKSON et al., 2009; DEL TREDICI, BRAAK, 2012). Obwohl noch immer unklar ist, ob die Krankheit im peripheren Nervensystem, kaudalen Hirnstamm oder Bulbus olfactorius ausbricht, können PD-Patienten vor dem ersten Auftreten klassischer motorischer Zeichen eine Vielzahl von nicht-motorischen Symptomen aufweisen (PONT-SUNYER et al., 2015; SCHRAG et al., 2015). Dies spricht für die Existenz eines PD-Stadiums, in welchem betroffene Personen asymptomatisch sein können ("präklinische PD") oder sie eine Vielzahl von nichtmotorischen Symptomen und/oder subtilen motorischen Symptomen aufweisen können, die den aktuellen diagnostischen Kriterien nicht entsprechen ("Prodromal PD") (BERG et al., 2014; MAHLKNECHT et al., 2015).

Tabelle 1: Übersicht Stadien von Morbus Parkinson. Abgeleitet von (STERN et al., 2012) und (MAHLKNECHT et al., 2015)

Klinische Phase	Klinische Status	Pathologie
Phase 1 "Präklinische PD"	Keine Symptome	Angenommen extranigral (somit auch peripher), weiterhin unklar
Phase 2 "Prodromale PD"	Nichtmotorische Symptome	Extranigral ± nigral (Braak Stadien 1-3)
Phase 3 "Motorische PD"	Nichtmotorische Symptome + motorische Symptome	Extranigral + nigral (Braak Stadien 3-6)

2.3.3.1 Nichtmotorische Symptome (Non-motor Symptoms)

Mehr als 80% aller MP Patienten weisen Hyposmie auf. Es kann fünf bis zehn Jahre vor den ersten motorischen Symptomen auftreten. Allerdings haben nur etwa 30% der älteren Menschen Hyposmie, was für eine geringe Spezifität spricht (GAENSLEN et al., 2011; BERG et al., 2013). Zu den anderen sensorischen Symptomen von MP Patienten gehören Sehstörungen: Zum Beispiel reduzierte Farbwahrnehmung (POSTUMA et al., 2015). MP Patienten können eine Vielfalt von neuropsychiatrischen Symptomen aufweisen, dazu gehören: Depression und Angststörungen (etwa 30% aller MP Patienten), Apathie, FED (Frontal Executive Dysfunction) und andere (PONT-SUNYER et al., 2015). Etwa 30 – 60 % aller MP Patienten leiden an Obstipation. Dieses Symptom kann bis zu 20 Jahren vor den ersten motorischen Symptomen auftreten. Männer mit Stuhlganghäufigkeiten von weniger als einmal pro Tag hatten ein relatives Risiko für eine PD von mindestens 2,7 verglichen mit männlichen Personen mit häufigeren Entleerungen (SAVICA et al., 2009; GAENSLEN et al., 2011; PONT-SUNYER et al., 2015). Zu anderen relevanten autonomen Dysfunktionen gehören orthostatische Hypotension und urogenitale Dysfunktion. Orthostatische Hypotension kann auch durch Medikamente ausgelöst werden. 30 – 50% aller Parkinson Patienten leiden unter einer Rapid-Eye-Movement-Schlaf-Verhaltensstörung (REM Sleep Behavior Disorder, RBD). Die RBD kann bis zu 20 Jahre vor den ersten motorischen Symptomen auftreten (IRANZO et al., 2013; POSTUMA et al., 2015). RBD ist eine Parasomnie, die klinisch durch Traumverhalten charakterisiert ist. Sie hängt mit einem Mangel der physiologischen Muskelrelaxation in der REM-Schlafphase zusammen. Die Prävalenz der idiopathischen RBD ist in der Bevölkerung nicht valide definiert

worden, da eine eindeutige Diagnose eine Polysomnographie erfordert. Eine häufig zitierte Zahl von 0,4% kann somit unterschätzt sein. RBD wird zunehmend als Vorbote für neurodegenerative Erkrankungen erkannt, darunter nicht nur PD, sondern auch andere α -Synukleinaggregations-Krankheiten wie DLB oder MSA. Mehrere Follow-up-Studien haben ergeben, dass die Mehrheit der Probanden die idiopathische RBD (> 80%) in eine dieser Störungen - am häufigsten PD oder DLB - umwandeln werden (GAGNON et al., 2006).

2.3.3.2 Motorische Symptome (motor symptoms)

Morbus Parkinson präsentiert sich typischer Weise durch eine Trias von motorischen Symptomen: Ruhetremor, Bradykinesie und Rigor. Hinzu kommt vielfach eine Haltungstörung.

Der Ruhetremor mit einer Frequenz von 3-5 Hz (klassisch Pillendreher Tremor) ist das erste Symptom bei 70% der Parkinson-Patienten. Er ist in der Regel bei Krankheitsbeginn asymmetrisch und verschlechtert sich bei Angst, kontralateraler motorischer Aktivität und während des Gehens. Der Ruhefußtremor dagegen präsentiert sich viel seltener (GARCIA RUIZ et al., 2011). Ein Ruhetremor bei Morbus Parkinson entsteht wegen der Synchronisation von oszillierenden Neuronen in den Basalganglien, wobei der Entstehungsmechanismus noch nicht verstanden wird (BERGMAN, DEUSCHL, 2002). Der unilateral beginnende Ruhetremor weitet sich im Krankheitsverlauf über die kontralaterale Seite, Lippen, Kinn, Kiefer und die Beine aus. Bei Morbus Parkinson verschwindet der Tremor im Schlaf und bessert sich während körperlicher Aktivität (SHAHED, JANKOVIC, 2007).

Die Bradykinesie - Verlangsamung von Bewegungen – ist ein charakteristisches Zeichen von Basalganglienschädigungen (GARCIA RUIZ et al., 2011). Bradykinesie ist das am meisten behindernde Symptom der frühen Parkinson-Krankheit. Es äußert sich zunächst durch Schwierigkeiten bei feinmotorischen Aufgaben wie dem Aufknöpfen oder Schreiben (Mikrografie). Im Verlauf der Krankheit verlangsamen sich alle Bewegungen. Es fällt am meisten auf, wenn der Patient sich von einem Stuhl erheben möchte oder sich im Bett auf die andere Seite dreht. Die Bradykinesie der Gliedmaßen kann durch Fingerklopfen, abwechselnde Pronation und Supination des Unterarms, Fußklopfen, Schließen und Öffnen der Faust getestet werden (MARTINEZ-MARTIN et al., 1994).

Der Rigor ist der erhöhte Widerstand, welcher während der passiven Gelenkbewegung beobachtet wird, der über den gesamten Bewegungsbereich dieses Gelenks gleichförmig ist. Es kann auch ohne Tremor eine Zahnradqualität existieren; diese ist jedoch im zitternden Glied meist ausgeprägter. Die Steifigkeit wird durch kontralaterale motorische Aktivität oder geistige

Leistungsfähigkeit verbessert. Der Rigor wird auf der ipsilateralen Seite des Tremors beobachtet (SAMII et al., 2004; SHAHED, JANKOVIC, 2007). Ein Rigor ist sehr nützlich für die Diagnose, aber dieser wird selten vom Patienten bemerkt. Vorwiegend berichten die Patienten über ein subjektives Gefühl von "allgemeiner Steifheit" (GARCIA RUIZ et al., 2011).

Ein anderes prominentes Symptom ist das Freezing. Unter Freezing versteht man schlagartige Bewegungsblockaden. Freezing äußert sich am häufigsten als eine Unfähigkeit, trotz der Intention zu gehen die Beine vorwärts zu bewegen. Abhängig von der Beweglichkeitsphase werden die Formen „On-“ und „Off“-Freezing unterschieden (GARCIA RUIZ et al., 2011).

Patienten mit MP weisen öfters ein verändertes Gangbild auf, welches die Erstdiagnose Jahre voraus gehen kann (KWON, VERGHESE, 2005).

Es wird zwischen drei verschiedenen Krankheitstypen unterschieden. Beim Äquivalenz-Typ sind Bradykinesie, Rigor und Tremor etwa gleich ausgeprägt. Der Akinetisch-rigide Typ ist durch nur minimalen oder fehlenden Tremor, aber stark ausgeprägter Minderbewegung und Rigor gekennzeichnet. Beim Tremor-dominanten Typ steht der Tremor im Vordergrund - Akinese und Rigor sind nur gering ausgeprägt (ZETUSKY et al., 1985).

2.3.4 Pathophysiologie

Derzeit werden die motorischen Kernsymptome der Parkinson-Krankheit wie Bradykinesie, Tremor und Starrheit durch Erschöpfung des Neurotransmitters Dopamin erklärt. Der Mangel an Dopamin wurde ursprünglich auf den progredienten Zellverlust, vor allem im striatonigralen System, zurückgeführt (BRAAK et al., 2003; GEORGE et al., 2013). Heutzutage wird angenommen, dass die Symptome als Folge der synaptischen Dysfunktion noch vorhandener Neuronen entstehen. Verschiedene In-vivo-Bildgebungsstudien der synaptischen Aktivität im ZNS zeigten präsynaptische Neurotransmitterdefizite bei iPD (NIKOLAUS et al., 2009). Das langsame Fortschreiten der Krankheit und der mit der Zeit abnehmende Effekt der Dopaminsubstitutionstherapie deuten auf ein allmählich zunehmendes präsynaptisches Versagen, welches dem Nervenzelltod vorausgeht (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Ein Überblick über die pathophysiologische Kaskade bei iPD ist in Abbildung 1 dargestellt.

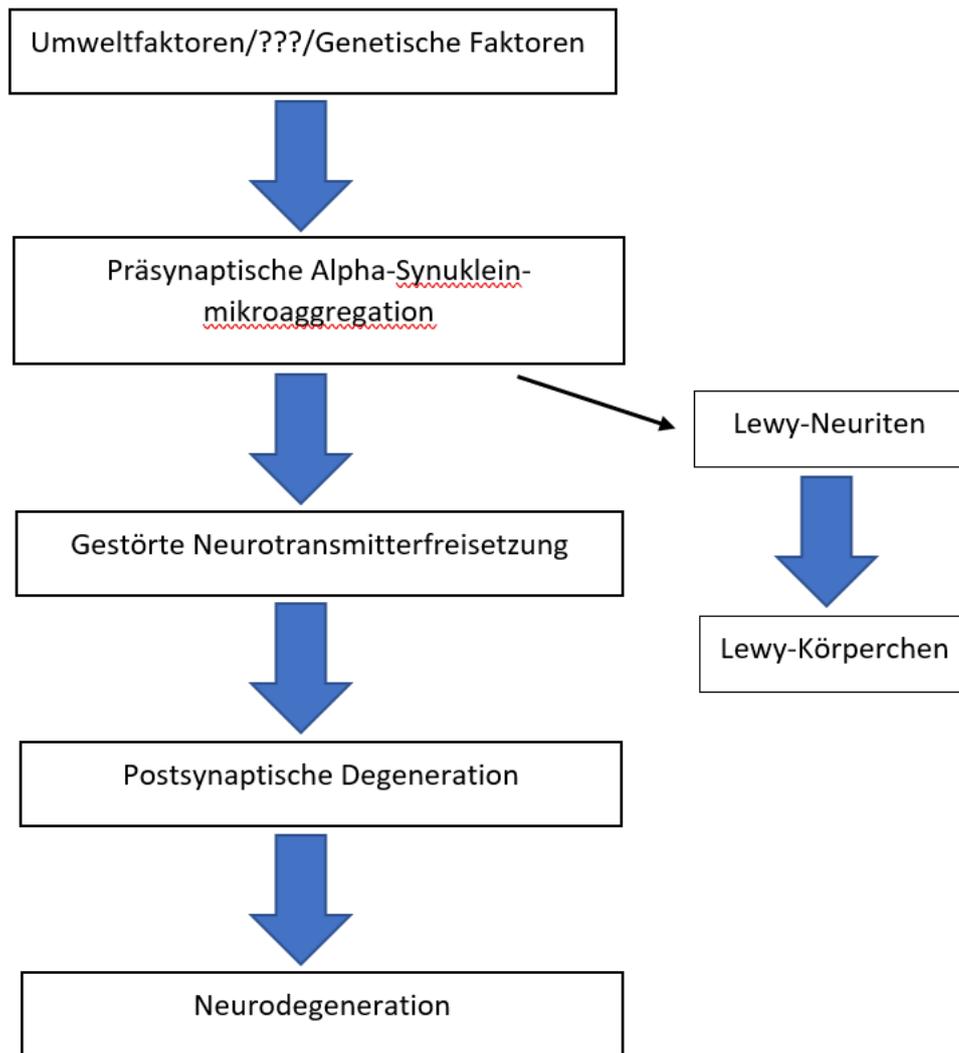


Abbildung 1: Übersicht über die pathophysiologischen Prozesse bei MP. Erstellt gemäß (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015)

Bei der Parkinson-Krankheit werden Lewy-Körper hauptsächlich an Prädilektionsstellen von neuronalem Verlust gefunden, das heißt der Substantia nigra und dem Locus Coeruleus. Diese Befunde sind die typische Pathologie in den letzten Stadien der Krankheit (GELB et al., 1999). Die Lewy-Körperchen erscheinen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung als eosinophile Zelleinschlüsse. Außer der Hauptkomponente α -Synuklein lassen sich mehr als 70 andere Proteine, unter anderem Ubiquitin, in den Lewy-Körperchen nachweisen (SPILLANTINI et al., 1997; WAKABAYASHI et al., 2007). Obwohl der Nachweis von Lewy-Körperchen als pathologisches Kennzeichen der Parkinson-Krankheit und Lewy-Körperchen Demenz gelten, werden sie oft in asymptomatischen Individuen gefunden (HUGHES et al., 1992). Neuronale Dysfunktion und Zellverlust gehen der Lewy-Pathologie voraus (MILBER et al., 2012). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das Vorhandensein von Lewy-Körperchen die Neuronen der Substantia nigra nicht zum apoptotischen Zelluntergang prädisponiert und, dass die meisten Neuronen,

welche durch Zelltod beim Morbus Parkinson untergehen, keine Lewy-Körperchen aufweisen (TOMPKINS, HILL, 1997). Die Dichte von kortikalen oder Hirnstamm-Lewy-Körperchen weist keine Korrelation mit dem Schweregrad der klinischen Symptome beim Morbus Parkinson oder der Lewy-Körperchen Demenz auf (GOMEZ-ISLA et al., 1999; GOMEZ-TORTOSA et al., 1999). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Pathophysiologie der Neurodegeneration und des Zellunterganges nicht durch Lewy-Körperchen erklärt werden kann (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015).

Die Parkinson-Krankheit hat ein definiertes klinisches Muster und eine Reihe von nichtmotorischen Symptomen, die der motorischen Phase vorausgeht. Die überwiegenden frühen nichtmotorischen Manifestationen sind Geruchsstörungen und Verstopfung (MAHLKNECHT et al., 2015). Die Hauptmerkmale der Parkinson-Pathogenese (selektive Degeneration dopaminerger Neurone, Lewy-Pathologie, reaktive Gliose und Einleitung der Degeneration in der ventralen Ebene der pars compacta der Substantia nigra, gefolgt von einer Ausbreitung auf die dorsale Ebene) wurden vor der Identifizierung von prämotorischen Symptomen wie Hyposmie oder Verstopfung als solche festgestellt. Verstopfung wurde als autonomes Symptom betrachtet, das sich während der PD entwickelt (KLINGELHOEFER, REICHMANN, 2015). Braak und Kollegen entwickelten ein pathologisches Staging-System für den Morbus Parkinson, das gut mit der klinischen Darstellung in den verschiedenen Stadien der Krankheit korreliert. Ursprünglich identifizierte das Braak-Staging-System den Riechkolben und den DMNV als die Stellen, an denen der neurodegenerative Prozess bei der PD beginnt, bevor er sich auf den Hirnstamm und die kortikalen Bereiche des Gehirns ausbreitet (BRAAK et al., 2003; BRAAK et al., 2004; BRAAK et al., 2007). In anschließenden pathologischen Studien konnten die Lewy-Körperchen und die Lewy-Neuriten nicht nur im ZNS sondern auch im autonomen PNS und im ENS nachgewiesen werden, weshalb die Braak-Stadien angepasst wurden. Um die pathologische Verteilung zu den verschiedenen Präsentationszeitpunkten abzudecken, wurden auch die neuropathologischen Veränderungen im Riechkolben, im autonomen PNS und im ENS in den angepassten Braak-Stadien berücksichtigt. Es wird angenommen, dass sich der neurodegenerative Prozess durch anatomisch verbundene Strukturen in caudo-rostraler Richtung vom dem Initiationsort her (dem ENS oder dem autonomen PNS) zum Gehirn ausbreitet. Die Beteiligung sowohl des Riechkolbens, als auch des DMNV wurde durch einen vorgeschlagenen Dual-Hit-Mechanismus erklärt, der ein anterogrades Fortschreiten der Pathologie vom Riechsystem in den Schläfenlappen und ein retrogrades Fortschreiten aus dem DMNV bzw. aus dem Darm (ENS) in den Hirnstamm beinhaltet (HAWKES et al., 2007).

Die für den Morbus Parkinson verantwortliche Pathologie scheint im ENS, autonomen PNS oder Riechkolbe zu beginnen und breitet sich über die rostrokraniale Übertragung mittels ret-

rograden axonalen Transport zur Substantia nigra und weiter im ZNS aus, was darauf schließen lässt, dass Umweltsubstanzen die pathologische α -Synukleinaggregation auslösen können. Einige Epidemiologische und soziologische Studien haben bereits gezeigt, dass die Exposition gegenüber toxischen Umweltsubstanzen (z. B. im Trinkwasser und Exposition gegenüber landwirtschaftlichen Chemikalien) und spezifischen Lebensbedingungen (z. B. Leben in einer ländlichen Umgebung, landwirtschaftlicher Beruf) das Risiko für die Entwicklung einer Parkinson-Krankheit erhöhen (PRIYADARSHI et al., 2001; LAI et al., 2002). Die Rolle der Umweltfaktoren in der Pathogenese der PD ist zentraler Bestandteil der gegenwärtigen Forschung.

2.3.5 α -Synuklein als synaptisches Protein

α -Synuklein ist ein reichlich vorhandenes neuronales Protein, das vorwiegend an präsynaptischen Endigungen lokalisiert ist. Die Akkumulation von fehlgefalteten α -Synukleinoligomeren und großen α -Synukleinaggregaten definiert mehrere neurodegenerative Erkrankungen, die als α -Synukleinaggregations-Krankheiten zusammengefasst werden. Deswegen ist es sehr wichtig sich mit der Struktur und physiologischen Funktion dieses Protein auseinander zu setzen. Es soll aber erwähnt werden, dass viele Aspekte der zellulären Funktion von α -Synuklein noch nicht vollständig geklärt werden konnten und ein Gegenstand intensiver Forschung bleiben (BURRE, 2015). α -Synuklein wurde ursprünglich identifiziert unter Verwendung von Antikörper gegen aufgereinigte cholinerge Vesikel des elektrischen Organs von einem Torpedo Rochen mit Hilfe verschiedener Methoden des Expressions Screenings. Mittels licht- und elektronenmikroskopischer Immunhistochemie wurde gezeigt, dass Synukleine sich im Bereich der Synapse und der Kernhülle finden. Daher auch der Name "Synuclein", Syn- für Synapse und -nuclein für den Zellkern. Die Entdeckung von α -Synuklein führte zur Identifizierung von den eng verwandten Beta- und Gamma- Isoformen (MAROTEAUX et al., 1988; MAROTEAUX, SCHELLER, 1991).

2.3.5.1 Struktur

α -Synuklein ist ein Protein, das beim Menschen durch das α -Synuklein Gen (SNCA) kodiert wird. Es hat eine Länge von 140 Aminosäuren und besteht aus der N-terminalen Membranbindungsdomäne, dem C-terminalen Schwanz und einer in der Mitte liegender Non-Beta-Komponente. α -Synuklein existiert in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einem löslichen Zustand und einem membrangebundenen Zustand. Lösliches zytosolisches α -Synuklein ist monomer, intrinsisch unstrukturiert und verhält sich wie ein nativ entfaltetes Protein. In Gegenwart von Lipidmembranen bildet der N-Terminus eine amphipathische α -Helix (BURRE et al., 2013; BURRE, 2015). Der N-Terminus von α -Synuklein enthält sieben Wiederholungen einer

elf Aminosäure langen Sequenz. Wiederholungen dieser Größe ermöglichen dem Polypeptid genau drei Windungen der Helix zu machen und somit mit der Oberfläche einer Membran zu interagieren. Bemerkenswerterweise beeinflussen alle im SNCA Gen beschriebene Missense-Mutationen (A53T, A30P und E46K sowie die kürzlich beschriebenen G51D und H50Q Mutationen) diese N-terminale Domäne. Das deutet darauf hin, dass eine veränderte Membranbindung mit der Pathologie von α -Synukleinaggregations-Krankheiten in Verbindung gebracht werden kann (KRUGER et al., 1998; APPEL-CRESSWELL et al., 2013; BENDOR et al., 2013; LESAGE et al., 2013; BURRE, 2015; DOMINGO, KLEIN, 2018). Die Non-A-beta-Komponente (NAC, Aminosäuren 60-95) dient als Sensor für die Lipideigenschaften und bestimmt die Affinität der Membranbindung vom α -Synuklein (FUSCO et al., 2014). Die Non-A-beta-Komponente akkumuliert in hohen Mengen in Plaques beim Morbus Alzheimer, weswegen einige Autoren behaupten, dass diese Region für Aggregation von α -Synuklein verantwortlich sei (UEDA et al., 1993; BURRE, 2015). Der C-Terminus (Aminosäureresten 96-140) ist im Gegensatz zu dem N-Terminus polar und unstrukturiert. Es wird angenommen, dass es für Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Ionen verantwortlich ist. Der C-Terminus kann mehreren post-translationalen Modifikationen untergehen: z.B. Phosphorylierung an Ser-87 oder Ser-129, was unter anderem die Membranbindung beeinflussen kann (OUESLATI et al., 2010; PALEOLOGOU et al., 2010; CASTILLO-GONZALEZ et al., 2017). Es wurde gezeigt, dass in seinem physiologischen Zustand α -Synuklein an der α -Aminogruppe der ersten Aminosäure von α -Synuklein N-Terminal acetyliert ist. Die Acetylierung von α -Synuklein erhöht seine Neigung zur helikalen Faltung, seine Affinität zu Membranen und seine Aggregationsresistenz (BARTELS et al., 2014; IYER et al., 2016). Obwohl man annimmt, dass die Membranbindung des α -Synuklein vor Aggregation schützt (ZHU, FINK, 2003) wurde berichtet, dass unter oxidativem Stress auch Membranbindung die Aggregation von α -Synuklein beschleunigt (LEE et al., 2002). Nach Bindung an Membranen bildet α -Synuklein α -helikale Multimere, die für seine physiologische Funktion an der Synapse erforderlich sind und α -Synuklein vor einer Aggregation schützen (BURRE et al., 2014, 2015). Im Gegensatz zu diesen physiologischen Konformationen nimmt α -Synuklein in seinem pathologisch relevanten Zustand eine β -Faltblatt-reiche Konformation an, die von Aggregation und Fibrillenbildung begleitet wird (CONWAY et al., 1998; LASHUEL et al., 2002; UVERSKY, 2007).

2.3.5.2 Funktion

Trotz 25 jahrelange Forschung, konnte die Funktion von α -Synuklein nicht abschließend definiert werden. Eine hohe Anzahl an Studien zur Funktion von α -Synuklein, die öfters widersprüchliche Ergebnisse liefern, deutet darauf hin, dass die Funktion von α -Synuklein nicht nur sehr komplex, sondern auch vielfältig ist. Jedoch legt die präsynaptische Lokalisation von α -Synuklein und seine Wechselwirkung mit stark gekrümmten Membranen und synaptischen

Proteinen eine regulatorische Funktion an der Synapse nahe. Die wiederholte Freisetzung vom Neurotransmitter an der Präsynapse erfordert Zyklen des Zusammenbaus und des Abbaus von löslichem N-Ethylmaleimid-sensitiven Faktor-Anlagerungsprotein-Rezeptor (SNARE) -Komplexen mit kontinuierlicher Erzeugung von reaktiven SNARE-Protein-Zwischenprodukten. Die SNARE-Komplex Assemblierung erfordert eine Chaperon-Aktivität, die durch Synukleine vermittelt wurde. α -Synuklein bindet sich mit seinem C-Terminus direkt an das SNARE-Protein Synaptobrevin-2 / Vesikel-assoziiertes Membranprotein 2 (VAMP2) und fördert die SNARE-Komplexbildung. Tripple-Knockout Mäuse, denen Synukleine fehlten, zeigten eine altersabhängige Abnahme der SNARE-Komplex-Assemblierung. Die altersabhängige Beeinträchtigung der SNARE-Komplex-Assemblierung in TKO-Mäusen lässt darauf schließen, dass α -Synuklein erforderlich ist, um eine normale SNARE-Komplex-Anordnung während des Alterns zu erhalten (BURRE et al., 2010). Wie es schon erwähnt wurde, existiert α -Synuklein in Neuronen in einem Gleichgewicht zwischen zytosolischen und membrangebundenen Zuständen. Zytosolisches α -Synuklein scheint nativ entfaltet zu sein, während membrangebundenes α -Synuklein eine α -helikale Konformation einnimmt. α -Synuklein multimerisiert nach Membranbindung zu großen monomeren Komplexen. Interessanterweise fördert α -Synuklein den SNARE-Komplexaufbau an der präsynaptischen Plasmamembran in seinem multimeren membrangebundenen Zustand, jedoch nicht in seinem monomeren zytosolischen Zustand (BURRE et al., 2014).

Außer seiner SNARE-Komplex-Chaperon-Aktivität erfüllt α -Synuklein auch mehrere andere Funktionen, z.B. induziert α -Synuklein die Membrankrümmung und wandelt, gesteuert durch Bindungsaffinität, Verteilungstiefe und Interleaflet-Asymmetrie, große Vesikel in stark gekrümmte Membrankanäle und zylindrische Mizellen um (VARKEY et al., 2010; WESTPHAL, CHANDRA, 2013; BRAUN et al., 2014). Darüber hinaus organisiert α -Synuklein die Membrankomponenten, moduliert die Phospholipid-Zusammensetzung und ist in vitro und in vivo ein spezifischer Inhibitor der Phospholipase D1 und D2. Dies legt nahe, dass α -Synuklein an der Spaltung von Membranlipiden und der Membranbiogenese beteiligt sein könnte (PAYTON et al., 2004; MADINE et al., 2006; ADAMCZYK et al., 2007; GORBATYUK et al., 2010). Jedoch soll erwähnt werden, dass die Daten zur Hemmung der Phospholipase D1 und D2 umstritten sind (RAPPLEY et al., 2009). Schließlich kann α -Synuklein Lipid-Packungsdefekte erkennen und Membran-Remodeling induzieren (OUBERAL et al., 2013).

Bei Morbus Parkinson sind verschiedene Arten von Neuronen betroffen. Ein bemerkenswertes Zeichen dieser Krankheit ist eine Dysfunktion der dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra und der daraus resultierende Mangel an Dopamin (BRAAK et al., 2007). Trotz enormer

Fortschritte im Verständnis der Funktion von α -Synuklein bleibt die erhöhte Vulnerabilität von dopaminergen Neuronen gegenüber α -Synuklein-Pathologie unklar (BURRE, 2015). In Abwesenheit von α -Synuklein finden tiefgreifende Veränderungen im striatalen dopaminergen System statt. Die Deletion vom α -Synuklein-Gen führt zu einer verminderten Expression und Funktion des Dopamintransporters (DAT), was eine erniedrigtes Reuptake von Dopamin verursacht (CHADCHANKAR et al., 2011). α -Synuklein reguliert die Aktivität des Dopamintransporters DAT. Die mit Fluorescence Recovery after Photobleaching (FRAP) erzielten Ergebnisse weisen auf eine dynamische Assoziation (on/off Interaktion) zwischen DAT und α -Synuklein hin. Dieser Interaktionsmodus zwischen DAT und α -Synuklein bietet die Möglichkeit für andere regulatorische Protein mit dem C-Terminus von DAT zu interagieren. Die ausgewogene Konkurrenz zwischen anderen regulatorischen Proteinen und α -Synuklein um eine gemeinsame Bindungsdomäne am C-Terminus von DAT reguliert die Funktion von DAT. Sowohl eine Erhöhung als auch eine Erniedrigung des α -Synuklein-Spiegels führt zu einer Dysbalance in der Konkurrenz und zu einer Dysregulation des DAT. Zusätzlich erhöht die DAT-induzierte Membrandepolarisation die Plasmamembranlokalisierung von α -Synuklein (BUTLER et al., 2015). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass α -Synuklein die Aktivität von DAT mindert. α -Synuklein reguliert die Aktivität von DAT, indem es die Anzahl der an der Plasmamembran lokalisierten Dopamin-Transportern senkt. Dies wirkt neuroprotektiv, indem es die Menge an Dopamin verringert, die in die Neurone eindringt. Durch Beeinträchtigung der Zelladhäsion, Exposition gegenüber Neurotoxinen wie z.B MPTP oder oxidativem Stress, kann die physiologische Funktion von α -Synuklein umgekehrt werden, was zu einem erhöhten Transport des DAT zur Plasmamembran führt. Dies löst eine komplexe Ereigniskette mit erhöhter Wiederaufnahme von DA und erhöhter intrazellulärer Autooxidation von DA aus. Neben seiner bekannten Neurotoxizität stabilisiert oxidiertes DA wiederum α -Synuklein-Protofibrillen, was seine Aggregation und Akkumulation in LBs beschleunigt (WERSINGER et al., 2003). Schlussendlich bleibt der Zusammenhang zwischen α -Synuklein-Pathologie und erhöhte Vulnerabilität von dopaminergen Neuronen trotz mehreren Studien und einigen Arbeitshypothesen nicht komplett geklärt.

Die präsynaptische Lokalisation von α -Synuklein, seine Interaktion mit synaptischen Vesikeln und Synaptobrevin-2 und seine SNARE-Komplex-Chaperon-Aktivität spricht für eine Rolle bei der Freisetzung von Neurotransmittern und der synaptischen Plastizität (GEORGE et al., 1995; BURRE et al., 2010). Das Knockout von α -, β - oder γ -Synuklein induziert bei Mäusen keine morphologische Veränderung im Gehirn. Jedoch weisen solche Mäuse Synapsen mit abnormaler Größe, Struktur und verändertem Spiegel von synaptischen Proteinen auf. Dies führt zu einem beeinträchtigten Überleben der Mäuse (CHANDRA et al., 2004; GRETEN-

HARRISON et al., 2010). Außerdem zeigen α -Synuklein-Knockout-Mäuse eine neuromuskuläre Pathologie und ein reduziertes räumliches Gedächtnis (KOKHAN et al., 2011; PELKONEN, YAVICH, 2011). Dies legt nahe, dass α -Synuklein zur Langzeitoperation eines Neurons beiträgt. α -Synuklein dämpft die Mobilität von Recycling-Pool-Vesikeln (RP). Auch spielt α -Synuklein eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Gesamtgröße von RPs an Synapsen. Während ein Überschuss an α -Synuklein zu kleineren RPs führte und den intersynaptischen Transport hemmte, löste das Fehlen von α -Synuklein bei größeren RPs umgekehrte Veränderungen aus und verstärkte den intersynaptischen Transport. Basierend auf diesen Beobachtungen wird ein Modell vorgeschlagen, bei dem α -Synuklein die RP-Homöostase durch Modulation der intersynaptischen vesikulären Dynamik aufrechterhält (SCOTT et al., 2010). Die Wirkung von α -Synuklein auf die Neurotransmission und die synaptische Plastizität wurde sowohl bei Knockout- als auch bei Überexpressionsbedingungen untersucht. Während einige Studien eine fehlende Wirkung von α -Synuklein auf die Neurotransmitterfreisetzung berichteten (CHANDRA et al., 2004; BURRE et al., 2010), zeigten andere eine Verbesserung der synaptischen Transmission (GRETEN-HARRISON et al., 2010) (ANWAR et al., 2011) oder eine Abnahme der Freisetzung (ABELIOVICH et al., 2000; CABIN et al., 2002). Ob die widersprüchlichen Ergebnisse den verwendeten experimentellen Modellen und den untersuchten Hirnregionen zuzuschreiben sind, bleibt noch zu klären. Es scheint jedoch klar zu sein, dass α -Synuklein nicht für die basale Neurotransmission erforderlich ist, sondern eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Neuronen während intensiver neuronaler Aktivität und während ihrer langen Lebenszeit spielt. Insgesamt wird die Wirkung von α -Synuklein auf die Freisetzung von Neurotransmittern wahrscheinlich nicht durch direkte Einwirkung auf die Freisetzungsmaschinerie vermittelt, sondern durch Beeinflussung der räumlichen Organisation bestimmter synaptischer Vesikelpools im präsynaptischen Terminal. Möglicherweise durch α -Synuklein-Multimerisierung, die durch Membranbindung ausgelöst wird und SNARE-komplexe Zusammenbau potenziert. Diese Aktivität von α -Synuklein trägt zur Langzeitoperation des Nervensystems bei (BURRE, 2015).

Zusammenfassend ist α -Synuklein wichtig für die normale Funktion und Integrität von Synapsen, und im alternden Nervensystem löst die Dysfunktion von α -Synuklein eine synaptische Dysfunktion aus. Es ist klar, dass entweder zu wenig oder zu viel α -Synuklein für das Gehirn schädlich ist. Daher ist die Aufrechterhaltung eines gesunden Gleichgewichts von nicht aggregiertem α -Synuklein im Gehirn ein erstrebenswertes Ziel zur Verhinderung von synaptischer Dysfunktion und daraus resultierende Neurodegeneration (BURRE, 2015).

2.3.6 Genetische Varianten

5-10% der Parkinson-Patienten leiden an einer genetischen Form der Erkrankung mit mendelischer Erbllichkeit. In den letzten 20 Jahren wurden wesentliche Fortschritte bei der Identifizierung der genetischen Grundlage von Morbus Parkinson gemacht. Obwohl 15% der Morbus Parkinson-Patienten eine positive Familienanamnese haben, sind die meisten PD-Fälle mit unbekannter Ätiologie. Möglicherweise besteht bei den sporadischen Fällen eine Assoziation mit Umweltrisikofaktoren. Heutzutage sind die sechs Gene SNCA, LRRK2, VPS35, Parkin, PINK1 und DJ-1, definitiv mit einem autosomal-dominanten oder rezessiven PD-Erbgang assoziiert (KALINDERI et al., 2016).

Das α -Synuklein Gen (SNCA) war das erste Gen, das definitiv mit familiärem Parkinson assoziiert wurde. Es wurde nachgewiesen, dass α -Synuklein, der Hauptbestandteil der Lewy-Körper, auf SNCA codiert wird (SPILLANTINI et al., 1997). Schon 1997 wurde die erste Mutation in diesem Gen identifiziert – eine Missense-Mutation A53T in Familien mit autosomal dominantem Parkinson (POLYMERPOULOS et al., 1997). Bei dieser Mutation wird die amphipatische Helix des α -Synuklein unterbrochen (DENG et al., 2018). Patienten mit der A53T-Mutation haben gewöhnlich einen früheren Erkrankungsbeginn im Schnitt mit 46 Jahren (PANKRATZ, FOROUD, 2004), eine schnelle Krankheitsprogression, L-Dopa Resistenz und eine hohe Prävalenz von Demenz und anderen psychiatrischen und autonomen Störungen (KLEIN, SCHLOSSMACHER, 2006). Anschließend wurden in Familien mit dominant vererbtem Parkinson im SNCA-Gen vier zusätzliche verschiedene Punktmutationen, nämlich A30P, E46K, G51D und H50Q, gefunden (DENG et al., 2018). Duplikationen und Verdreifachung von α -Synuklein wurden ebenfalls mit familiären PD-Fällen in Verbindung gebracht. Ein direkter Zusammenhang zwischen der α -Synuklein-Gendosis und dem Alter des Erkrankungsbeginns, der Progression und des phänotypischen Schweregrades wurde beobachtet. Genauer gesagt wurde die genomische Verdreifachung von α -Synuklein mit einem früheren Erkrankungsbeginn und einem schweren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht, der durch Demenz und eine begrenzte Lebensdauer gekennzeichnet war, wohingegen Patienten mit genomischer Verdopplung von α -Synuklein einen milderen klinischen Phänotyp aufwiesen. Daher scheint eine erhöhte Expression von α -Synuklein das Alter des PD-Beginns zu verringern und die Schwere der Erkrankung zu erhöhen (SINGLETON et al., 2003; CHARTIER-HARLIN et al., 2004; FARRER et al., 2004).

Mutationen im LRRK2 (Leucine rich repeat kinase 2) Gen machen die meisten genetisch bedingten Parkinson Fälle aus. LRRK2 ist ein großes Multidomänenprotein, das unter anderem für eine Serin / Threoninkinase codiert (MARTIN et al., 2014). Es wurde über mehr als 80 LRRK2 Mutationen berichtet, aber nur sieben wurden in Zusammenhang mit der Pathogenese

gebracht (RUBIO et al., 2012). Die Mechanismen, die der LRRK2-Mutationen zugrunde liegen, sind nicht vollständig verstanden. Möglicherweise können diese Mutationen zum Tod und zur Degeneration von Dopamin-Neuronen führen, indem zahlreiche zelluläre Signalwege wie Vesikeltransport, Zytoskelett-Funktion, Proteinsynthese und lysosomales System beeinflusst werden (MARTIN et al., 2014). LRRK2 Mutationen kommen in Familien mit bekanntem autosomal-dominanten Parkinson oder in sporadischen-Parkinson Fällen vor (KALINDERI et al., 2016). Klinisch präsentieren sich LRRK2-bedingte Parkinsonfälle ähnlich zu denen mit idiopathischem Parkinson. Es ergibt sich aber eine Neigung zu einer besseren Geruchswahrnehmung und einer langsameren Progression. Außerdem tritt eine Vielzahl von atypischen Merkmalen wie orthostatischer Hypotonie, Demenz und Halluzinationen auf. Die Pathologie in Fällen mit LRRK2 Mutationen ist heterogen und kann außer Lewy-Körperchen pathologische Merkmale von MSA, PSP und CBD umfassen (HEALY et al., 2008). Ein weiteres autosomal-dominantes Gen, das eine Assoziation mit dem familiären Parkinson aufweist, ist VPS35 (KALINDERI et al., 2016).

Parkin ist ein autosomal-rezessiv vererbbares Gen, dessen Mutationen bei Patienten unterschiedlicher ethnischer Zugehörigkeit gefunden wurden und als der Hauptmutantationsfaktor für familiäre ARJP (Autosomal Rezessives Juveniles Parkinson) gilt (ABBAS et al., 1999). Parkin wird hauptsächlich im Nervensystem exprimiert und codiert für eine E3-Ubiquitin-Ligase, die am Degradationssystem des Proteasoms beteiligt ist. Bis jetzt wurden mehr als 100 verschiedene Mutationen identifiziert, einschließlich Deletionen, Insertionen, Duplikationen, Triplikationen und Punktmutationen. Parkin-Mutationen verursachen Inaktivierung der E3-Ligase-Funktion, was zu einer toxischen Ansammlung von Proteinen, die vom Parkin-abhängigen Ubiquitin / Proteasom-Weg nicht mehr wirksam abgebaut werden können, führt. Die Bildung dieser toxischen Aggregate in den Neuronen der Substantia nigra ist entscheidend für die Pathogenese der familiären PD (SHIMURA et al., 2000). Patienten mit Parkin-Mutationen weisen ein klinisches Syndrom auf, das bis auf den früheren Erkrankungsbeginn nicht von dem des idiopathischen Parkinsons unterscheidbar ist. Diese Patienten reagieren gut auf L-Dopa, weisen jedoch früh motorische Fluktuationen auf (KALINDERI et al., 2016). Interessanterweise fehlt in den meisten Parkin-Fällen die Lewy-Pathologie (FARRER et al., 2001). Außer Parkin gehören PINK1 und DJ-1 zu den Genen, die mit einem autosomal-rezessiven PD-Erbgang assoziiert sind (KALINDERI et al., 2016).

2.3.7 Diagnose

Ziel der Diagnostik ist es, das Parkinsonsyndrom zu erkennen und eine idiopathische Parkinson-Krankheit vom sekundären Parkinsonsyndrom und atypischen Parkinsonsyndrom abzugrenzen. Die „UK Parkinson's Disease Society Brain Bank“-Kriterien (HUGHES et al., 1992)

sind bisher die einzigen neuropathologisch validierten, diagnostischen Kriterien für die Diagnose einer iPD. Es finden sich auch operationalisierte Diagnosekriterien nach Gelb (GELB et al., 1999). In den Leitlinien der „Deutschen Gesellschaft für Neurologie“ (DGN S3-Leitlinie Idiopathisches Parkinson-Syndrom) wird empfohlen, das idiopathische Parkinson-Syndrom klinisch anhand der „UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank“-Kriterien zu diagnostizieren.

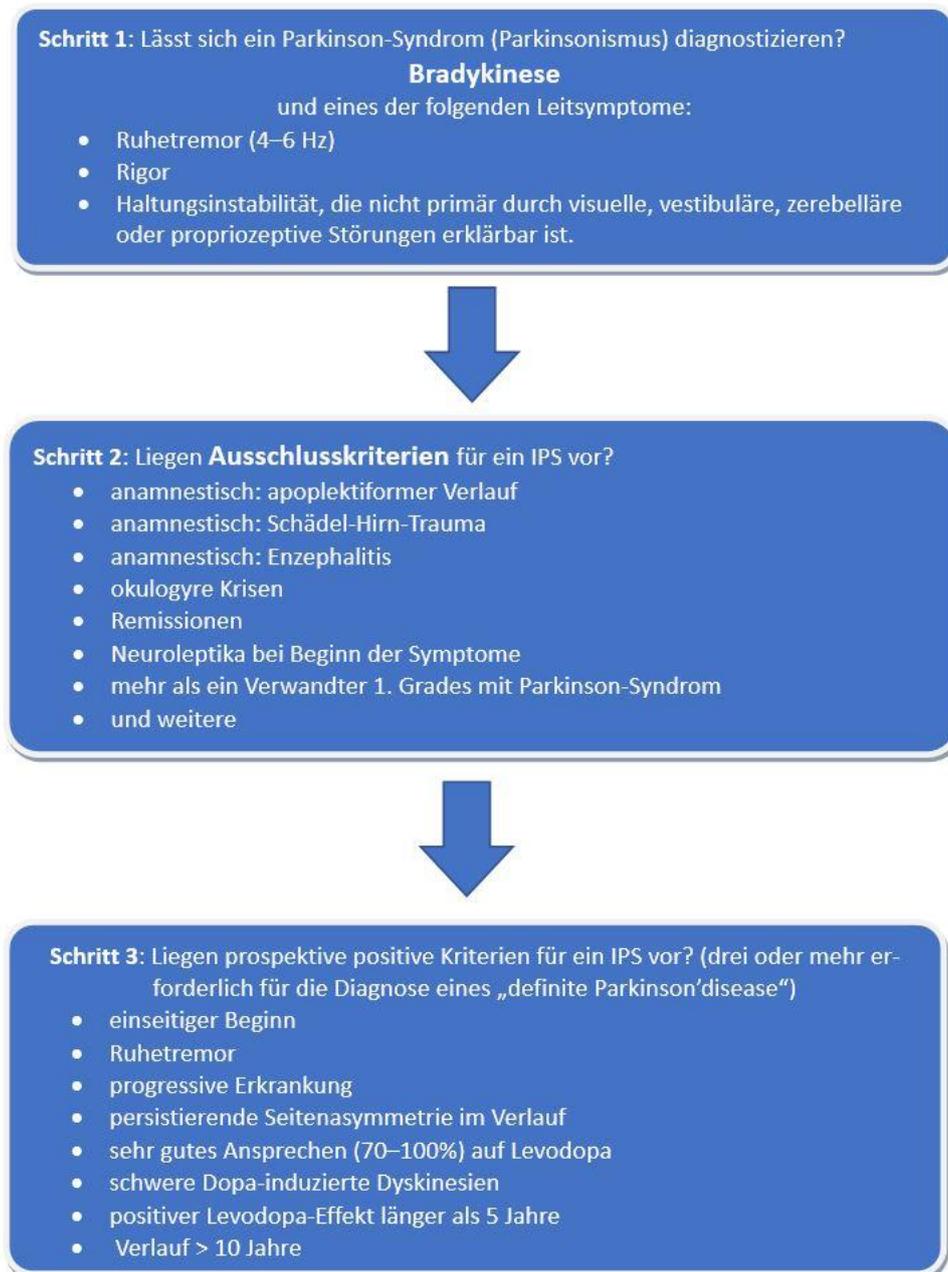


Abbildung 2: Schrittweise Vorgehen für klinische Diagnostik von iPD. Schema erstellt gemäß UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank Kriterien (HUGHES et al., 1992).

Alternativ kann die Diagnose anhand der Diagnosekriterien nach Gelb (GELB et al., 1999) durchgeführt werden. Anhand dieser Diagnosekriterien muss eine definitive Diagnose von iPD neuropathologisch gesichert werden. Dies erfolgt post mortem durch histopathologische Untersuchung der im Rahmen einer Obduktion gewonnenen Gewebeproben. Für eine neuropathologische Diagnose des iPD müssen folgende Kriterien erfüllt werden:

- Nervenzellverlust mit begleitender Gliose in Substantia nigra;
- Wenigstens ein Lewy-Körperchen auf vier nicht überlappenden Schnitten in Substantia nigra oder Locus coeruleus;
- Kein pathologischer Nachweis einer anderen Krankheit, die ein Parkinson-Syndrom bewirken kann.

Die neuropathologische Diagnosestellung bei der Parkinson-Krankheit ist essenziell und muss im Detail betrachtet werden. Die pathognomonischen histologischen Merkmale der iPD bleiben weiterhin die Lewy-Körperchen, die Lewy-Neuriten, Verlust katecholaminerger Neuronen im Locus coeruleus und Verlust dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra. Dabei lässt die klinische Symptomatik eher eine synaptische Störung vermuten. Es wurde gezeigt, dass die kleinen präsynaptisch lokalisierten α -Synukleinaggregate die synaptische Dysfunktion verursachen, wodurch letztendlich die Krankheitssymptome entstehen (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; SCHULZ-SCHAEFFER, 2010). Die Lewy-Körperchen spielen an der Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit eine untergeordnete Rolle und entstehen möglicherweise erst in einem späterem Stadium der Erkrankung als Folge eines zytoprotektiven Prozesses, bei dem feinere α -Synukleinaggregate durch aktiven retrograden Transport auf Mikrotubuli aus der neuronalen Peripherie abgesondert werden (MCNAUGHT et al., 2002). Daraus entsteht die Schlussfolgerung, dass zur neuropathologischen Diagnose von iPD der Nachweis von feineren α -Synukleinaggregaten, und nicht die Lewy-Körperchen, erfolgen muss.

2.3.7.1 Verfügbare Aggregatdetektionsmethoden

Grundsätzlich kann α -Synuklein mittels konventionelle Immunhistochemie mit Antikörpern gegen α -Synuklein durch Immunreaktion sichtbar gemacht werden. Eine Herausforderung stellt die Unterscheidung zwischen physiologischem α -Synuklein und der pathologischen aggregierten Form dar. Aus diesem Grund ist eine Vorbehandlung mit Proteinase K, die das physiologische α -Synuklein verdaut, bei der Immunhistochemie sinnvoll. Eine sichere Unterscheidung zwischen Aggregaten und physiologischem α -Synuklein ist allerdings mittels konventionellen Immunhistochemie nicht zu 100% möglich, da höhere Proteinase K Konzentrationen zur Ablösung des Gewebsschnittes vom Glasobjektträger führen (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015).

Außerdem lassen sich sogar mit Proteinase K-Vorbehandlung mittels Immunhistochemie lediglich größere α -Synukleinaggregate, wie z.B. Lewy-Neuriten nachweisen. Eine deutlich sensitivere Methode im Vergleich zur Immunhistochemie, die den Einsatz von hoher Proteinase K Konzentration bei der Vorbehandlung ermöglicht, ist die Paraffin-Embedded-Tissue (PET) - Blot Färbung. Obwohl die PET-Blot Methode in der Prion-Krankheit-Forschung zum Nachweis von pathologischen Prionproteinaggregaten entwickelt wurde, wird sie derzeit zur neuropathologischen Diagnosestellung anderer neurodegenerativer Erkrankungen, bei welchen Proteinaggregation der zugrunde liegende Pathomechanismus ist, verwendet (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000; SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Bei der PET-Blot Methode werden die Gewebsschnitte statt auf einem Glasobjektträger, auf eine Nitrozellulosemembran mit 0.4 μ m Porengröße aufgezogen. Die Membran ermöglicht den Nachweis von feineren α -Synukleinaggregaten, da diese sich an der Membran binden. Die Bindung erfolgt nach der Mobilisation der Aggregate aus dem Gewebe durch Proteinase-K. Das physiologische, nicht aggregierte α -Synuklein wird durch Proteinase-K verdaut. Außer Verdauung von nicht aggregiertem α -Synuklein dient Proteinase-K auch der Antigen-Demaskierung und der Epitop-Freilegung in den Aggregaten (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000). Die im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie höhere Sensitivität der PET-Blot Färbung für die Detektion von Protein-Aggregaten kann durch die Haftung von Aggregaten durch die hohe Bindungsfähigkeit der Nitrozellulosemembran ebenso wie durch eine bessere Epitop-Freilegung durch die lange Verdauzeit und die hohe Proteinase-K-Konzentration erklärt werden. In der letzten Zeit gewinnt die konventionelle Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein an Popularität, da gezeigt wurde, dass die Aggregate die phosphorylierte Form von α -Synuklein enthalten (FUJIWARA et al., 2002). Es ist aber zu beachten, dass in den Studien, in welchen konventionelle Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein mit PET-Blot verglichen wurde, ein unterschiedliches immunreaktives Muster der zwei jeweiligen Methoden beschrieben wurde. Außerdem wurde gezeigt, dass nicht alle Aggregate phosphoryliertes α -Synuklein enthalten. Somit ist die PET-Blot Färbung ebenso sensitiver als die konventionelle Immunhistochemie mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Zusammenfassend kann man sagen, dass PET-Blot die Methode der Wahl zum Nachweis von α -Synuklein Aggregaten zur neuropathologischen Diagnosestellung von iPD darstellt.

2.3.7.2 Herausforderungen in der Diagnostik

Trotz der Einführung gut definierter Diagnosekriterien, bleibt die klinische Diagnose des Morbus Parkinson eine Herausforderung. In der Literatur variieren die Schätzungen der Genauig-

keit der klinischen Diagnose der Parkinson-Krankheit (ausgedrückt als Sensitivität oder positiver Vorhersagewert) zwischen 46% und 80% (CASLAKE et al., 2008; RIZZO et al., 2016). Diese Gesamtgültigkeit der klinischen Diagnose ist nicht zufriedenstellend. Insbesondere in den frühen Stadien der Erkrankung, in denen das Ansprechen auf eine dopaminerge Behandlung wenig genau definiert ist, ist die klinische Diagnostizierung von iPD fehleranfällig. Dabei ist vor allem im Frühstadium der Erkrankung eine richtige Diagnose von großer Bedeutung, da eine frühe Behandlung von iPD vermutlich am vorteilhaftesten wäre (KLINGELHOEFER, REICHMANN, 2015). Einerseits werden iPD-Patienten übersehen und nicht entsprechend therapiert, andererseits werden Nicht-iPD-Patienten falsch mit iPD diagnostiziert und erhalten ohne therapeutischen Nutzen eine L-Dopa Therapie, die zu gravierenden Nebenwirkungen führen kann. Darüber hinaus führt eine unzureichende klinische Diagnosegenauigkeit dazu, dass bei klinischen Studien und Therapien, die invasive Methoden verwenden (wie beispielsweise tiefe Hirnstimulation) eine beträchtliche Anzahl von Nicht-PD-Patienten potenziell schädlichen Verfahren ausgesetzt werden (LANG et al., 2006; TIR et al., 2007). Eine zentrale Herausforderung der PD-Forschung besteht daher darin, zuverlässige Biomarker für die Diagnose der Parkinson-Krankheit in Früh- oder sogar Prodromalstadium zu identifizieren und zu validieren.

2.4. Ziel der Arbeit / Fragestellung

Die bisherigen Studien an peripheren Gewebebiopsien für iPD Diagnostik konzentrieren sich hauptsächlich auf den immunhistochemischen Nachweis von posttranslational phosphoryliertem α -Synuklein, der mit der Erkrankung assoziiert wird (BEACH et al., 2010; STOKHOLM et al., 2016). Unsere Hypothese ist, dass der Nachweis von α -Synukleinaggregaten der zuverlässigste Biomarker für iPD und DLB ist.

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, ob α -Synukleinaggregate in Drüsengewebe der Gl. submandibularis von iPD- und DLB-Autopsieprobanden zuverlässig in einer Menge gefunden werden können, die eine konventionelle Biopsie als diagnostisches Hilfsmittel erlauben würde.

2.5. Material und Probenherkunft

2.5.3 Probenherkunft

Tabelle 2: Anzahl von Patienten in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe, Patientenalter und Geschlecht

	Untersuchungsgruppe	Kontrollgruppe
Anzahl	14	13
W:M	6:8	5:7
Durschn. Alter	73,9 (50-87)	73;0 (59-90)

Die Studie beinhaltet 27 Fälle. Die Patienten dieser Fälle sind zwischen 2011 und 2018 verstorben und im entsprechenden Zeitraum am Universitätsklinikum Göttingen und am Universitätsklinikum des Saarlandes seziert worden. Bei allen Fällen lag eine unterschriebene Einverständniserklärung zur Obduktion und wissenschaftlichen Untersuchung vor. Für die Probenverwendung in wissenschaftlichen Zwecken lag eine Zustimmung der Ethikkommission Landesärztekammer Hessen, Nr. FF89/2008, Molekulare Pathologie des M. Parkinson (Brainbank) vor.

Die Untersuchungsgruppe besteht aus 14 Patienten, davon wurde bei 11 Patienten neuropathologisch idiopathischer Morbus Parkinson festgestellt und bei 3 Patienten eine Lewy Körperchen-Demenz. Die Erkrankungsdauer ist in Tabelle 3 aufgeführt. Alle 3 DLB Patienten wiesen eine α -Synuklein Pathologie entsprechend eines neokortikalen Stadiums nach McKeith (MCKEITH et al., 1996) auf. Bei 2 Patienten wurde zusätzlich eine Tau- und β -Amyloid Copathologie nachgewiesen.

Bei allen iPD Patienten wurde die Diagnose im Laufe ihres Lebens klinisch gestellt. Allerdings war aus den klinischen Akten zu entnehmen, dass bei 2 Patienten der Beginn von motorischen Symptomen der Erstdiagnose mehrere Jahre vorausging. Bei 2 DLB Patienten wurde die klinische Diagnose einer Demenz vom Alzheimer-Typ gestellt.

Tabelle 3: Übersicht Erkrankungsdauer in der Untersuchungsgruppe

Fall	Erkrankungsdauer in Jahren
PD 1	24
PD 2	22
PD 3	21
PD 4	15
PD 5	12
PD 6	11
DLB 1	10
PD 7	10
PD 8	10
DLB 2	9
PD 9	8
DLB 3	5
PD 10	5
PD 11	1

Die Kontrollgruppe besteht aus 13 Patienten, bei welchen durch neuropathologische Untersuchungen Morbus Parkinson oder DLB ausgeschlossen wurde. Eine Übersicht über die Diagnosen der Kontrollgruppe ist in Tabelle 4 aufgeführt. In der Kontrollgruppe gab es 2 Fälle einer neuropathologisch gestellten Diagnose PSP. Unter diesen 2 Fällen wurde bei einem Patienten zunächst eine klinische Diagnose iPD gestellt und erst 3 Jahren nach dieser Erstdiagnose wurde die richtige Diagnose gestellt. Es gab 2 Fälle von neuropathologisch gesicherten CBD, davon wurde 1 Patient klinisch mit iPD diagnostiziert und ohne Erfolg mit L-Dopa therapiert. Außerdem gab es 1 Patient mit der neuropathologischen Diagnose MSA, der klinisch ebenfalls mit iPD diagnostiziert wurde und entsprechend therapiert wurde. Zusätzlich gab es ein Patient mit neuropathologisch festgestelltem vaskulärem Parkinson, der klinisch mit iPD diagnostiziert wurde und erfolglos mit L-Dopa therapiert wurde.

Tabelle 4: Diagnosen Übersicht der Kontrollgruppe

Fallnummer	Diagnose
KG 1	Demenz Alzheimer Typ
KG 2	Demenz Alzheimer Typ
KG 2	Frontotemporale Dmenz
KG 3	Progressive Supranukläere Paralyse (PSP), klinisch: 2007 Erstdiagnose iPD, 2010 klinische Diagnose PSP
KG 4	Frontotemporale Dmenz
KG 5	Amyotrophe Lateral Sklerose (ALS)
KG 6	Lymphozytäre Enzephalitis
KG 7	Progressive Supranukläere Paralyse (PSP)
KG 8	Multisystem Atrophie, klinische Diagnose iPD
KG 9	Multiple Hirninfarkte
KG 10	Kortikobasale Degeneration, klinische Diagnose iPD
KG 11	Kortikobasale Degeneration
KG 12	Mikroangiopathische Pathologie, klinische Diagnose iPD mit L-Dopa Therapie

2.5.4 Verwendetes Material

Für diese Studie wurden Gewebeproben der Glandula submandibularis der verstorbenen Patienten verwendet. Die für die Untersuchungen verwendeten Gewebeproben entstammten der

Gewebebank des Instituts für Neuropathologie Homburg (Universitätsklinikum des Saarlandes). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde in Paraffin eingebettetes Gewebe verwendet.

2.6. Methoden

2.6.5 Probeentnahme und Probenaufbereitung

2.6.5.1 Anatomische Präparation

In Rahmen einer kombinierten pathologisch-neuropathologischen Autopsie wurde das Gewebe der submandibulären Speicheldrüse asserviert. Eine kleine Gewebeprobe (ca. 2 x 2 x 0,5 cm) wurde für histologische Untersuchungen eingebettet. Diese wurde zuvor mit 4 %iger Lösung aus gepuffertem Formaldehyd (Histofix®, Roth, Deutschland) über mindestens 24 Stunden fixiert.

2.6.5.2 Histologische Präparation

Die formalinfixierten Gewebe wurden nach einem Standardverfahren in einem Einbettautomaten (68910051, Shandon Excelsior, ThermoFischer Scientific UK) in Paraffin eingebettet. Für die nachfolgend beschriebenen Gewebefärbungen (Hämatoxylin Eosin Färbung und immunhistochemische Färbungen) wurden aus den angefertigten Paraffinblocks mit einem Schlittenmikrotom des Modells Leica SM200R 0,5-1 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Glasobjektträger aufgezogen. Anschließend schmolzen diese Schnitte für 12h im Wärmeschrank bei 60°C ab. Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert, rehydriert (s. Anhang) und einer routinemäßigen Hämalaun/Eosin-Färbung [Hämalaun (10924905000, Merck, Darmstadt), Eosinlösung (s. Anhang)] unterzogen.

2.6.6 Immunhistochemische Färbungen

2.6.6.1 Vorversuche

Für die Etablierung einer immunhistochemischen Detektion von pathologischen α -Synukleinaggregaten in den neuronalen Strukturen der Speicheldrüsen, wurden verschiedene Antikörper und verschiedenen Vorbehandlungen an ausgewählten Gewebsschnitten getestet. Anschließend wurden die Antikörperverdünnungen austitriert. Da bei der immunhistochemischen Detektion mit dem monoklonalen α -Synuklein Antikörper LB509 (SIG-39725, COVANCE, Emeryville California) und dem monoklonalen α -Synuklein Antikörper 4B12 (ab1904, Abcam,

Cambridge UK) an Gewebeschnitten eine Kreuzreaktion mit unbekanntem Epitopen der sekretorischen Zellen des Drüsengewebes festzustellen war (siehe Abbildung 3), wurde der Antikörper 10D2 (siehe Tabelle 5) gewählt. Anschließend wurde die passende Vorbehandlung ausgetestet. Die α -Synuklein Färbungen (Antikörper 10D2 und Pser129) mit Inkubation im Dampfkochtopf in Dako Target Retrieval Solution pH 6,1 bzw. pH 9 für 30 min alleine oder in Kombination mit Proteinase K Vorbehandlung (siehe in Endversuche) wiesen deutlich mehr Hintergrund auf als die Färbungen nur mit Proteinase K Vorbehandlung (siehe in Endversuche). Deswegen wurde die Inkubation im Dampfkochtopf in Endversuchen bei Färbungen mit diesen Antikörpern nicht durchgeführt. Danach wurde mittels einer Verdünnungsreihe die richtige Proteinase K Konzentration ausgetestet.

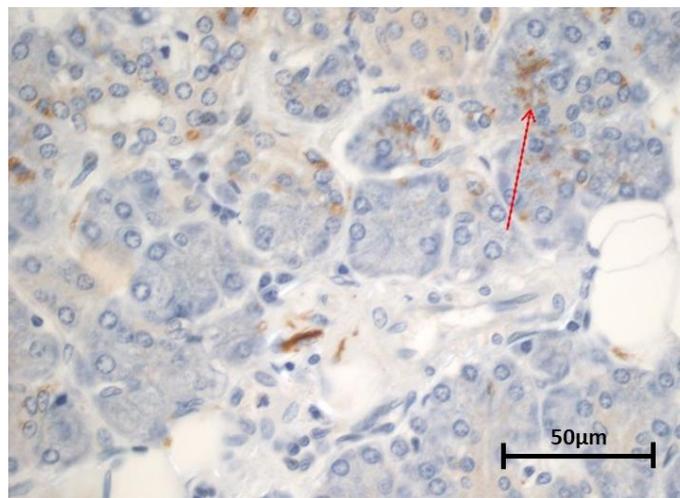


Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper LB509 (1:500 verdünnt), 400x Vergrößerung

2.6.6.2 Endversuche

Für die Endversuche wurden in die Tabelle 5 aufgelisteten Antikörper mit der jeweiligen Verdünnung benutzt.

Tabelle 5: Für die Endversuche Verwendete Antikörper

Primär-antikörper	Quelle	Klon	Spezies	Zielstruktur	Vorbe-handlung	Konz.
10D2	ajROBOSCREEN GmbH, Leipzig Deutschland	10D2	Maus mono-klonal	α -Synuklein, Amino-säuren 119-126	Proteinase K 10 μ g/ml	1:500
pSer129	Abcam, Cambridge United Kingdom	-	Kanin-chen po-lyklonal	α -Synuklein phosphory-liert auf Ser129	Proteinase K 10 μ g/ml	1:10000
Neurofila-ment	Dako, Glostrup Dänemark	2F11	Maus mk	Neurofila-ment Protein	pH 6,1 für 30 Minuten	1:50

Zur Darstellung der α -Synukleinaggregate wurden Färbungen mit den Antikörper 10D2 und pSer129 mit Proteinase K Vorbehandlung durchgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in einer 1 %igen Wasserstoffperoxid Lösung (07284667, Otto Fishtar GmbH Saarbrücken Deutschland) belassen, um gewebeeigene Peroxidasen zu blockieren. Es folgte ein Spül-Schritt mit Aqua destilata. Eine Proteinase K Lösung mit der Konzentration 10 μ g/ml wurde aus Proteinase K Verdau Puffer (siehe Anhang) und 46 units/mg Proteinase K Pulver (P6556, SIGMA-ALDRICH, St. Louis USA) hergestellt. Die Küvetten mit der Proteinase K Lösung wurden bei 37°C für mindestens 30 Minuten im Wärmeschrank untergebracht, um die Lösung auf die richtige Temperatur aufzuwärmen. Anschließend wurden die Glasobjektträger mit den Gewebeschnitten in die Küvetten mit der Proteinase K Lösung gelegt und für 15 Minuten im mit 37°C temperierten Wärmeschrank belassen. Es folgte ein Spül-Schritt mit TRIS-Puffer (Dako Wash Buffer, Dako, Glostrup Dänemark) (3 Mal). Im Anschluß wurden die Glasobjektträger mit Gewebeschnitten auf Coverplates (72110017, Thermo Scientific Runcorn UK) gebracht und 1 Mal mit TRIS-Puffer gespült. Die primären Antikörper wurden mit Dako REAL Antibody Diluent (S2022, Dako, Glostrup Dänemark) verdünnt und auf die Gewebeschnitte

aufgebracht (100µl pro Objektträger). Die Inkubationszeit für primäre Antikörper betrug 45 Minuten. Es folgte ein Spül-Sschritt mit TRIS-Puffer (3 Mal). Anschließend wurden die sekundären Antikörper Dako REAL Envision HRP Rabbit/Mouse (K5007, Dako Glostrup Dänemark) auf die Gewebsschnitte aufgebracht (100µl pro Objektträger) und für 30 Minuten inkubiert. Es folgte ein Spülschritt mit TRIS-Puffer (3 Mal). Die Objektträger wurden aus den Coverplates entnommen und in die feuchte Kammer gelegt. Die Antigen-Antikörper Komplexe wurden mit Hilfe eines Zweikomponentensystems, bestehend aus einem flüssigen stabilen DAB-Chromogen (K5007, Dako Glostrup Dänemark) und einem DAB-Substratpuffer (K5007, Dako Glostrup Dänemark) (25µl DAB-Chromogen pro 1 ml DAB-Substratpuffer), sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Gewebsschnitte für 18 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt und für mindestens 10 Minuten in einer Küvette unter fließendem Leitungswasser gespült.

Zur Darstellung des nicht aggregierten α -Synukleins in den neuronalen Strukturen wurde zusätzlich eine Färbung mit dem Antikörper 10D2 ohne Proteinase K Vorbehandlung durchgeführt. Um zu überprüfen, ob phosphoryliertes α -Synuklein nur in Proteinase-K resistenten α -Synukleinaggregaten vorhanden ist, wurde weiterhin eine Färbung mit dem Antikörper pSer129 ohne Proteinase-K Vorbehandlung durchgeführt.

Bei den immunhistochemischen Färbungen mit dem Neurofilament-Antikörper für Antigendemaskierung erfolgte keine Proteinase K Vorbehandlung. Stattdessen wurden die Glasobjektträger mit Gewebsschnitten im Dampfbad (6130245382, Vitalis E Dampfgerar, WMF, Geislingen an der Steige) in Dako Target Retrieval Solution mit einem pH von 6,1 für 30 Minuten inkubiert und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur runtergekühlt. Es folgte ein Spülschritt mit Aqua Dest. Die restlichen Schritte entsprechen denen der Färbung zur Darstellung der α -Synukleinaggregate.

2.6.6.3 Auswertung mittels Durchlichtmikroskop

Für die Untersuchung der immunhistochemischen Färbungen mit dem Antikörper 10D2 und PSer129 wurden pro Gewebsschnitt 10 beliebige Gesichtsfelder unter 20-facher Vergrößerung eines Durchlichtmikroskops (DM 5000 B, Leica, Deutschland) analysiert. Der Durchmesser des Sehfeldes betrug dabei 1,2 mm. Bei der Auswertung der 10 Gesichtsfelder wurde auf die immunreaktiven Fasern und immunreaktive Nerven geachtet.

Bei immunreaktiven Fasern handelt es sich um durch Antigen-Antikörper Reaktion sichtbar gemachte intrazelluläre α -Synuklein-Ablagerungen in einzelnen Zellfortsätzen. Tangential angeschnittene immunreaktive Fasern erscheinen länglich (0,01-0,1 mm lang), dünn, gewunden

oder gebogen. Senkrecht angeschnittene immunreaktive Fasern erscheinen als einzelne Punkte. Immunreaktive Nerven sind mikroskopisch als Nerv identifizierbaren Strukturen, die α -Synuklein-Ablagerungen aufweisen.

Es wurde gezählt, in wie vielen der 10 Gesichtsfelder eine sicher zur Diagnose führende Pathologie zu erkennen war. Als sicher zur Diagnose führende Pathologie wurde das Vorhandensein von mindestens einer sicher identifizierbaren immunreaktiven Faser oder einem immunreaktiven Nerv pro Gesichtsfeld definiert. Anhand dieser Anzahl wurde ausgerechnet, wie viele beliebige Gesichtsfelder benötigt werden, um auf eine sicher zur Diagnose führende Pathologie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% zu treffen. Unter 20-facher Vergrößerung wurde mithilfe des genannten Mikroskops der Durchmesser des Gesichtsfeldes bestimmt, um anhand dieser Größe die Fläche des Gesichtsfeldes zu berechnen. Auf diese Weise wurde die Mindestfläche des Unterkieferspeicheldrüsengewebes bestimmt, die in einer Biopsie notwendigerweise entnommen werden müsste, um auf eine mit Sicherheit zur Diagnose führenden Pathologie zu treffen. Außerdem wurde gezählt, wie viele der 10 Gesichtsfelder nur immunreaktive Nerven enthielten. Somit konnte eine Aussage getroffen werden, ob eine Biopsie, bei der kein Nerv getroffen wurde, zu verwenden wäre.

Die in jedem der 10 Gesichtsfelder zu sehenden immunreaktiven Fasern und immunreaktiven Nerven wurden gezählt und summiert. Diese Anzahl wurde als Score zum entsprechenden Gewebsschnitt für die Färbung mit dem jeweiligen Antikörper zugeteilt. Zusätzlich zu den 10 Gesichtsfelder wurden die Nerven in dem Gewebsschnitt, wie in Tabelle 6 erläutert, ausgewertet.

Die HE-Färbung ermöglichte eine Identifizierung von Strukturen wie Gefäß, Ausführungsgang oder Nerv sofern dies in PET-Blot nicht möglich war. Die Färbung mit dem Neurofilament-Antikörper diente der sicheren Darstellung von neuronalen Strukturen.

Tabelle 6: Auswertung der im Gewebsschnitt vorhandenen Nerven

Bewertung	Bedeutung
1	Nur einige auf dem Gewebsschnitt zu sehenden Nerven betroffen, die meisten weisen keine Pathologie auf. Ein betroffener Nerv weist eine geringe Dichte von α -Synuklein-Ablagerungen auf.
2	Die meisten auf dem Gewebsschnitt zu sehenden Nerven weisen eine geringe bis mittlere Dichte von α -Synuklein-Ablagerungen auf. Nur wenige Nerven sind nicht betroffen.
3	Alle auf dem Gewebsschnitt zu sehenden Nerven weisen eine geringe bis hohe Dichte von α -Synuklein-Ablagerungen auf.
4	Alle auf dem Gewebsschnitt zu sehenden Nerven sind stark betroffen und weisen eine mittlere bis hohe Dichte von α -Synuklein-Ablagerungen auf.

2.6.7 Paraffin Embedded Tissue Blot

2.6.7.1 Vorbereitung des in Paraffin eingebetteten Gewebes

Zur Vorbereitung wurden 1-2 μm dicke Gewebsschnitte auf Nitrozellulose Membranen mit der Porengröße 0,45 μm (162-0115, BIO-RAD, Hercules USA) aufgezogen, 10 Minuten auf einer Wärmeplatte getrocknet und anschließend in einem Wärmeschrank bei 60°C für 2 Tage gelagert. Danach wurden die Membranen entparaffiniert und rehydriert (siehe Anhang). Die Membranen wurden im Anschluss mit Papiertüchern abgetupft und für mindestens eine Nacht zwischen Papiertuchstreifen unter beschwerten Glasplatten (wie in Abbildung zu sehen) getrocknet.



Abbildung 4: PET-Blot Membranen zwischen Papiertuchstreifen unter beschwerten Glasplatten

2.6.7.2 Vorversuche

Es wurde ein von Prof. Schulz-Schaeffer entwickeltes PET-Blot Protokoll zur Detektion von humanen Prionproteinaggregaten (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000) verwendet. Eine adaptierte Version dieses Protokolls wird in dem Institut für Neuropathologie (Universitätsklinikum des Saarlandes) routinemäßig zur Detektion von α -Synuklein-Ablagerungen im Hirngewebe genutzt. Um das Protokoll für die Detektion von α -Synukleinaggregaten in den neuralen Strukturen von Speicheldrüsen verwenden zu können, wurde die Konzentration der primären Antikörper 10D2 und pSer129 und der sekundären Antikörper austitriert. Mit dem Ziel der besseren optischen Darstellung der Gewebsstrukturen wie Gefäße, Ausführungsgänge, Drüsenazini oder Nerven wurde außerdem versucht die mittels PET-Blot gefärbte Membrane in Hämalaun für 10-15 Sekunden gegenzufärben. Da diese Vorgehensweise aber nicht zum gewünschten Ergebnis führte, wurde in den Endversuchen auf die Gegenfärbung verzichtet.

2.6.7.3 Durchführung

Für jeden Gewebsschnitt wurden zwei PET-Blot Färbungen mit den in der Tabelle 7 aufgeführten Antikörpern durchgeführt. Die Membranen wurden einem Verdau mit Proteinase K unterzogen. Dafür wurde zunächst eine Proteinase K in Proteinase-K-Puffer (siehe Anhang) Lösung einer Konzentration 250 μ g/ml hergestellt. Die Membranen wurden auf Einwegtüchern (8382, Kimberly-Clark Professional USA) in flache Plastikboxen gelegt und mit Proteinase K-Lösung getränkt. Die Boxen mit den Membranen wurden luftdicht verpackt, um ein Austrocknen zu vermeiden und in einem Wärmeschrank bei 60°C für 12 Stunden inkubiert.

Die folgenden Schritte wurden bei Lufttemperatur und, soweit nicht anders angegeben, auf einem Schüttler (Heidoph Duomax 1030, Schütt Göttingen) durchgeführt. Die Membranen wurden drei Mal für 5 Minuten mit TBST (siehe Anhang) gespült. Zur Epitopfreilegung wurden die Membranen einer fünfzehnminütigen Denaturierung in einer Sammelbox in 4M GdSCN (siehe Anhang) unterzogen. Es folgte ein Spülschritt mit TBST. Anschließend wurden die Membranen in sauberer, flache Plastikboxen gelegt, mit einem Plastikeinsatz befestigt und für 45 Minuten mit einer 0,2%-igen Caseinlösung (20 ml pro Box) getränkt. Es folgte eine neunzigminütige Inkubation mit in TBST verdünnten primären Antikörpern. Anschließend erfolgten fünf Waschschritte mit TBST für jeweils 10 Minuten. Danach wurden die Membranen für 60 Minuten mit in TBST verdünnten sekundären Antikörpern inkubiert. Der Spülvorgang mit TBST wurde wiederholt. Daraufhin wurden die Membranen zwei Mal für 5 Minuten im NTM-Puffer gespült, um den für die Farbreaktion erforderlichen pH-Wert von 9,5 zu erreichen. Um die Antigen-Antikörper Komplexe sichtbar zu machen, wurde die Lösung von NBT/BCIP und NTM für 15-20 Minuten auf die Membranen gegeben. Die Farbreaktion wurde mit PBS (siehe Anhang) gestoppt. Daraufhin wurden die Membranen für 30 Minuten in Aqua dest. gespült. Schließlich wurden die Membranen mit Papiertüchern abgetupft und für 12-24 Stunden zwischen zwei Lagen Whatman-Papier gepresst und getrocknet.

Tabelle 7: Für PET-Blot Färbungen verwendeten Antikörper.

Prim.-AK	Quelle	Konz.	Zielstruktur	Sek.-AK	Konz.
10D2	ajROBOSCREEN GmbH, Leipzig Deutschland	1:5000	α -Synuklein, Aminosäuren 119-126	Polyclonal Goat Antimouse, AP-gekoppelt (D0486, Dako Dänemark)	1:1000
pSer129	Abcam, Cambridge United Kingdom	1:10000	α -Synuklein phosphoryliert auf Ser129	Polyclonal Goat Antirabbit, AP-gekoppelt (D0487, Dako Dänemark)	1:500

2.6.7.4 Auswertung mittels Auflichtmikroskops

Für die Untersuchung der PET-Blot Färbungen mit den Antikörpern 10D2 und pSer129 wurde ein Auflichtmikroskop (SZX12, Olympus, Japan) mit einem 20-fachem Objektiv und externer Lichtquelle (Highlight 3001, Olympus Europe, Hamburg) verwendet. Die Zoomeinstellung wurde auf Stufe 48 eingestellt. Demnach wurde ein Sehfeld mit einem Durchmesser von 1,2 mm erreicht, sodass der Durchmesser eines Gesichtsfeldes im Auflichtmikroskop dem Durchmesser eines Gesichtsfeldes im Durchlichtmikroskop entsprach. Das Auswertungsschema für die PET-Blot Färbungen ist identisch mit dem Schema für die immunhistochemischen Färbungen.

2.6.8 Statistische Auswertung

Die Statistische Auswertung erfolgte nach Konsultation in dem Institut für Statistik.

2.6.8.1 Korrelationsanalyse

Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Erkrankungsdauer der Patienten und der Intensität der α -Synuklein Immunreaktivität der Nerven sowohl in PET-Blot Färbungen als auch in konventionellen immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Da die Voraussetzungen für ein parametrisches Verfahren nicht erfüllt sind (die Daten sind nicht normalverteilt) und die Stichproben klein sind, wurde eine Rangkorrelationsanalyse nach Spearman vorgenommen. Außer dem Korrelationskoeffizienten nach Spearman R_s wurde zusätzlich das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt. Wird dieser Wert mit 100 multipliziert, ergibt sich ein Prozentwert. Dieser gibt an, welcher Anteil der Varianz in beiden Variablen durch gemeinsame Varianzquellen determiniert wird. Für die Korrelationsanalyse zwischen Erkrankungsdauer der Patienten und dem Score wurde ebenfalls aus den gleichen Gründen die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman vorgenommen. Alle Rangkorrelationsanalysen wurden mit dem Software IBM SPSS Statistics durchgeführt.

2.6.8.2 Testung der Stichproben für statistisch signifikante Unterschiede

Um statistisch signifikante Unterschiede der Ergebnissen der Färbungen mit verschiedenen Methoden festzustellen, wurden zunächst für die erhobenen gepaarten Stichproben sowohl der Score-Werte als auch der Biopsiemindestfläche-Werte auf Gleichheit des Lageparameters überprüft. Da die Stichproben nicht normalverteilt sind wurde der Friedman-Test verwendet. Danach, da es sich um abhängige Stichproben handelt und die Voraussetzungen für einen t-Test nicht erfüllt sind, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt, um die Stichproben für statistisch

signifikante Unterschiede paarweise zu testen. Alle Testungen wurden mit dem Software IBM SPSS Statistics durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.2. Deskriptiver Befund der Durchlichtmikroskopie

3.2.9 HE Färbung

In der HE Färbung präsentierte sich ein typischer Befund für die Glandula Submandibularis: eine gemischte, überwiegend seröse Drüse. Es waren auf den mukösen Azini aufsitzende seröse Halbmonde (von-Ebner-Halbmonde) zu erkennen. Zwischen den Azini waren Schalt- und Streifenstücke zu sehen. Ebenfalls deutlich zu erkennen waren die Bindegewebs-Trabekel mit in ihnen liegenden intralobulären Ausführungsgängen, Nerven verschiedener Kaliber (10 – 600µm in Diameter) und Gefäßen. Es waren keine morphologischen Veränderungen des Drüsengewebes der Patienten in der Untersuchungsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe festzustellen. Ebenfalls waren es keine Lewy-Körperchen oder Lewy-Neuriten sichtbar.

3.2.10 Immunhistochemische Färbung

In der immunhistochemischen Färbung erschien das Drüsengewebe blau und die immunreaktiven Strukturen braun.

3.2.10.1 Neurofilament-Immunhistochemie

Da für die neuropathologische Diagnostik der Parkinson-Krankheit oder Lewy-Körperchen-Demenz verwendbares Biopsiematerial neuronales Gewebe enthalten muss, wurden zunächst die neuronalen Strukturen in der Glandula Submandibularis untersucht. Um das neuronale Gewebe in der Glandula Submandibularis sichtbar zu machen und das Verhältnis zwischen Drüsengewebe und neuronalem Gewebe zu beurteilen, wurden immunhistochemische Färbungen mit Neurofilament Antikörper durchgeführt. In dieser Färbung ließen sich die Nerven darstellen. Die lagen in den bindegewebigen Septen in dem ganzen Schnitt gleichmäßig verteilt. Zusätzlich zu den Nerven ließen sich auch einzelne Nervenzellfortsätze darstellen. Die präsentierten sich als dünne Stränge oder Punkte, abhängig davon, ob sie tangential oder senkrecht angeschnitten wurden. Die Nervenzellfortsätze lagen zwischen einzelnen Drüsenazini, um die Schaltgänge herum, in den bindegewebigen Septen, um die Ausführungsgänge und Gefäße

und waren ebenfalls gleichmäßig in den Schnitten verteilt. Dies verdeutlicht, dass das Drüsenparenchym reichlich mit den Nerven und einzelnen Nervenzellfortsätzen durchdrungen ist und deswegen als Zielort der Biopsie, die peripheres vegetatives Nervensystemgewebe enthalten muss, gut geeignet ist.

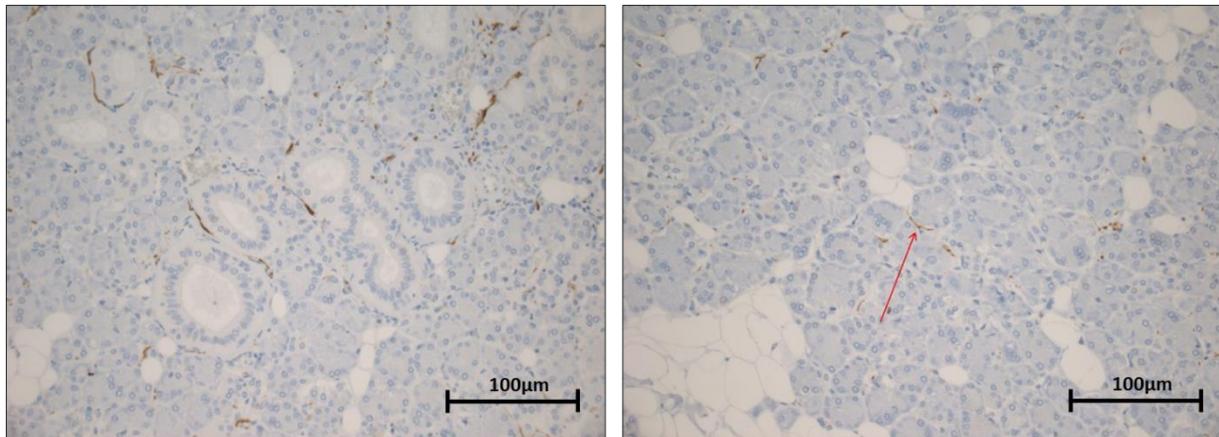


Abbildung 5: Einzelne Nervenzellenfortsätze in dem Drüsenparenchym. Immunhistochemie mit dem Neurofilament-Antikörper. Vergrößerung : 200x

3.2.10.2 α -Synuklein Immunhistochemie

Zunächst wurden immunhistochemische Färbungen mit den 10D2 und pSer129 Antikörpern ohne Vorbehandlung mit Proteinase K durchgeführt. In der Färbung mit dem 10D2 Antikörper ohne Proteinase K ließ sich Immunreaktivität in den Nerven in allen Präparaten, sowohl aus der Untersuchungsgruppe als auch aus der Kontrollgruppe, feststellen. Die Nerven waren im Ganzen angefärbt. Der Befund ähnelte dem von der Neurofilament-Immunhistochemie.

In der Färbung mit dem Antikörper gegen das phosphorylierte α -Synuklein ließen sich immunreaktive Fasern im Drüsenparenchym und immunreaktive Nerven in den Präparaten bei 12 Fällen der Untersuchungsgruppe darstellen. Im Vergleich zu der Färbung mit dem gleichen Antikörper mit Proteinase K allerdings waren deutlich weniger immunreaktive Fasern darzustellen und die Nerven waren schwächer immunreaktiv. In allen Schnitten aus der Kontrollgruppe ließ sich keine Immunreaktivität feststellen.

Bei 12 aus 14 Fällen der Untersuchungsgruppe ließen sich in dem ersten Schnitt mit immunhistochemischen Färbungen mit 10D2 und pSer129 Antikörpern mit Proteinase K-Vorbehandlung immunreaktive Strukturen darstellen. Für die zwei negativen Fälle wurden zusätzliche Stufenschnitte angefertigt, um die Pathologie, die sich auf der anderen Ebene des Präparates befinden könnte, zu erfassen. Aber auch in zusätzlichen Schnitten war bei diesen zwei Fällen keine Immunreaktivität festzustellen. Somit waren in ca. 85% der mittels Immunhistochemie

angefärbten Präparate immunreaktive Strukturen zu erkennen. Es präsentierten sich immunreaktive Fasern (Lewy Neuriten) und immunreaktive Nerven. Immunreaktive Fasern sind nach dem Verdau mit Proteinase K gebliebene und mittels Antigen-Antikörper Reaktion sichtbar gemachte intrazelluläre α -Synuklein-Ablagerungen in den einzelnen Nervenzellenfortsätzen. Die tangential angeschnittenen immunreaktiven Fasern erscheinen länglich (0,01-0,1mm), dünn, gewunden oder gebogen. Die senkrecht angeschnittenen Fasern erschienen als einzelne Punkte. Die kamen in dem Drüsenparenchym vor: besonders reichlich waren sie um die Schaltgänge und zwischen einzelnen Drüsenazini vorhanden. Sie waren auch öfter in den bindegewebigen Septen um die Ausführungsgänge zu finden und selten um die Gefäße. Die immunreaktiven Strukturen waren nicht gleichmäßig in dem Drüsengewebe verteilt: einige Stellen in den Präparaten wiesen eine hohe Dichte von den immunreaktiven Strukturen auf, dabei gab es an anderen Stellen nur einige immunreaktive Fasern/immunreaktive Nerven oder gar keine.

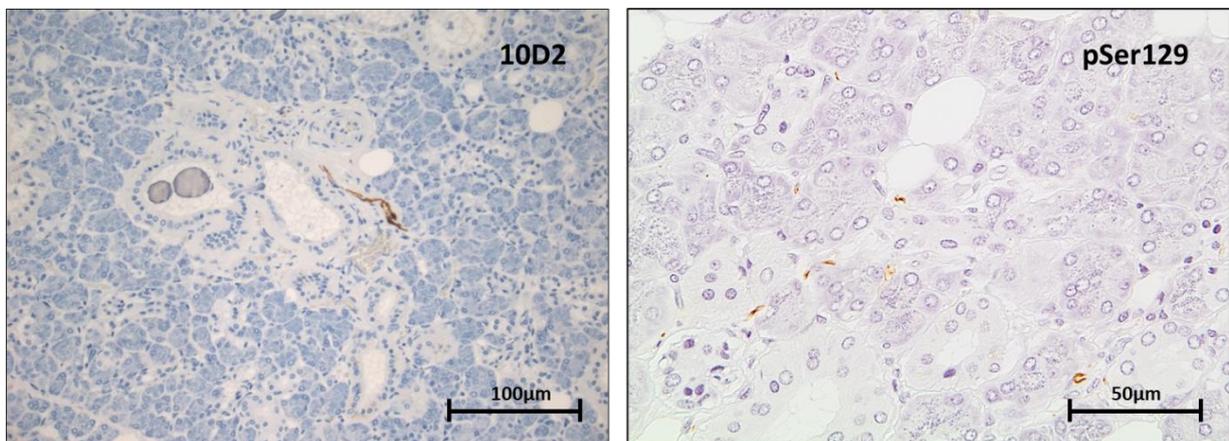


Abbildung 6: mit den Antikörpern 10D2 und pSer129 detektierte immunreaktive Fasern. Immunhistochemie mit PK Verdau. Links Vergrößerung 200x, rechts Vergrößerung 400x

Immunreaktive Nerven sind mikroskopisch als Nerv identifizierbare Strukturen, die immunreaktive Fasern und größere rundliche α -Synukleinaggregate enthalten.

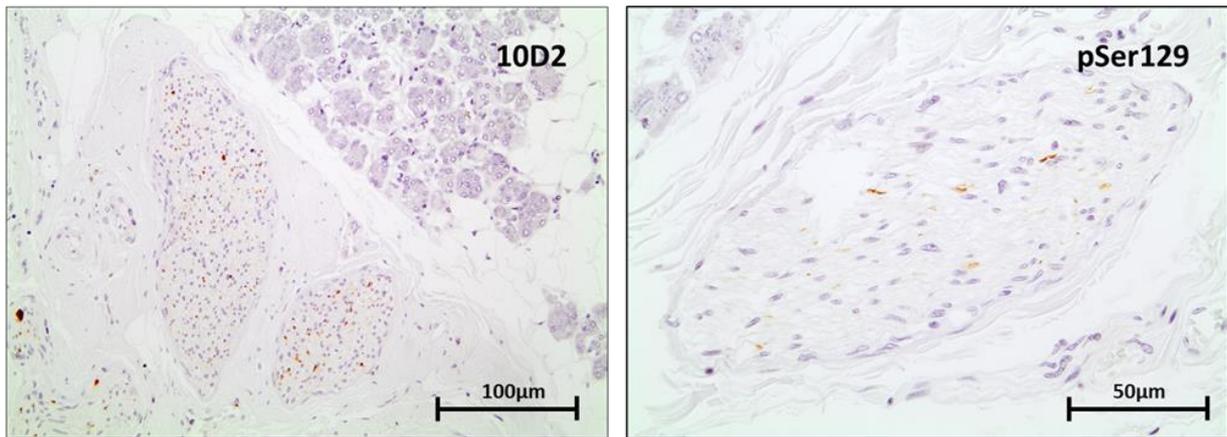


Abbildung 7: mit Antikörpern 10D2 und pSer129 detektierte immunreaktive Nerven. Immunhistochemie mit PK Verdau. Links Vergrößerung 200x, rechts Vergrößerung 400x

In den Präparaten der Untersuchungsgruppe wurden die im Gewebeschnitt zu sehenden Nerven untersucht. In jedem Fall der Untersuchungsgruppe waren im Gewebeschnitt mehrere Nerven verschiedener Kaliber zu sehen. Aber nur in wenigen Fällen wiesen alle im Gewebeschnitt zu sehenden Nerven Immunreaktivität auf. Für die Fälle der Untersuchungsgruppe wurde, wie in der Auswertung mittels Durchlichtmikroskopie (3.3.6.3) beschrieben ist, die Bewertung der Intensität der Immunreaktion der in dem Schnitt zu sehenden Nerven durchgeführt.

Tabelle 8: Quantifizierung der α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven der glandula submandibularis von PD/DLB-Autopsien

Fall	IH 10D2 PK	IH pS129 PK
PD 1	3	3
PD 2	1	2
PD 3	4	3
PD 4	4	2
PD5	1	1
PD 6	1	1
PD7	0	0
PD 8	3	2
PD 9	3	3
PD 10	0	0
PD 11	1	1
DLB 1	1	1
DLB 2	2	2
DLB 3	3	3

Anschließend wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Erkrankungsdauer der Patienten und der Intensität der α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven durchgeführt. Ein Patient wurde aus der Korrelationsanalyse ausgeschlossen, da bei ihm der Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. der Erkrankungsbeginn nicht festzustellen war.

Tabelle 9: Korrelationsanalyse zwischen α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven in Immunhistochemie Präparaten und Erkrankungsdauer

Fallnummer	Erkrankungsdauer	IH 10D2 PK	IH pS129 PK
PD 1	24	3	2
PD 2	22	3	4
PD 3	21	1	3
PD 4	15	3	3
PD5	12	1	1
PD 6	11	1	1
PD 7	10	3	2
PD 8	10	0	0
PD 9	8	3	3
PD 10	5	0	0
PD 11	1	1	1
DLB 1	10	1	1
DLB 2	9	2	2
DLB 3	5	3	4
	R_s	0.12	0.165
	Bestimmtheitsmaß	0.0144	0.0272
	p-Wert	0.696	0.591

Der p-Wert > 0.05 , der geringe Korrelationskoeffizient nach Spearman und Bestimmtheitsmaß (R^2) deuten darauf hin, dass es keine statistisch relevante Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und der Intensität der α -Synukleinreaktivität der Nerven besteht. Daraus leitet sich ab, dass die Nerven der Unterkieferspeicheldrüse von der α -Synuklein-Pathologie unabhängig von der Erkrankungsdauer betroffen zu sein scheinen.

In keinem Fall der Kontrollgruppe wurde in den Färbungen weder mit dem Antikörper pSer129 noch mit dem Antikörper 10D2 mit Proteinase K-Vorbehandlung Immunreaktivität festgestellt bzw. es wurden keine α -Synukleinaggregate nachgewiesen.

3.3. Deskriptiver Befund mittels Auflichtmikroskopie (PET-Blot)

In der PET-Blot Färbung erschien das Drüsengewebe farblos und die immunreaktiven Strukturen dunkelblau. Das Drüsengewebe erschien farblos, da bei der PET-Blot Färbung keine Gegenfärbung durchgeführt wurde. Einzelne Zellen des Drüsengewebes waren, im Gegensatz zu der immunhistochemischen Färbung, nicht abzugrenzen. Bindegewebsstrukturen haben vom NBT der Farbreaktion eine leicht bräunliche Färbung bekommen. Gefäße, Ausführungsgänge und Schaltgänge waren dadurch anhand der Lumina zu erkennen. Nur große Nerven waren mikroskopisch als Nerv identifizierbar.

Bei 12 der 14 Fälle der Untersuchungsgruppe ließen sich mittels PET-Blot Färbung sowohl mit dem 10D2 als auch mit dem pSer129 Antikörper immunreaktive Strukturen darstellen. Dies waren die 12 Fälle, die in der konventionellen Immunhistochemie ebenfalls positiv waren. Somit waren *in 85%* der mittels PET-Blot angefärbten Präparate immunreaktive Strukturen zu erkennen. Die 2 Fälle der Untersuchungsgruppe, bei denen mittels Immunhistochemie keine α -Synukleinaggregate dargestellt werden konnten, waren auch in der PET-Blot Färbung, sowohl im primären Schnitt als auch in später angefertigten Stufenschnitten, negativ.

Wie in der Immunhistochemie präsentierte sich bei den PET-Blot Präparaten ein Befund aus immunreaktiven Fasern (Lewy Neuriten) und immunreaktiven Nerven. Die immunreaktiven Fasern kamen in dem Drüsenparenchym zwischen Drüsenazini, um die Schaltgänge und in den bindegewebigen Septen um die Ausführungsgänge und Gefäße vor. Wie in der Immunhistochemie waren die mittels PET-Blot sichtbar gemachten immunreaktiven Strukturen nicht gleichmäßig im Drüsengewebe verteilt.

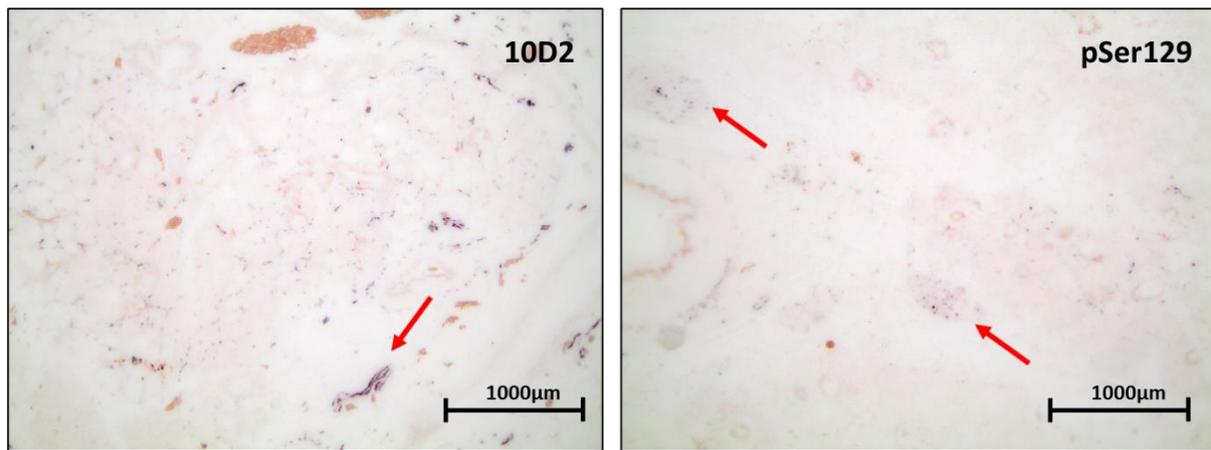
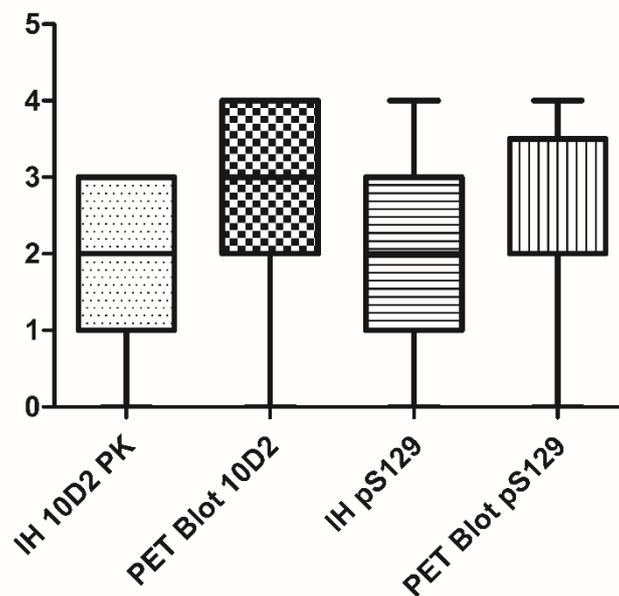


Abbildung 8: Typische Befunde der PET-Blot Färbung mit Antikörpern 10D2 und pSer129. Mit den roten Pfeilen sind die immunreaktiven Nerven markiert. Vergrößerung 100x

Im Vergleich zur Immunhistochemie präsentierten sich pro Gewebsschnitt allerdings deutlich mehr immunreaktive Fasern. Die Nerven wiesen meistens auch eine intensivere Färbung auf, als in der Immunhistochemie. Dies ist in der folgenden Grafik zu erkennen.

Grafik 1: α -Synukleinpathologie in Nerven der Glandula submandibularis bei PD/DLB: Vergleich der Intensität verschiedener Nachweismethoden und verschiedener Antikörper



Auch für die im PET-Blot erhobenen Befunde wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Erkrankungsdauer der Patienten und der Bewertung des Nervenbefalls durchgeführt. Ein Patient wurde aus der Korrelationsanalyse ausgeschlossen, da bei ihm der Zeitpunkt der Erstdiagnose bzw. der Erkrankungsbeginn nicht festzustellen war.

Tabelle 10: Korrelationsanalyse zwischen α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven in PET-Blot Präparaten und Erkrankungsdauer

Fallnummer	Erkrankungsdauer	PET Blot 10D2	PET Blot pS129
PD 1	24	4	3
PD 2	22	4	4
PD 3	21	3	3
PD 4	15	4	4
PD 5	12	3	1
PD 6	11	2	2
PD 7	10	0	0
PD 8	10	3	2
PD 9	8	2	4
PD 10	5	0	0
PD 11	1	2	2
DLB 1	10	3	2
DLB 2	9	4	2
DLB 3	5	4	2
	Rs	0.371	0.372
	Bestimmtheitsmaß	0.137	0.138
	p-Wert	0.212	0.211

Der p-Wert > 0.05 , der geringe Korrelationskoeffizient nach Spearman und Bestimmtheitsmaß (R^2) deuten darauf hin, dass es keine statistisch relevante Korrelation zwischen Erkrankungsdauer und der Intensität der α -Synukleinreaktivität der Nerven besteht. Daraus leitet sich ab, dass die Nerven der Unterkieferspeicheldrüse von der α -Synuklein-Pathologie unabhängig von der Erkrankungsdauer betroffen zu sein scheinen. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen der konventionellen Immunhistochemie.

Mittels PET-Blot angefärbte Präparate wiesen häufiger Pigmentartefakte auf, nämlich Formalinpräzipitate. Diese sind schwarze, dicke Punkte, die entweder einzeln oder in kleinen Ansammlungen vorkommen. Obwohl Ansammlungen von Formalinpräzipitaten sicher als Artefakt zu identifizieren sind, erscheinen einzelne Formalinpräzipitate sehr ähnlich zu den senkrecht angeschnittenen immunreaktiven Fasern und sind öfter mikroskopisch voneinander nicht zu unterscheiden.

Alle mittels PET-Blot angefärbte Präparate der Kontrollgruppe wiesen keine immunreaktiven Strukturen auf.

3.4. Detektion der α -Synukleinaggregaten

Der durch Auswertung von 10 beliebigen Gesichtsfeldern bei 200x Vergrößerung erhobene Score verbildlicht das Vorkommen der immunreaktiven Fasern (Lewy Neuriten) und der immunreaktiven Nerven im Drüsengewebe bzw. das Vermögen von der verwendeten Methode, die α -Synukleinaggregate in einzelnen Nervenzellfortsätzen im Drüsengewebe und in den Nerven sichtbar zu machen. Die Score-Erhebung in immunhistochemische Färbung und PET-Blot Färbung mit beiden Antikörpern wurde für jeden Fall der Untersuchungsgruppe drei Mal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Von den erhobenen Werten wurde jeweils der abgerundete Mittelwert bestimmt, sodass sich die in Tabelle 11 und der Grafik 2 aufgeführte Ergebnisse ergaben.

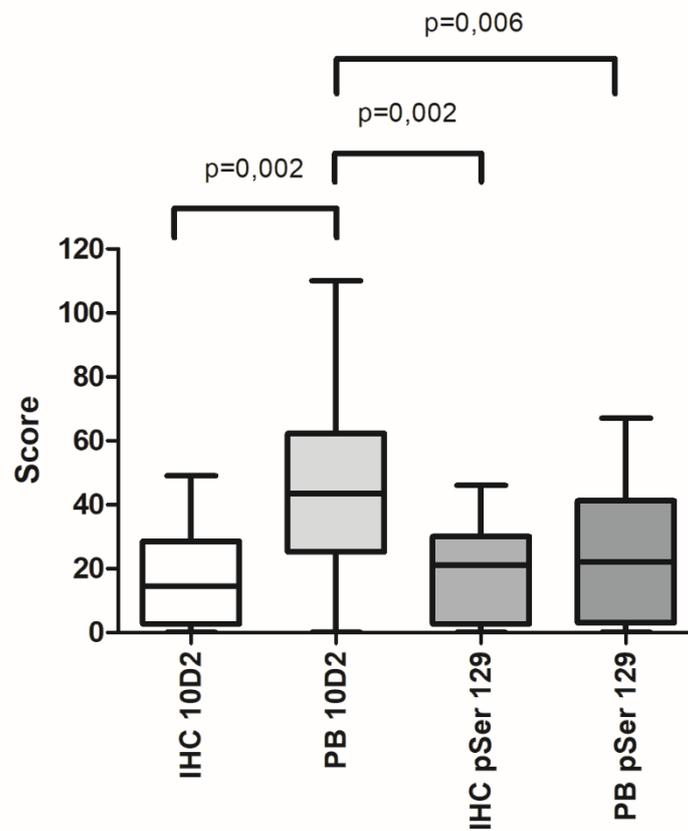
Tabelle 11: Anzahl von in 10 Gesichtsfeldern identifizierten immunreaktiven Strukturen (Scores) bei verschiedenen Alpa-Synuklein-Nachweismethoden

Fall	IH 10D2 PK	PET Blot 10D2	IH pS129	PET Blot pS129
PD 1	28	75	30	40
PD 2	45	108	46	67
PD 3	16	52	30	12
PD 4	49	110	33	27
PD 5	3	23	2	3
PD 6	11	38	10	18
PD 7	0	0	0	0
PD 8	30	45	22	40
PD 9	13	26	20	45
PD 10	0	0	0	0
PD 11	2	30	3	3
DLB 1	13	42	28	46
DLB 2	18	53	23	26
DLB 3	20	58	16	18

Tabelle 12: Erläuterung zu Grafik 2

	IH 10D2 PK	PET Blot 10D2	IH pS129	PET Blot pS129
Minimalwert	0	0	0	0
Erstes Quartil	5	27	4.75	5.25
Median	14.5	43.5	21	22
Drittes Quartil	26	56.75	29.5	40
Maximalwert	49	110	46	67
Q1-Minimum	5	27	4.75	5.25
Erstes Quartil	5	27	4.75	5.25
Median-Q1	9.5	16.5	16.25	16.75
Q3-Median	11.5	13.25	8.5	18
Maximum-Q3	23	53.25	16.5	27

Grafik 2: Darstellung der Menge der sichtbar gemachten immunreaktiven Strukturen in Abhängigkeit von Nachweisverfahren und verwendeten Antikörper



Die vier erhobenen gepaarten Stichproben wurden auf Gleichheit des Lageparameters überprüft. Da die Stichproben nicht normalverteilt sind wurde der Friedman-Test verwendet. Der mit diesem Test gemessene *p*-Wert betrug 0,000005. Die Stichproben sind also statistisch signifikant unterschiedlich. Danach wurde der Willcoxon-Test durchgeführt, um die Stichproben für statistisch signifikante Unterschiede paarweise zu testen. Die mit dem Willcoxon-Test erhobene *p*-Werte sind in der Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Willcoxon-Test Ergebnisse

Getestete Stichproben (Vergleich der Menge der der α-Synuklein-Pathologie zwischen den Nachweisverfahren):	p-Wert
PET-Blot 10D2 und Immunhistochemie 10D2 mit PK	0,002
PET-Blot pSer129 und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,061
PET- Blot 10D2 und PET-Blot pSer129	0,006
Immunhistochemie 10D2 mit PK und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,581
PET-Blot 10D2 und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,002
PET-Blot pSer129 und Immunhistochemie 10D2 mit PK	0.083

Daraus lässt sich folgende schließen:

- 1) In der PET-Blot Färbung mit dem Antikörper 10D2 lassen sich statistisch signifikant mehr Lewy Neuriten und immunreaktive Nerven sichtbar machen als in der konventionellen Immunhistochemie mit demselben Antikörper und PK-Vorbehandlung.
- 2) Die PET-Blot Färbung detektiert statistisch signifikant mehr immunreaktiven Strukturen mit dem Antikörper 10D2 als mit dem Antikörper für phosphoreliertes α -Synuklein pSer129.
- 3) Mit der immunhistochemischen Färbung mit dem Antikörper 10D2 lassen sich etwa genauso viel immunreaktive Strukturen darstellen wie mit der immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper für phosphoryliertes α -Synuklein pSer129.

- 4) In der PET-Blot Färbung mit dem 10D2 Antikörper lassen sich statistisch signifikant mehr α -Synukleinaggregate darstellen als in der konventionellen Immunhistochemie mit Proteinkinase K mit dem pSer129 Antikörper.

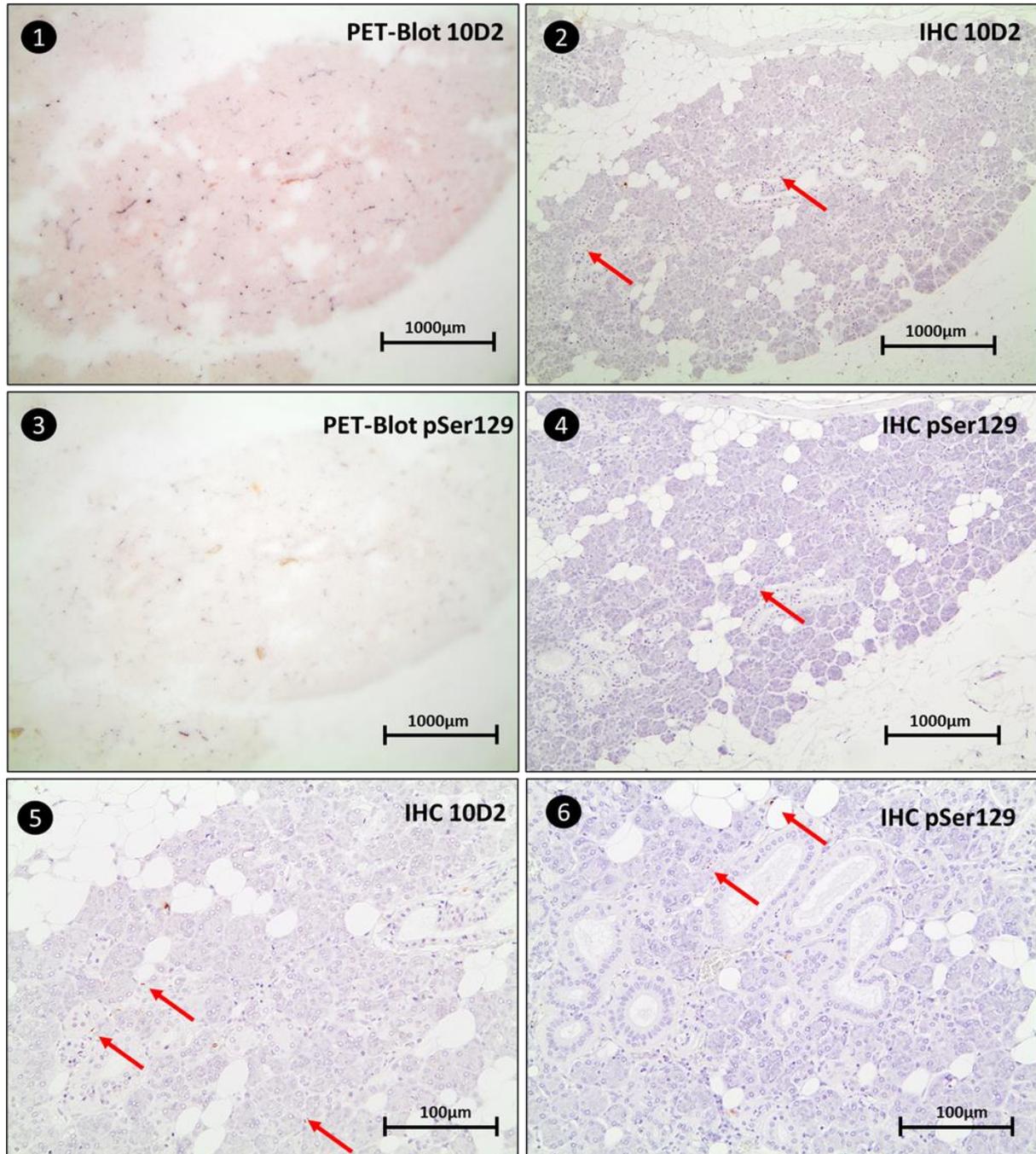


Abbildung 9: Illustration der sichtbar gemachten immunreaktiven Strukturen in Abhängigkeit von Nachweisverfahren und verwendeten Antikörper. Bilder 1-4 100x Gesamtvergrößerung. Bilder 5 und 6 200x Gesamtvergrößerung. IHC = Immunhistochemie

Außerdem wurde eine Korrelationsanalyse zwischen Erkrankungsdauer der Patienten und den Scores durchgeführt.

Tabelle 14: Korrelation des Scores der Anzahl von in 10 Gesichtsfeldern identifizierten immunreaktiven Strukturen zur Erkrankungsdauer

Fall-num.	Erkrank. Dauer	IH 10D2 PK	PET Blot 10D2	IH pS129 PK	PET Blot pS129
PD 1	24	28	75	30	40
PD 2	22	45	108	46	67
PD 3	21	16	52	30	12
PD 4	15	49	110	33	27
PD 5	12	3	23	2	3
PD 6	11	11	38	10	18
DLB 1	10	13	42	28	46
PD 7	10	30	45	22	40
PD 8	10	0	0	0	0
DLB 2	9	18	53	23	26
PD 9	8	13	26	20	45
DLB 3	5	20	58	16	18
PD 10	5	0	0	0	0
PD 11	1	2	30	3	3
	R_s	0.502	0.501	0.637	0.357
	Bestimmtheitsmaß R^2	0.252	0.251	0.405	0.127
	p-Wert	0.068	0.068	0.014	0.210

Der niedrige Korrelationskoeffizient nach Spearman und Bestimmtheitsmaß (R^2) sowohl mit Immunhistochemie als auch mit PET-Blot Färbung erhobenem Befund deuten darauf hin, dass kein Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer und der detektierten α -Synuklein-Pathologie im Drüsengewebe besteht.

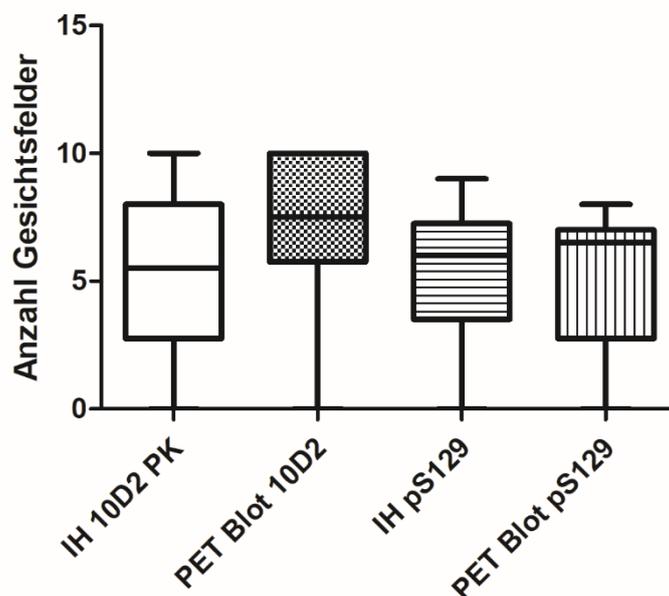
3.5. Mindestfläche der Speicheldrüsenbiopsie

Die Größe der Biopsie ist ein entscheidender Parameter. Um eine für die Diagnosestellung ausreichende Mindestgröße bzw. Mindestfläche einer Biopsie einzuschätzen, wurde die Auswertung mittels 10 beliebiger Gesichtsfelder bei 200x Vergrößerung, der mit PET-Blot und Immunhistochemie angefärbten Präparate der Untersuchungsgruppe unternommen (ausführlich erläutert in Auswertung mittels Durchlichtmikroskops (3.3.6.3) und Auswertung mittels Auflichtmikroskops (3.3.7.4)). Genauer gesagt wurde mit dieser Auswertungsmethode die Mindestfläche des mit Biopsie gewonnenen, histologisch angefertigten Gewebsschnittes, das mikroskopisch ausgewertet werden muss, um sicher eine Diagnose stellen zu können, eingeschätzt. Zunächst wurde aufgezählt, in wie vielen der 10 Gesichtsfelder eine sicher zur Diagnose führende Pathologie zu erkennen war. Als sicher zur Diagnose führende Pathologie wurde ein Vorhandensein von mindestens einem sicher zu identifizierenden immunreaktiven Nerven und/oder immunreaktiven Fasern festgelegt. Da bei der PET-Blot Färbung die Gefahr besteht, senkrecht angeschnittene Lewy-Neuriten mit den Formalinpräzipitaten zu verwechseln, wurden nur tangential angeschnittene, sicher als Lewy-Neuriten zu identifizierenden Strukturen berücksichtigt. Der oben beschriebene Schritt wurde drei Mal an drei verschiedenen Tagen durchgeführt. Von den erhobenen Werten wurde jeweils der abgerundete Mittelwert bestimmt, sodass sich die in Tabelle 15 aufgeführten Ergebnisse ergaben.

Tabelle 15: Anzahl der Gesichtsfelder bei 200x Vergrößerung, die eine sichere Diagnose der α -Synuklein Pathologie in der autoptischen glandula submandibularis von PD/DLB-Patienten ermöglichten. Bzw. Anzahl der positiven Gesichtsfelder für jeweilige Methode

Fall	IH 10D2 PK	PET Blot 10D2	IH pS129	PET Blot pS129
PD 1	7	10	7	7
PD 2	10	10	9	7
PD 3	6	8	7	4
PD 4	9	10	9	8
PD 5	2	6	2	2
PD 6	5	6	5	4
PD 7	0	0	0	0
PD 8	8	8	7	7
PD 9	4	5	5	7
PD 10	0	0	0	0
PD 11	3	6	4	3
DLB 1	4	7	7	6
DLB 2	6	10	5	7
DLB 3	8	8	8	7

Grafik 3: Grafische Darstellung der in Tabelle 15 aufgeführten Daten.



Anschließend wurde ausgerechnet, wie viele Gesichtsfelder benötigt werden, um auf eine sicher zur Diagnose führende Pathologie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% zu treffen. Da in zwei Fällen gar keine Immunreaktivität festzustellen war bzw. die Anzahl der positiven Gesichtsfelder 0 war, konnte für die diese Anzahl benötigter Gesichtsfelder nicht berechnet werden.

Tabelle 16: Anzahl benötigten Gesichtsfeldern für jeweilige Methode, um auf eine sicher zur Diagnose führende Pathologie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% zu treffen

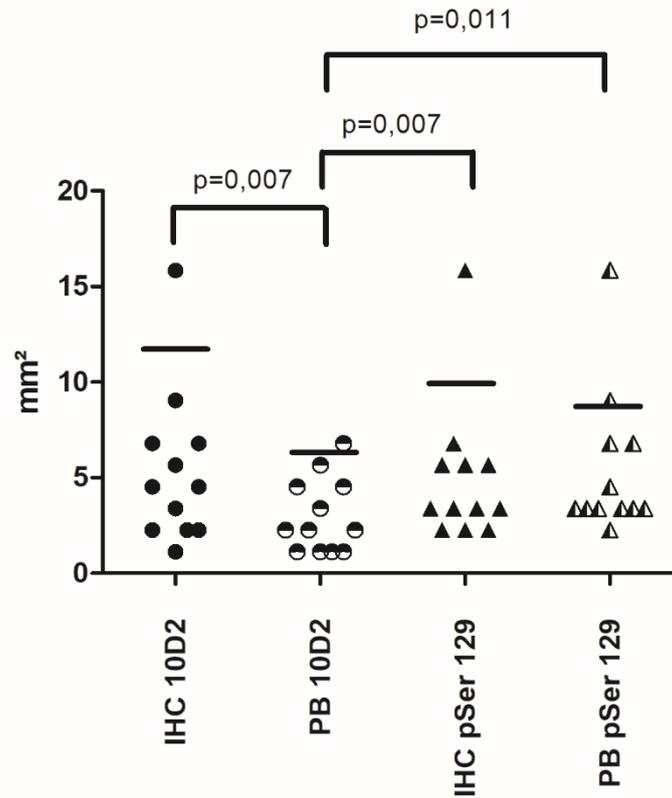
Fall	IH 10D2	PET B 10D2	IH pS129	PET B pS129
PD 1	3	1	3	3
PD 2	1	1	2	3
PD 3	4	2	3	6
PD 4	2	1	2	2
PD 5	14	6	14	14
PD 6	5	4	5	6
PD 8	2	2	3	3
PD 9	6	5	5	3
PD 11	8	4	6	8
DLB 1	6	3	3	4
DLB 2	4	1	5	3
DLB 3	2	2	2	3

Die Fläche eines Gesichtfeldes in dem Durchlichtmikroskop mit 200x Gesamtvergrößerung war mit der in dem Auflichtmikroskop gleich und betrug 1,131mm². Anhand der Fläche eines Gesichtfeldes und der Anzahl der Gesichtfelder, die benötigt werden, um auf eine sicher zur Diagnose führende Pathologie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% zu treffen, wurde für die jeweilige Methode die Mindestfläche des Unterkieferspeicheldrüsengewebes bestimmt, die in einer Biopsie notwendigerweise entnommen werden müsste, um auf eine mit Sicherheit zur Diagnose führenden Pathologie zu treffen. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

Tabelle 17: Mindestfläche einer Biopsie in mm²

Fall	IH 10D2 PK	PET Blot 10D2	IH pS129 PK	PET Blot pS129
PD 1	3.393	1.131	3.393	3.393
PD 2	1.131	1.131	2.262	3.393
PD 3	4.524	2.262	3.393	6.786
PD 4	2.262	1.131	2.262	2.262
PD 5	15.834	6.786	15.834	15.834
PD 6	5.655	4.524	5.655	6.786
PD 8	2.262	2.262	3.393	3.393
PD 9	6.786	5.655	5.655	3.393
PD 11	9.048	4.524	6.786	9.048
DLB 1	6.786	3.393	3.393	4.524
DLB 2	4.524	1.131	5.655	3.393
DLB 3	2.262	2.262	2.262	3.393

Grafik 4: Mindestfläche einer Biopsie, die für die Diagnose ausreichend ist



Die vier erhobenen gepaarten Stichproben wurden auf Gleichheit des Lageparameters überprüft. Da die Stichproben nicht normalverteilt sind, wurde der Friedman-Test verwendet. Der mit diesem Test gemessene *p*-Wert betrug 0,001. Also unterscheiden sich die Stichproben voneinander statistisch signifikant. Danach wurde für die paarweise Testung der Stichproben für statistisch signifikante Unterschiede der Willcoxon-Test durchgeführt. Die mit dem Willcoxon-Test erhobenen *p*-Werte sind in der Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Willcoxon-Test Ergebnisse

Getestete Stichproben	p-Wert
PET-Blot 10D2 und Immunhistochemie 10D2 mit PK	0,007
PET-Blot pSer129 und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,393
PET- Blot 10D2 und PET-Blot pSer129	0,007
Immunhistochemie 10D2 mit PK und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,719
PET-Blot 10D2 und Immunhistochemie pSer129 mit PK	0,011
PET-Blot pSer129 und Immunhistochemie 10D2 mit PK	0,473

Aus der Grafik 4 und der Tabelle 18 erschließt sich folgendes:

- 1) Die Werte der Biopsie-Mindestfläche für PET-Blot Färbungen mit dem Antikörper 10D2 sind statistisch signifikant kleiner, als die für immunhistochemische Färbungen sowohl mit dem gleichen Antikörper als auch mit dem pSer129 Antikörper und die für PET-Blot Färbungen mit dem pSer129 Antikörper.
- 2) Die Werte der Biopsie-Mindestfläche für PET-Blot Färbungen mit dem Antikörper pSer129 sind tendenziell größer, als die für immunhistochemische Färbungen mit dem gleichen Antikörper, aber nicht statistisch signifikant.
- 3) Zwischen den Stichproben für die immunhistochemischen Färbungen mit den beiden Antikörpern ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Um aus den erhobenen Daten eine Schlussfolgerung bezogen auf die für die sichere Diagnostik benötigte Mindestfläche einer Biopsie zu machen, wurde für jede Stichprobe ein Konfidenzintervall mit dem Konfidenzniveau 95% bestimmt. Die obere Grenze des einseitigen 95% Konfidenzintervall wird als die Mindestfläche des Unterkieferspeicheldrüsengewebes vorgeschlagen, die notwendigerweise ausgewertet werden müsste, um eine sichere Diagnose zu stellen. Die eingeschätzten Werte der Mindestfläche einer Biopsie für jede Nachweismethode sind in der Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Mindestfläche einer Biopsie: Obere Grenze des einseitigen 95% Konfidenzintervall bei unbekannter Varianz

	IH 10D2 PK	PET-Blot 10D2	IH pSer129	PET-Blot pSer129
Eingeschätzte Mindestfläche (mm ²)	11,87	6,63	10,81	9,60

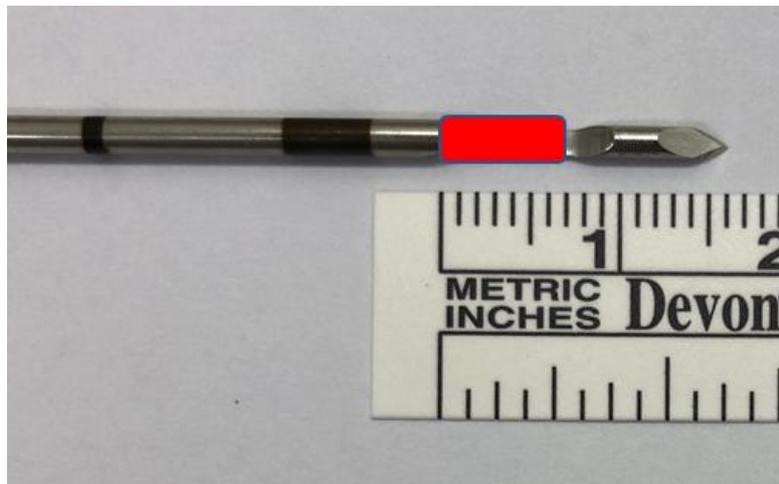


Abbildung 10: Visuelle Repräsentation der eingeschätzten Biopsie Mindestfläche für Aggregatdetektion mittels PET-Blot mit dem Antikörper 10D2.

Um zu verdeutlichen, dass die α -Synukleinaggregate mit den entsprechenden Methoden nicht ausschließlich in den Nerven detektierbar sind, wurde ermittelt, in wie vielen der ausgewerteten Gesichtsfelder nur immunreaktiven Nerven vorkamen bzw. wie viele Gesichtsfelder nur anhand des Vorhandenseins immunreaktiven Nerven als positiv bewertet wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zu sehen. Zwei Fälle aus der Untersuchungsgruppe, die keine Immunreaktivität aufwiesen, wurden nicht in der Tabelle 20 aufgeführt um den Mittelwert nicht zu verschieben.

Aus der Tabelle 20 wird klar, dass unabhängig von der Nachweismethode nur einige Gesichtsfelder ausschließlich immunreaktive Nerven enthielten. Jedoch wurden in den 10D2-gefärbten

PET-Blot-Präparaten solche Gesichtsfelder am wenigsten identifiziert. Dies spricht dafür, dass α -Synukleinaggregate nicht auf größere Nerven beschränkt sind und in den kleinen Neuronen des Drüsenparenchyms in einer signifikanten Menge nachweisbar sind.

Tabelle 20: Nur wegen Vorhandensein immunreaktiven Nerven als positiv bewertete Gesichtsfelder

Fall	IH 10D2 PK	IH pS129	PET Blot 10D2	PET Blot pS129
PD 1	2	1	0	1
PD 2	1	0	1	1
PD 3	1	0	0	1
PD 4	1	2	0	1
PD 5	1	1	0	0
PD 6	0	1	1	1
PD 8	1	1	0	0
PD 9	1	0	0	0
PD 11	2	2	2	2
DLB 1	2	2	0	1
DLB 2	0	1	1	1
DLB 3	0	0	1	0
Summe	13	11	6	9

4. Diskussion

Zurzeit ist bei Patienten mit klinischem Verdacht auf die Parkinson-Krankheit oder Lewy-Körperchen-Demenz eine neuropathologische Bestätigung für die definitive Diagnose erforderlich. Dabei handelt es sich um einen histopathologischen Nachweis von α -Synukleinaggregaten im autoptischen Hirngewebe (GELB et al., 1999). Dies bedeutet, dass eine definitive Diagnose erst *post mortem* gestellt werden kann. Bei α -Synukleinaggregations-Krankheiten kommen α -Synukleinaggregate neben dem zentralen Nervensystem auch im peripheren vegetativen Nervensystems vor (KLINGELHOEFER, REICHMANN, 2015). Dazu zählen beispielsweise die vasoaktiven intestinalen Polypeptid (VIP)-Neuronen des Auerbach'schen Plexus (WAKABAYASHI et al., 1990). Dies kann für die Diagnostik von noch lebenden Patienten von großer Bedeutung sein, da Nerven des peripheren vegetativen Nervensystems prinzipiell für

eine zur sicheren Diagnose führende neuropathologische Untersuchung des Patienten durch eine Organbiopsie gewonnen werden können. Dabei kristallisieren sich zwei wesentliche Fragen heraus: Welches Organ ist für eine solche Biopsie geeignet und welche Methode soll für den neuropathologischen Nachweis von α -Synukleinaggregaten benutzt werden?

α -Synuklein-Ablagerungen wurden seit der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts im peripheren autonomen Nervensystem von Parkinson-Patienten beschrieben (WAKABAYASHI et al., 1988). Dies hat die Suche nach peripheren Geweben angeregt, in denen die α -Synuklein-Pathologie als Biomarker für die Krankheiten dienen könnte. Leicht zugängliche Stellen wie die Haut, der Magen-Darm-Trakt und seit kurzem auch die Glandula submandibularis kommen in Betracht. Da Parkinson-Patienten gastrointestinale Symptome aufweisen und sich eine große Allgemeinbevölkerung der Darmkrebs-Vorsorgeuntersuchung unterzieht, wurde den Kolonbiopsien zur Diagnose von PD viel Aufmerksamkeit gewidmet. Die meisten Studien wurden mit dem immunhistochemischen Nachweis von posttranslational an Serin 129 phosphoryliertem α -Synuklein durchgeführt, ohne nicht aggregiertes α -Synuklein enzymatisch zu verdauen. Die Ergebnisse der durchgeführten Studien waren sehr unterschiedlich. Je nach Studie zeigten 12% bis 70% der der Untersuchungsgruppe zugehörigen Probanden eine positive immunhistochemische Färbung von phosphoryliertem α -Synuklein. (LEBOUVIER et al., 2010; HILTON et al., 2014). Darüber hinaus berichteten einige Studien über den Nachweis von phosphoryliertem α -Synuklein im Darm-Nervensystem von normalen älteren Menschen (BOTTNER et al., 2012; STOKHOLM et al., 2016). Die Untersuchungen der Hautbiopsien lieferten ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse. Auch hier wurde die Mehrzahl der Studien mit dem Antikörper pSer129 ohne Verdauung des nicht aggregierten α -Synukleins durchgeführt. Die Ergebnisse variierten. Während Autoren von Studien zu Hautbiopsien aus oberen Gliedmaßen eine positive Färbung bei 100% der Probanden feststellten (ZANGE et al., 2015), zeigten die Ergebnisse der Brust- und Beinbiopsien ein anderes Bild: nur zwei aus 38 PD-Patienten wiesen eine positive Immunreaktion auf (HAGA et al., 2015). Des Weiteren berichteten andere Studien über kein immunhistochemisch detektierbares phosphoryliertes α -Synuklein in der Haut von postmortalen PD-Patienten (BEACH et al., 2010; GELPI et al., 2014). Bei der Beurteilung der Haut am Rücken, des distalen und proximalen Beins berichteten Doppler et al. über den immunhistochemischen Nachweis von phosphoryliertem α -Synuklein bei 16 von 31 PD-Patienten (DOPPLER et al., 2014). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Hautbiopsie-Studien könnte der Verlust von autonomen Nerven in der Haut einiger PD-Erkrankten sein (LEE et al., 2017). Aus der Datenlage wird klar, dass Colon und Haut, obwohl gut zugänglich für eine Biopsie, keine geeigneten Stellen für iPD Diagnostik mittels Biopsieentnahme zum α -Synukleinaggregatnachweis sind.

Im Vergleich zu Haut- und Dickdarmgewebe zeigten autoptische Gl. submandibularis-studien einheitliche Ergebnisse mit einer höheren Prävalenz von phosphorylierten α -Synuklein-Ablagerungen (siehe Tabelle 21). Dies hat uns dazu bewogen, die Unterkieferspeicheldrüse als Biopsiestelle für den Nachweis von α -Synukleinaggregaten für die Parkinson Diagnostik zu untersuchen.

Von 27 Patienten, die in der vorliegenden Studie analysiert wurden, erhielten fünf Patienten eine falsche klinische Diagnose. In einem Fall war die initiale Diagnose falsch und erst nach drei Jahren erfolgloser Therapie wurde die richtige Diagnose gestellt. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die klinische Diagnosestellung von iPD und DLB derzeit u.U. fehlerbehaftet und die Abgrenzung von iPD und dem sekundären Parkinson Syndrom im Rahmen einer anderen Krankheit komplex ist.

Tabelle 21: Autopsie Studien, die das Vorkommen von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse untersucht haben

Studie	Untersuchungsgr.	Kontrollgr.	Färbung Methode	Positive Färbung	
				UG	KG
Del Tredici 2010	PD (9) ILBD (3) MSA (2)	N.E (19)	IHC mit monoklonalem Maus-Antikörper anti-syn-1; (Klon 42, BD Biosciences) Vorbehandlung: 100% Ameisensäure für 3min	PD 9/9 ILBD 2/3 MSA 0/2	0/19
Beach 2013	PD (28) ILBD (5)	MSA (2) PSP (5) CBD (3) ADLB (22) AD (16) N.E (50)	IHC mit anti α -Syn phosphoryliert an Serin 129 Antikörper Vorbehandlung: Proteinase K* für 20 min	PD 28/28 ILBD 5/5 Gefrorenes Gewebe PD 17/28	PSP 3/5 ADLB 3/22 AD ohne LB 0/16 CBD 0/3 MSA 0/2 N.E 0/50
Beach 2016	PD (46) DLB (28) ILBD (9) ADLB (33)	MSA (2) CBD (2) PSP (12) AD (15) N.E. (79)	IHC mit anti α -Syn phosphoryliert an Serin 129 Antikörper Vorbehandlung: 1:100 Proteinase K bei 37° C für 20 Minuten	PD 42/47 DLB 20/28 ILBD 1/9 ADLB 4/33 Total 91%	MSA 0/2 CBD 0/2 PSP 0/12 AD 0/15 N.E. 0/79

Darstellung: UG = Untersuchungsgruppe; KG = Kontrollgruppe; N.E = normale Erwachsene; MSA = Multisystematrophie; ILBD = incidental Lewy Body Disease; AD = Alzheimer-Demenz; ADLB = Alzheimer's Disease with Lewy Bodies (Alzheimer Demenz mit Lewy Körperchen); PSP = Progressive Supranuclear Palsy (Progressive supranukleäre Blickparese);

4.2. Die Unterkieferspeicheldrüse als geeignetes Organ für eine Biopsie mit neuronalem Gewebe

Die Unterkieferspeicheldrüse ist relativ oberflächlich gelegen, da sie hautwärts nur vom Platysma und Fascia cervicalis superficialis überdeckt wird. Sie ist einfach zu lokalisieren und für eine Nadelbiopsie gut zugänglich. Eine Stanzbiopsie der Unterkieferspeicheldrüse ist ein vergleichsweise simples Verfahren mit geringen Komplikationsraten, welches unter örtlicher Betäubung durchgeführt werden kann. Entsprechend kann die Biopsie der Unterkieferspeicheldrüse ohne größere Schwierigkeiten als routinemäßige Diagnostikmaßnahme einer neurologischen Abteilung eingeführt werden. Eine Unterkieferspeicheldrüsenbiopsie zur iPD- oder DLB-Diagnostik muss neuronales Gewebe enthalten. Die durchgeführten Färbungen mit dem Neurofilament-Antikörper verdeutlichten, dass das Drüsenparenchym reichlich mit Nerven und einzelnen Nervenzellfortsätzen durchwirkt ist. Im Gegensatz zum Colon sind die Nervenfasern in der Glandula submandibularis nicht hauptsächlich in Plexus (wie beispielsweise in Plexus submucosus in Colon) gesammelt, sondern gleichmäßig im gesamten Organ verteilt. Dies lässt annehmen, dass in Rahmen der Unterkieferspeicheldrüsenbiopsie neuronale Strukturen getroffen und entnommen werden. Damit ist die Unterkieferspeicheldrüse ein geeignetes Organ für eine Biopsie von Strukturen des peripheren vegetativen Nervensystems.

4.3. Methode der Wahl

Zum Nachweis von α -Synukleinaggregaten stehen einige Methoden zur Verfügung. Von besonderem Interesse war die PET-Blot Methode, da es bis dato keine anderen Studien gibt, die den Nachweis von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse mittels PET-Blot Färbung untersucht haben. Obwohl die PET-Blot Färbung in der Prion-Krankheit-Forschung zum Nachweis von pathologischen Prioproteinaggregaten entwickelt wurde, wird sie zurzeit zur neuropathologischen Diagnosestellung anderer neurodegenerativer Erkrankungen, bei welchen die Proteinaggregation der zugrunde liegende Pathomechanismus ist, routinemäßig verwendet. In durchgeführten Studien mit Hirngewebe von Patienten mit Prionkrankheiten wurde gezeigt, dass der PET-Blot die sensitivste topographische Nachweismethode für Proteinaggregate ist (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000). In dieser Arbeit wurden konventionelle Immunhistochemie sowie PET-Blot verwendet und miteinander verglichen.

Aus den Ergebnissen in Kapitel 3.4. „Detektion der α -Synukleinaggregate“ entstehen zwei wesentliche Schlussfolgerungen: Erstens ermöglicht es die PET-Blot Färbung mehr Aggregate zu detektieren als es die konventionelle Immunhistochemie erlaubt. Dies kann z.B. dadurch

erklärt werden, dass an den bei der konventionellen Immunhistochemie verwendeten Glasobjektträgern die Aggregate deutlich schwächer gebunden werden als an die Nitrozellulosemembran, sodass mehrere, vor allem kleinere Aggregate, verdaut oder weggespült werden. Darüber hinaus ermöglicht der PET-Blot eine deutlich bessere Epitopfreilegung durch eine höhere Proteinase-K Konzentration als bei der Immunhistochemie und eine längere Vorverdauungszeit. Eine höhere Proteinase-K Konzentration und eine längere Verdauung lösen bei immunhistochemischen Färbungen auf Glasobjektträgern den Schnitt ab und sind deswegen nicht möglich. Die Nachteile der PET-Blot-Färbung im Vergleich zur konventionellen Immunhistochemie sind eine schlechtere anatomische Auflösung und das Auftreten von Artefakten (Formalin-Präzipitaten), die manchmal mit der Immunreaktion verwechselt werden können.

Zweitens können offensichtlich nicht alle α -Synukleinaggregate mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein detektiert werden. Dies stimmt überein mit in der Literatur zu findenden Ergebnissen der PET-Blot Färbungen von Gehirnpräparaten bei Patienten, welche an Parkinson oder der Lewy-Körperchen-Demenz erkrankt waren. Mithilfe der PET-Blot-Methode wurde eine signifikante Menge kleinerer α -Synukleinaggregate im gesamten Cortex entdeckt. Diese waren in der Immunhistochemie nicht sichtbar gewesen. Die kleinen Aggregate waren präsynaptisch lokalisiert und es wurde hypothetisiert, dass eine dadurch entstandene synaptische Dysfunktion für die Erkrankungserscheinungen verantwortlich ist. Nur eine begrenzte Anzahl synaptischer α -Synukleinaggregate wies Immunreaktivität in Färbungen mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein auf, wohingegen alle Lewy-Körper mit beiden Antikörpern markiert werden konnten. Basierend auf diesen Ergebnissen ließ sich die Hypothese aufstellen, dass nicht alle α -Synukleinaggregate die phosphorylierte Form des Proteins enthalten (SCHULZ-SCHAEFFER, 2010, 2015). Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass aufgrund der spezifischen Struktur in einigen Aggregaten die Epitope für den Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein nicht zugänglich sind und diese Aggregate bei Immunreaktionen mit diesem Antikörper unmarkiert bleiben. Unabhängig von der zugrundeliegenden Ursache sollten mittels PET-Blot mit einem Antikörper gegen posttranslational unveränderte (z.B. 10D2) statt posttranslational modifizierte α -Synukleinaggregate als spezifische Pathologie bei iPD oder DLB definiert werden. Dies macht die PET-Blot Färbung mit dem Antikörper 10D2 zur Methode der Wahl für den Nachweis von α -Synukleinaggregaten.

Bei den Scores von immunchemisch gefärbten Schnitten mit dem Antikörper 10D2 verglichen mit gefärbten Schnitten mit dem Antikörper pSer129 ergaben sich keine statistisch relevanten Unterschiede, was hauptsächlich auf eine unzureichende Epitopfreilegung bei der konventionellen Immunhistochemie zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die PET-Blot Färbung in der Lage ist, deutlich mehr Proteinaggregate zu visualisieren als die konventionelle Immunhistochemie. Nicht alle α -Synukleinaggregate lassen sich mit dem Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein nachweisen. Daher soll für die neuropathologische Diagnosestellung ein Antikörper gegen α -Synuklein benutzt werden, der alle α -Synukleinaggregate erkennt und der keine Kreuzreaktivität gegen Drüsenstrukturen erzeugt.

4.4. Prävalenz und Korrelation zur Erkrankungsdauer

Bei 12 Patienten der aus 14 Patienten bestehenden Untersuchungsgruppe wurden α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse sowohl mit der PET-Blot Färbung als auch mit der konventionellen Immunhistochemie nachgewiesen. Diese 12 Patienten gliederten sich wie folgt auf: 3 Patienten mit der neuropathologisch gesicherten Diagnose DLB sowie 9 Patienten mit neuropathologisch diagnostiziertem idiopathischem Parkinson. Somit wurden bei etwa 86% der Patienten der Untersuchungsgruppe die α -Synukleinaggregate festgestellt. Aufgrund der Größe der Untersuchungsgruppe ist es nicht möglich, eine gesicherte Aussage über die Prävalenz der α -Synuklein-Ablagerungen in der Unterkieferspeicheldrüse bei Patienten mit iPD oder DLB zu machen. Dennoch ist aus weiteren Studien mit einer höheren Anzahl von Patienten zu entnehmen, dass der Anteil von Patienten mit erkannten α -Synukleinaggregaten bei etwa 90% für iPD und 70% für DLB liegt (BEACH et al., 2013; BEACH et al., 2016). Es ist wichtig zu erwähnen, dass die genannten Studien von Beach mit konventioneller Immunhistochemie mit Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein pSer129 durchgeführt wurden. Demnach könnte die angegebene Prävalenz von dem realen Wert abweichen. Eine sichere Aussage über die Prävalenz der α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse erfordert eine Studie mit einer großen Anzahl von Patienten und die Verwendung der PET-Blot Färbung mit dem Antikörper 10D2 zur Detektion der meisten Aggregate. In zwei Fällen der Untersuchungsgruppe ließen sich weder mit konventioneller Immunhistochemie noch mit der PET-Blot Färbung α -Synukleinaggregate darstellen. Dabei handelt es sich um zwei Patienten mit pathologisch gesicherter Parkinson-Krankheit. Die beiden Patienten hatten einen früheren Erkrankungsbeginn, einen schnelleren progredienten Verlauf und sind in einem jüngeren Alter verstorben, als die restlichen Patienten der Untersuchungsgruppe. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der Krankheit dieser Patienten um eine durch Genmutation verursachte Parkinsonerkrankung handeln könnte. Über ein ähnliches Ergebnis berichtet Beach in seiner Studie. Er gibt an, dass die Patienten, bei denen die Unterkieferspeicheldrüsen frei von pathologischem α -Synuklein waren, eine kürzere Erkrankungsdauer hatten, macht allerdings keine Angaben zu dem Erkrankungsbeginn oder dem Alter dieser einzelnen Patienten (BEACH et al., 2016). Die Ausprägung der Genmutation könnte sich auf ZNS-Neurone begrenzen – dadurch

könnte sich der fehlende Nachweis von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse erklären. In einer weiteren Studie wird berichtet, dass das Vorkommen von α -Synukleinaggregaten im ENS bei Patienten mit PD von SNCA-Genvarianten abhängig sein kann. Die Autoren zeigten beispielsweise, dass die längeren SNCA-REP1-Allele nicht mit einer positiven α -Synuklein-Immunfärbung in der ENS assoziiert waren (CHUNG et al., 2018).

Bei keinem Patienten der Kontrollgruppe ließen sich α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse nachweisen. Dies stimmt ebenfalls überein mit den Ergebnissen größerer Studien, die gezeigt haben, dass Patienten ohne Parkinson-Krankheit oder Lewy-Körperchen Demenz keine α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse aufweisen (BEACH et al., 2013; BEACH et al., 2016). Das Durchschnittsalter der Patienten in der Kontrollgruppe und der Untersuchungsgruppe war ungefähr gleich. Die Kontrollgruppe umfasste Patienten mit klinisch schwer von iPD unterscheidbaren Diagnosen wie PSP, FTD, MSA oder CBD. Die Abwesenheit von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse bei Patienten mit diesen Erkrankungen spricht dafür, dass die Biopsie der Unterkieferspeicheldrüse nicht nur bei der Diagnose der Parkinson-Krankheit oder der DLB eine große Rolle spielt, sondern auch für andere, sich klinisch ähnlich zur iPD präsentierenden neurodegenerativen Krankheiten relevant sein könnte. Von einer besonderen Bedeutung war der Patient der Kontrollgruppe mit der neuropathologisch gesicherten Diagnose MSA, da MSA auch zu den Synuklein-Aggregationskrankheiten gehört. Bei diesem Patienten wurden wie bei allen anderen Patienten der Kontrollgruppe keine α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse festgestellt. Andere Autoren beschreiben ebenfalls die Abwesenheit von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse bei MSA Patienten (BEACH et al., 2016). In den wenigen Studien, in welchen das Vorkommen von α -Synukleinaggregaten in Darm-ENS bei MSA Patienten beschrieben wurde, wurde konventionelle Immunhistochemische Untersuchungen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes α -Synuklein ohne Proteinase K-Vorbehandlung verwendet (POUCLET et al., 2012; CHUNG et al., 2016). Bei fehlendem Proteinase-K Vorverdau handelt es sich bei der beschriebenen Immunreaktivität nicht sicher um α -Synukleinaggregate. Dies macht die Ergebnisse dieser Studien angreifbar.

Es wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Ausprägung des Befalls der Unterkieferspeicheldrüse mit α -Synukleinaggregaten (als Score quantifiziert) und der Erkrankungsdauer erstellt. Aus der Überlegung heraus, dass α -Synukleinaggregate durch retrograden axonalen Transport aus dem ZNS in die Drüse einwandern könnten (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; MAHLKNECHT et al., 2015; BRUNDIN, MELKI, 2017), wurde eine Korrelationsanalyse zwischen der Erkrankungsdauer und der Intensität der α -Synukleinpathologie in der Glandula submandibularis durchgeführt. Bei beiden Analysen ergab sich unabhängig von der Nachweismethode keine Korrelation. Beach zeigte in seiner Studie ebenfalls keine Korrelation zwischen

Erkrankungsdauer und Ablagerungsdichte (BEACH et al., 2016). Eine fehlende Korrelation lässt mehrere Fragen offen, aber spricht dafür, dass eine Biopsie zu Diagnosezwecken theoretisch auch im Frühstadium der Erkrankung durchgeführt werden könnte. Dabei ist es wichtig zu erwähnen, dass die Erkrankungsdauer ab dem Zeitpunkt der Erstmedikation berechnet wird. Der Zeitpunkt der Erstdiagnose ist einerseits abhängig von der Kompetenz des Arztes, aber auch andererseits davon wie früh der Patient symptomatisch wird und Hilfe aufsucht. Der tatsächliche Erkrankungsbeginn geht der Erstdiagnose i.d.R. Jahre voraus. Dies erschwert es, eine richtige bzw. reale Korrelationsanalyse durchzuführen.

4.5. Biopsie-Mindestfläche

In den bereits durchgeführten Studien zur PD/DLB Diagnostik mittels α -Synukleinaggregat-Nachweis in der Unterkieferspeicheldrüse wurde die Frage der Biopsiegröße nie gründlich untersucht, obwohl die Größe der Biopsie ein entscheidender Parameter für die Durchführbarkeit der Untersuchung ist. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die Mindestgröße der Biopsie von der Nachweismethode und dem verwendeten Antikörper abhängt. Die Mindestgröße der Biopsie, die für die PD- oder DLB-Diagnose durch den Nachweis von α -Synukleinaggregaten mit dem 10D2-PET-Blot erforderlich ist, ist etwa halb so groß wie die Größe des Gewebes, das für den Nachweis von phosphorylierten α -Synuklein-Ablagerungen entweder mit IHC- oder PET-Blot durch pSer129 Antikörper erforderlich ist. Dies stimmt überein mit den Score-ergebnissen, und beruht darauf, dass die PET-Blot Färbung mit dem 10D2 Antikörper in der Lage ist mehr α -Synukleinaggregate zu detektieren als die konventionelle Immunhistochemie und, dass möglicherweise nicht alle α -Synukleinaggregate die phosphorylierte Form vom α -Synuklein enthalten. Die ausgerechnete Mindestgewebsfläche für die Detektion der α -Synuklein-Pathologie mit der PET-Blot Färbung und dem 10D2 Antikörper beträgt 6,63 mm². Ein Gewebstück mit einer solchen Schnittfläche kann problemlos mit einer konventionellen Nadelbiopsie gewonnen werden. Dies spricht dafür, dass die Dichte der mit der PET-Blot Färbung detektierbaren α -Synukleinaggregate in der Unterkieferspeicheldrüse hoch genug ist, um dieses Organ als Biopsie-Zielort für die Diagnostik vom Morbus Parkinson oder der Lewy-Körperchen Demenz zu verwenden. Um die phosphorylierte α -Synuklein-Ablagerungen mittels Immunhistochemie mit dem pSer129 Antikörper zu detektieren ist hingegen eine Gewebs-Mindestfläche von etwa 11 mm² nötig. Durch diese Erkenntnisse können einige Unterschiede in den Ergebnissen von bereits durchgeführten Studien zur PD/DLB Diagnostik mittels α -Synuklein-Aggregatnachweis in den Unterkieferspeicheldrüsen erklärt werden. Zum Beispiel zeigten weniger iPD und DLB Fälle positive Färbung in Studien, die mit Biopsie-Gewebe durchgeführt wurden als die, in den Autopsie-Studien (siehe Tabelle 22). Da diese Studien ausschließlich mit pSer129-Immunhistochemie durchgeführt wurden, könnte

dies unter anderem dadurch erklärt werden, dass die Größe des mittels einer Nadelbiopsie gewonnenen Drüsengewebes weniger als 11 mm² war und dementsprechend für den IHC-Nachweis von phosphorylierten α -Synuklein-Ablagerungen nicht ausreichend war. In keiner dieser Studien waren Angaben zu der Größe des mit der Biopsie gewonnenen Gewebes zu finden. Der Nachweis von α -Synukleinaggregaten durch PET-Blot mit 10D2 kann die Sensitivität weiterer Biopsiestudien verbessern.

Die Färbungen mit Neurofilament-Antikörper haben gezeigt, dass einzelne, in einer HE-Färbung mikroskopisch nicht identifizierbare Neuriten, im Drüsenparenchym reichlich vorhanden waren. Größere mikroskopisch identifizierbare Nervenfaszikel kamen seltener vor, vor allem in den Gefäß-Nerven-Bündeln. Es war ebenso wichtig abzuklären, ob α -Synukleinaggregate in einer diagnostisch ausreichenden Menge in den kleinen Neuriten nachweisbar sind, da eine gezielte Entnahme von einem Gefäß-Nerven-Bündel mittels einer Biopsie im Alltag nahezu unmöglich wäre. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass α -Synukleinaggregate nicht auf größere Nerven beschränkt sind und in den kleinen Neuriten des Drüsengewebes der Gl. submandibularis in signifikanter Menge nachgewiesen werden können. Somit können auch Biopsien ausschließlich mit Drüsenparenchym ohne Nervenfaszikel für eine neuropathologische Diagnose von PD oder DLB verwendet werden.

Tabelle 22: Überblick über die Studien, die mit bioptisch gewonnenem Drüsengewebe durchgeführt wurden

Studie	Untersuchungsgr.	Kontrollgr.	Färbung Methode	Positive Färbung	
				UG	KG
Adler 2014	PD (9) ILBD (3) MSA (2)	N.E (19)	IHC mit monoklonalem Maus-Antikörper anti-syn-1; (Klon 42, BD Biosciences) Vorbehandlung: 100% Ameisensäure für 3min	PD 9/9 ILBD 2/3 MSA 0/2	0/19
Adler 2016	PD (19)	N.E (9)	IHC mit anti α -Syn phosphoryliert an Serin 129 Antikörper Vorbehandlung: Proteinase K*	PD 14/19 (74%)	2/9
Vilas 2016	PD (12) IRBD (9)	N.E. (26)	IHC mit anti α -Syn phosphoryliert an Serin 129 Antikörper Vorbehandlung: 98% Ameisensäure für 5min	PD 8/12 (67%) IRBD 8/9 (89%)	0/26

Darstellung: UG = Untersuchungsgruppe; KG = Kontrollgruppe; N.E = normale Erwachsene; MSA = Multisystematrophie; ILBD = incidental Lewy Body Disease; PSP = Progressive Supranuclear Palsy (Progressive supranukleäre Blickparese) IRBD = idiopathic Rapid-Eye-Movement Sleep Behavior Disorder (idiopatische REM-Schlaf-Verhaltensstörung)

4.6. Fazit

Die Unterkieferspeicheldrüse ist eine geeignete Biopsiestelle für den α -Synuklein-Aggregatnachweis bei der PD- und der DLB-Diagnostik. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass sich durch den immunhistochemischen Nachweis von phosphoryliertem α -Synuklein nicht alle

α -Synukleinaggregate erkennen lassen. Aus diesem Grund, und in Anbetracht der Pathophysiologie der Parkinson-Krankheit, scheint der Nachweis von α -Synukleinaggregaten anstelle von posttranslational phosphoryliertem α -Synuklein der besser geeignete Biomarker für die PD- und DLB-Diagnostik zu sein. Die sensitivste Färbungsmethode zum Nachweis von α -Synukleinaggregaten ist der PET-Blot mit einem Antikörper gegen unphosphoryliertes α -Synuklein (z.B. 10D2). Bei Verwendung dieser Färbung ist die mit einer Feinnadelbiopsie gelieferte Gewebemenge ausreichend für den Nachweis von α -Synukleinaggregaten bei PD- und DLB-Patienten. Darüber hinaus muss eine Biopsie nicht zwingenderweise einen mikroskopisch identifizierbaren Nerven enthalten, da auch eine nur Drüsenparenchym enthaltende Biopsie zum Nachweis von α -Synukleinaggregaten ausreichend ist. Diese vorliegende Studie ist somit eine wichtige Grundlage für Studien am lebenden Patienten, deren Ziel die Validierung der Unterkieferspeicheldrüsenbiopsie als ein zuverlässiges diagnostisches Instrument für die Diagnose von PD und DLB sein muss.

5. Literaturverzeichnis

1. Abbas N, Lucking CB, Ricard S, Durr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, Broussolle E, Brefel-Courbon C, Harhangi BS, Oostra BA, Fabrizio E, Bohme GA, Pradier L, Wood NW, Filla A, Meco G, Deneffe P, Agid Y, Brice A (1999) A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet* 8:567-574
2. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239-252
3. Adamczyk A, Kacprzak M, Kazmierczak A (2007) Alpha-synuclein decreases arachidonic acid incorporation into rat striatal synaptoneurosome. *Folia Neuropathol* 45:230-235
4. Anwar S, Peters O, Millership S, Ninkina N, Doig N, Connor-Robson N, Threlfell S, Kooner G, Deacon RM, Bannerman DM, Bolam JP, Chandra SS, Cragg SJ, Wade-

-
- Martins R, Buchman VL (2011) Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci* 31:7264-7274
5. Appel-Cresswell S, Vilarino-Guell C, Encarnacion M, Sherman H, Yu I, Shah B, Weir D, Thompson C, Szu-Tu C, Trinh J, Aasly JO, Rajput A, Rajput AH, Jon Stoessl A, Farrer MJ (2013) Alpha-synuclein p.H50Q, a novel pathogenic mutation for Parkinson's disease. *Mov Disord* 28:811-813
 6. Bartels T, Kim NC, Luth ES, Selkoe DJ (2014) N-alpha-acetylation of alpha-synuclein increases its helical folding propensity, GM1 binding specificity and resistance to aggregation. *PLoS One* 9:e103727
 7. Beach TG, Adler CH, Dugger BN, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, Shill HA, Sue LI, Sabbagh MN, Akiyama H, Arizona Parkinson's Disease C (2013) Submandibular gland biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:130-136
 8. Beach TG, Adler CH, Serrano G, Sue LI, Walker DG, Dugger BN, Shill HA, Driver-Dunckley E, Caviness JN, Intorcchia A, Filon J, Scott S, Garcia A, Hoffman B, Belden CM, Davis KJ, Sabbagh MN, Arizona Parkinson's Disease C (2016) Prevalence of Submandibular Gland Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies and other Lewy Body Disorders. *J Parkinsons Dis* 6:153-163
 9. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702
 10. Bendor JT, Logan TP, Edwards RH (2013) The function of alpha-synuclein. *Neuron* 79:1044-1066
 11. Berg D, Godau J, Seppi K, Behnke S, Liepelt-Scarfone I, Lerche S, Stockner H, Gaenslen A, Mahlkecht P, Huber H, Srulijes K, Klenk J, Fassbender K, Maetzler W, Poewe W (2013) The PRIPS study: screening battery for subjects at risk for Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 20:102-108
 12. Berg D, Postuma RB, Bloem B, Chan P, Dubois B, Gasser T, Goetz CG, Halliday GM, Hardy J, Lang AE, Litvan I, Marek K, Obeso J, Oertel W, Olanow CW, Poewe W, Stern M, Deuschl G (2014) Time to redefine PD? Introductory statement of the MDS Task Force on the definition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 29:454-462

-
13. Bergman H, Deuschl G (2002) Pathophysiology of Parkinson's disease: from clinical neurology to basic neuroscience and back. *Mov Disord* 17 Suppl 3:S28-40
 14. Bottner M, Zorenkov D, Hellwig I, Barrenschee M, Harde J, Fricke T, Deuschl G, Egberts JH, Becker T, Fritscher-Ravens A, Arlt A, Wedel T (2012) Expression pattern and localization of alpha-synuclein in the human enteric nervous system. *Neurobiol Dis* 48:474-480
 15. Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-278; discussion 278-284
 16. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211
 17. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-134
 18. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K (2007) Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 113:421-429
 19. Braun AR, Lacy MM, Ducas VC, Rhoades E, Sachs JN (2014) alpha-Synuclein-induced membrane remodeling is driven by binding affinity, partition depth, and interleaflet order asymmetry. *J Am Chem Soc* 136:9962-9972
 20. Brundin P, Melki R (2017) Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci* 37:9808-9818
 21. Burre J (2015) The Synaptic Function of alpha-Synuclein. *J Parkinsons Dis* 5:699-713
 22. Burre J, Sharma M, Sudhof TC (2014) alpha-Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:E4274-4283
 23. Burre J, Sharma M, Sudhof TC (2015) Definition of a molecular pathway mediating alpha-synuclein neurotoxicity. *J Neurosci* 35:5221-5232
 24. Burre J, Sharma M, Tsetsenis T, Buchman V, Etherton MR, Sudhof TC (2010) Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329:1663-1667

-
25. Burre J, Vivona S, Diao J, Sharma M, Brunger AT, Sudhof TC (2013) Properties of native brain alpha-synuclein. *Nature* 498:E4-6; discussion E6-7
 26. Butler B, Saha K, Rana T, Becker JP, Sambo D, Davari P, Goodwin JS, Khoshbouei H (2015) Dopamine Transporter Activity Is Modulated by alpha-Synuclein. *J Biol Chem* 290:29542-29554
 27. Cabin DE, Shimazu K, Murphy D, Cole NB, Gottschalk W, McIlwain KL, Orrison B, Chen A, Ellis CE, Paylor R, Lu B, Nussbaum RL (2002) Synaptic vesicle depletion correlates with attenuated synaptic responses to prolonged repetitive stimulation in mice lacking alpha-synuclein. *J Neurosci* 22:8797-8807
 28. Caslake R, Moore JN, Gordon JC, Harris CE, Counsell C (2008) Changes in diagnosis with follow-up in an incident cohort of patients with parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 79:1202-1207
 29. Castillo-Gonzalez JA, Loera-Arias MJ, Saucedo-Cardenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Garcia-Garcia A, Rodriguez-Rocha H (2017) Phosphorylated alpha-Synuclein-Copper Complex Formation in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2017:9164754
 30. Cersosimo MG, Benarroch EE (2012) Pathological correlates of gastrointestinal dysfunction in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 46:559-564
 31. Chadchankar H, Ihalainen J, Tanila H, Yavich L (2011) Decreased reuptake of dopamine in the dorsal striatum in the absence of alpha-synuclein. *Brain Res* 1382:37-44
 32. Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Sudhof TC (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14966-14971
 33. Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, Mouroux V, Douay X, Lincoln S, Levecque C, Larvor L, Andrieux J, Hulihan M, Waucquier N, Defebvre L, Amouyel P, Farrer M, Destee A (2004) Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 364:1167-1169
 34. Chung SJ, Kim J, Lee HJ, Ryu HS, Kim K, Lee JH, Jung KW, Kim MJ, Kim MJ, Kim YJ, Yun SC, Lee JY, Hong SM, Myung SJ (2016) Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord* 31:241-249

-
35. Chung SJ, Konig IR, Lohmann K, Hinrichs F, Kim J, Ryu HS, Lee HJ, Kim K, Lee JH, Jung KW, Kim MJ, Kim MJ, Kim YJ, Yun SC, Hong SM, Myung SJ, Klein C (2018) Association of SNCA variants with alpha-synuclein of gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*
 36. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. *Nat Med* 4:1318-1320
 37. de Lau LM, Breteler MM (2006) Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 5:525-535
 38. Del Tredici K, Braak H (2012) Lewy pathology and neurodegeneration in premotor Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:597-607
 39. Deng H, Wang P, Jankovic J (2018) The genetics of Parkinson disease. *Ageing Res Rev* 42:72-85
 40. Dickson DW, Fujishiro H, Orr C, DelleDonne A, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Klos KJ, Ahlskog JE (2009) Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 3:S1-5
 41. Domingo A, Klein C (2018) Genetics of Parkinson disease. *Handb Clin Neurol* 147:211-227
 42. Doppler K, Ebert S, Uceyler N, Trenkwalder C, Ebentheuer J, Volkmann J, Sommer C (2014) Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta Neuropathol* 128:99-109
 43. Ellison D, Love S, Chimelli L, Harding BN, Lowe JS, Vinters HV, Brander S, Yong Wh (2013) *Neuropathology*, Elsevier).
 44. Errea JM, Ara JR, Aibar C, de Pedro-Cuesta J (1999) Prevalence of Parkinson's disease in lower Aragon, Spain. *Mov Disord* 14:596-604
 45. Farrer M, Chan P, Chen R, Tan L, Lincoln S, Hernandez D, Forno L, Gwinn-Hardy K, Petrucelli L, Hussey J, Singleton A, Tanner C, Hardy J, Langston JW (2001) Lewy bodies and parkinsonism in families with parkin mutations. *Ann Neurol* 50:293-300
 46. Farrer M, Kachergus J, Forno L, Lincoln S, Wang DS, Hulihan M, Maraganore D, Gwinn-Hardy K, Wszolek Z, Dickson D, Langston JW (2004) Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann Neurol* 55:174-179

-
47. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4:160-164
 48. Fusco G, De Simone A, Gopinath T, Vostrikov V, Vendruscolo M, Dobson CM, Veglia G (2014) Direct observation of the three regions in alpha-synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat Commun* 5:3827
 49. Gaenslen A, Swid I, Liepelt-Scarfone I, Godau J, Berg D (2011) The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:653-658
 50. Gagnon JF, Postuma RB, Mazza S, Doyon J, Montplaisir J (2006) Rapid-eye-movement sleep behaviour disorder and neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol* 5:424-432
 51. Garcia Ruiz PJ, Catalan MJ, Fernandez Carril JM (2011) Initial motor symptoms of Parkinson disease. *Neurologist* 17:S18-20
 52. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 56:33-39
 53. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Marti MJ, Hernandez I, Valldeoriola F, Rene R, Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 29:1010-1018
 54. George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15:361-372
 55. George S, Rey NL, Reichenbach N, Steiner JA, Brundin P (2013) alpha-Synuclein: the long distance runner. *Brain Pathol* 23:350-357
 56. Gomez-Isla T, Growdon WB, McNamara M, Newell K, Gomez-Tortosa E, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1999) Clinicopathologic correlates in temporal cortex in dementia with Lewy bodies. *Neurology* 53:2003-2009
 57. Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Albert M, Growdon JH, Hyman BT (1999) Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 53:1284-1291
 58. Gorbatyuk OS, Li S, Nguyen FN, Manfredsson FP, Kondrikova G, Sullivan LF, Meyers C, Chen W, Mandel RJ, Muzyczka N (2010) alpha-Synuclein expression in rat substantia

-
- nigra suppresses phospholipase D2 toxicity and nigral neurodegeneration. *Mol Ther* 18:1758-1768
59. Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, Nie EH, Makani S, Tian N, Castillo PE, Buchman VL, Chandra SS (2010) Alphasynuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19573-19578
 60. Haga R, Sugimoto K, Nishijima H, Miki Y, Suzuki C, Wakabayashi K, Baba M, Yagihashi S, Tomiyama M (2015) Clinical Utility of Skin Biopsy in Differentiating between Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Parkinsons Dis* 2015:167038
 61. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:599-614
 62. Healy DG, Falchi M, O'Sullivan SS, Bonifati V, Durr A, Bressman S, Brice A, Aasly J, Zabetian CP, Goldwurm S, Ferreira JJ, Tolosa E, Kay DM, Klein C, Williams DR, Marras C, Lang AE, Wszolek ZK, Berciano J, Schapira AHV, Lynch T, Bhatia KP, Gasser T, Lees AJ, Wood NW (2008) Phenotype, genotype, and worldwide genetic penetrance of LRRK2-associated Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet Neurology* 7:583-590
 63. Hilton D, Stephens M, Kirk L, Edwards P, Potter R, Zajicek J, Broughton E, Hagan H, Carroll C (2014) Accumulation of alpha-synuclein in the bowel of patients in the pre-clinical phase of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 127:235-241
 64. Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992) Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55:181-184
 65. Iranzo A, Tolosa E, Gelpi E, Molinuevo JL, Valldeoriola F, Serradell M, Sanchez-Valle R, Vilaseca I, Lomena F, Vilas D, Llado A, Gaig C, Santamaria J (2013) Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *Lancet Neurol* 12:443-453
 66. Iyer A, Roeters SJ, Schilderink N, Hommersom B, Heeren RM, Woutersen S, Claessens MM, Subramaniam V (2016) The Impact of N-terminal Acetylation of alpha-Synuclein on Phospholipid Membrane Binding and Fibril Structure. *J Biol Chem* 291:21110-21122

-
67. Jendroska K, Olasode BJ, Daniel SE, Elliott L, Ogunniyi AO, Aghadiuno PU, Osuntokun BO, Lees AJ (1994) Incidental Lewy body disease in black Africans. *Lancet* 344:882-883
 68. Kalinderi K, Bostantjopoulou S, Fidani L (2016) The genetic background of Parkinson's disease: current progress and future prospects. *Acta Neurol Scand* 134:314-326
 69. Klein C, Schlossmacher MG (2006) The genetics of Parkinson disease: Implications for neurological care. *Nat Clin Pract Neurol* 2:136-146
 70. Klingelhoefer L, Reichmann H (2015) Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol* 11:625-636
 71. Kokhan VS, Van'kin GI, Ninkina NN, Shelkovnikova TA, Bachurin SO (2011) Impaired spatial and working memory in ageing mice with targeted inactivation of alpha-synuclein gene. *Dokl Biol Sci* 441:354-356
 72. Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ (2007) Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci* 27:1405-1410
 73. Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 18:106-108
 74. Kwon PS, Verghese J (2005) Walking while talking: a dopamine-responsive task in early Parkinson's disease. *J Am Geriatr Soc* 53:735-737
 75. Lai BC, Marion SA, Teschke K, Tsui JK (2002) Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 8:297-309
 76. Lang AE, Houeto JL, Krack P, Kubu C, Lyons KE, Moro E, Ondo W, Pahwa R, Poewe W, Troster AI, Uitti R, Voon V (2006) Deep brain stimulation: preoperative issues. *Mov Disord* 21 Suppl 14:S171-196
 77. Lang AE, Lozano AM (1998) Parkinson's disease. First of two parts. *N Engl J Med* 339:1044-1053
 78. Lashuel HA, Petre BM, Wall J, Simon M, Nowak RJ, Walz T, Lansbury PT, Jr. (2002) Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils. *J Mol Biol* 322:1089-1102

-
79. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, Derkinderen P (2010) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One* 5:e12728
 80. Lee HJ, Choi C, Lee SJ (2002) Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form. *J Biol Chem* 277:671-678
 81. Lee JM, Derkinderen P, Kordower JH, Freeman R, Munoz DG, Kremer T, Zago W, Hutten SJ, Adler CH, Serrano GE, Beach TG (2017) The Search for a Peripheral Biopsy Indicator of alpha-Synuclein Pathology for Parkinson Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 76:2-15
 82. Lesage S, Anheim M, Letournel F, Bousset L, Honore A, Rozas N, Pieri L, Madiona K, Durr A, Melki R, Verny C, Brice A (2013) G51D alpha-synuclein mutation causes a novel parkinsonian-pyramidal syndrome. *Ann Neurol* 73:459-471
 83. Lilienfeld DE, Perl DP (1994) Projected neurodegenerative disease mortality among minorities in the United States, 1990-2040. *Neuroepidemiology* 13:179-186
 84. Madine J, Doig AJ, Middleton DA (2006) A study of the regional effects of alpha-synuclein on the organization and stability of phospholipid bilayers. *Biochemistry* 45:5783-5792
 85. Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W (2015) The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 5:681-697
 86. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8:2804-2815
 87. Maroteaux L, Scheller RH (1991) The rat brain synucleins; family of proteins transiently associated with neuronal membrane. *Brain Res Mol Brain Res* 11:335-343
 88. Martin I, Kim JW, Dawson VL, Dawson TM (2014) LRRK2 pathobiology in Parkinson's disease. *J Neurochem* 131:554-565
 89. Martinez-Martin P, Gil-Nagel A, Gracia LM, Gomez JB, Martinez-Sarries J, Bermejo F (1994) Unified Parkinson's Disease Rating Scale characteristics and structure. The Cooperative Multicentric Group. *Mov Disord* 9:76-83

-
90. McCann SJ, LeCouteur DG, Green AC, Brayne C, Johnson AG, Chan D, McManus ME, Pond SM (1998) The epidemiology of Parkinson's disease in an Australian population. *Neuroepidemiology* 17:310-317
 91. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47:1113-1124
 92. McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW (2002) Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 16:2136-2148
 93. Milber JM, Noorigian JV, Morley JF, Petrovitch H, White L, Ross GW, Duda JE (2012) Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology* 79:2307-2314
 94. Morens DM, Davis JW, Grandinetti A, Ross GW, Popper JS, White LR (1996) Epidemiologic observations on Parkinson's disease: incidence and mortality in a prospective study of middle-aged men. *Neurology* 46:1044-1050
 95. Nikolaus S, Antke C, Muller HW (2009) In vivo imaging of synaptic function in the central nervous system: I. Movement disorders and dementia. *Behav Brain Res* 204:1-31
 96. Ouberai MM, Wang J, Swann MJ, Galvagnion C, Guilliams T, Dobson CM, Welland ME (2013) alpha-Synuclein senses lipid packing defects and induces lateral expansion of lipids leading to membrane remodeling. *J Biol Chem* 288:20883-20895
 97. Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA (2010) Role of post-translational modifications in modulating the structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog Brain Res* 183:115-145
 98. Paleologou KE, Oueslati A, Shakked G, Rospigliosi CC, Kim HY, Lamberto GR, Fernandez CO, Schmid A, Chegini F, Gai WP, Chiappe D, Moniatte M, Schneider BL, Aebischer P, Eliezer D, Zweckstetter M, Masliah E, Lashuel HA (2010) Phosphorylation at S87 is enhanced in synucleinopathies, inhibits alpha-synuclein oligomerization, and influences synuclein-membrane interactions. *J Neurosci* 30:3184-3198
 99. Pankratz N, Foroud T (2004) Genetics of Parkinson disease. *NeuroRx* 1:235-242

-
100. Payton JE, Perrin RJ, Woods WS, George JM (2004) Structural determinants of PLD2 inhibition by alpha-synuclein. *J Mol Biol* 337:1001-1009
 101. Pelkonen A, Yavich L (2011) Neuromuscular pathology in mice lacking alpha-synuclein. *Neurosci Lett* 487:350-353
 102. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
 103. Pont-Sunyer C, Hotter A, Gaig C, Seppi K, Compta Y, Katzenschlager R, Mas N, Hofeneder D, Brucke T, Bayes A, Wenzel K, Infante J, Zach H, Pirker W, Posada IJ, Alvarez R, Ispierito L, De Fabregues O, Callen A, Palasi A, Aguilar M, Marti MJ, Valldeoriola F, Salamero M, Poewe W, Tolosa E (2015) The onset of nonmotor symptoms in Parkinson's disease (the ONSET PD study). *Mov Disord* 30:229-237
 104. Postuma RB, Gagnon JF, Bertrand JA, Genier Marchand D, Montplaisir JY (2015) Parkinson risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: preparing for neuroprotective trials. *Neurology* 84:1104-1113
 105. Pouchieu C, Piel C, Carles C, Gruber A, Helmer C, Tual S, Marcotullio E, Lebailly P, Baldi I (2018) Pesticide use in agriculture and Parkinson's disease in the AGRICAN cohort study. *Int J Epidemiol* 47:299-310
 106. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Rouaud T, Flamant M, Toulgoat F, Roy M, Vavasseur F, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P (2012) Analysis of colonic alpha-synuclein pathology in multiple system atrophy. *Parkinsonism Relat Disord* 18:893-895
 107. Priyadarshi A, Khuder SA, Schaub EA, Priyadarshi SS (2001) Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis. *Environ Res* 86:122-127
 108. Rappley I, Gitler AD, Selvy PE, LaVoie MJ, Levy BD, Brown HA, Lindquist S, Selkoe DJ (2009) Evidence that alpha-synuclein does not inhibit phospholipase D. *Biochemistry* 48:1077-1083
 109. Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, Martino D, Fontana A, Logroscino G (2016) Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* 86:566-576

-
110. Rubio JP, Topp S, Warren L, St. Jean PL, Wegmann D, Kessner D, Novembre J, Shen J, Fraser D, Aponte J, Nangle K, Cardon LR, Ehm MG, Chissoe SL, Whittaker JC, Nelson MR, Mooser VE (2012) Deep sequencing of the LRRK2 gene in 14,002 individuals reveals evidence of purifying selection and independent origin of the p.Arg1628Pro mutation in Europe. *Human Mutation* 33:1087-1098
 111. Samii A, Nutt JG, Ransom BR (2004) Parkinson's disease. *The Lancet* 363:1783-1793
 112. Sandmann-Keil D, Braak H (2005) [Postmortal diagnosis of Parkinson's disease]. *Pathologie* 26:214-220
 113. Savica R, Carlin JM, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Maraganore DM, Bharucha AE, Rocca WA (2009) Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology* 73:1752-1758
 114. Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I (2015) Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *Lancet Neurol* 14:57-64
 115. Schulz-Schaeffer WJ (2010) The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 120:131-143
 116. Schulz-Schaeffer WJ (2015) Is Cell Death Primary or Secondary in the Pathophysiology of Idiopathic Parkinson's Disease? *Biomolecules* 5:1467-1479
 117. Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Droese W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretschmar HA (2000) The paraffin-embedded tissue blot detects PrP(Sc) early in the incubation time in prion diseases. *Am J Pathol* 156:51-56
 118. Scott DA, Tabarean I, Tang Y, Cartier A, Masliah E, Roy S (2010) A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration. *J Neurosci* 30:8083-8095
 119. Shahed J, Jankovic J (2007) Motor symptoms in Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol* 83:329-342
 120. Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000) Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25:302-305
 121. Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, Hulihan M, Peuralinna T, Dutra A, Nussbaum R, Lincoln S, Crawley A, Hanson M, Maraganore D,

-
- Adler C, Cookson MR, Muentner M, Baptista M, Miller D, Blancato J, Hardy J, Gwinn-Hardy K (2003) alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 302:841
122. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840
123. Stern MB, Lang A, Poewe W (2012) Toward a redefinition of Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:54-60
124. Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P (2016) Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann Neurol* 79:940-949
125. Tir M, Devos D, Blond S, Touzet G, Reyns N, Duhamel A, Cottencin O, Dujardin K, Cassim F, Destee A, Defebvre L, Krystkowiak P (2007) Exhaustive, one-year follow-up of subthalamic nucleus deep brain stimulation in a large, single-center cohort of parkinsonian patients. *Neurosurgery* 61:297-304; discussion 304-295
126. Tompkins MM, Hill WD (1997) Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res* 775:24-29
127. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11282-11286
128. Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103:17-37
129. Varkey J, Isas JM, Mizuno N, Jensen MB, Bhatia VK, Jao CC, Petrlova J, Voss JC, Stamou DG, Steven AC, Langen R (2010) Membrane curvature induction and tubulation are common features of synucleins and apolipoproteins. *J Biol Chem* 285:32486-32493
130. Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F (1990) Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol* 79:581-583
131. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F (1988) Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 76:217-221

-
132. Wakabayashi K, Tanji K, Mori F, Takahashi H (2007) The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. *Neuropathology* 27:494-506
 133. Wersinger C, Prou D, Vernier P, Sidhu A (2003) Modulation of dopamine transporter function by alpha-synuclein is altered by impairment of cell adhesion and by induction of oxidative stress. *Faseb j* 17:2151-2153
 134. Westphal CH, Chandra SS (2013) Monomeric synucleins generate membrane curvature. *J Biol Chem* 288:1829-1840
 135. Yamawaki M, Kusumi M, Kowa H, Nakashima K (2009) Changes in prevalence and incidence of Parkinson's disease in Japan during a quarter of a century. *Neuroepidemiology* 32:263-269
 136. Zange L, Noack C, Hahn K, Stenzel W, Lipp A (2015) Phosphorylated alpha-synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Brain* 138:2310-2321
 137. Zetuský WJ, Jankovic J, Pirozzolo FJ (1985) The heterogeneity of Parkinson's disease: clinical and prognostic implications. *Neurology* 35:522-526
 138. Zhang ZX, Roman GC (1993) Worldwide occurrence of Parkinson's disease: an updated review. *Neuroepidemiology* 12:195-208
 139. Zhu M, Fink AL (2003) Lipid binding inhibits alpha-synuclein fibril formation. *J Biol Chem* 278:16873-16877

6. Anhang

6.2. Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer`s Disease; M. Alzheimer
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata; destilliertes Wasser
BCIP	Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat
CAA	Cerebral amyloid angiopathy; zerebrale Amyloidangiopathie

CBD	Corticobasal degeneration; Kortikobasale Degeneration
DAB	Diaminobenzidin (Chromogen)
DLB	Dementia with lewy bodies; Lewy-Körperchen-Demenz
FTD	Frontotemporale Demenz
MSA	Multisystematrophie
iPD	idiopathic Parkinson's disease, idiopatische Parkinson-Krankheit
PK	Proteinase K
PSP	Progressive Supranukleäre Paralyse
UPDRS	Unified Parkinson disease rating scale;

6.3. Lösungen

6.3.11 Histologische Lösungen

Eosinlösung

0,1 % Eosin
in Aqua bidest.

6.3.12 Reagenzien Immunhistochemischen Färbungen

Dako REAL™ Antibody Diluent

Tris-Puffer, pH 7,2, mit 15 mmol/L NaN₃ und Protein.

Dako REAL™ EnVision™/HRP, Rabbit/Mouse (ENV)

Das Reagenz enthält mit Peroxidase markiertes Polymer, konjugiert mit Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulinen (Ig) in Tris-HCl-Puffer mit Stabilisierungsproteinen und einem antimikrobiellen Wirkstoff.

Dako REAL™ DAB+ Chromogen

5 mL, 50fach konzentriert 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in organischem Lösungsmittel.

Dako REAL™ Substrate Buffer

Gepufferte Lösung mit Wasserstoffperoxid und Konservierungsmittel

6.3.13 Reagenzien und Lösungen für PET-Blot

Casein 0,2%

2g I-Block auf 1000ml PBS

1ml 100% Tween 20 hinzufügen

NBT-Lösung

45µl NBT

33µl BCIP

10ml NTM-Puffer

NTM-Puffer (pH 9,5)

100mM TrisHCL pH 9,5

100mM NaCl

50mM MgCl₂

in Aqua dest.

PBS (pH 7,4)

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

12 mM Phosphat

in Aqua bidest.

PBST

250 ml PBS pH 7,4

400µl Tween 20

Proteinase-K-Puffer

10mM TrisHCL pH 7,8

100mM NaCl

0,1% Brij 35

50mM CaCl₂

50mM MgCl₂

TBST

10mM TrisHCL pH 7,8

100mM NaCl
0,05% Tween20

6.4. Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Artikelnummer und Hersteller
Aqua bidest.	0082479E, B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Casein	293-428-4, Carl Roth
Tween 20 (Polysorbat 20)	3472, Caesar & Loretz GmbH, Hilden
NaCl	8147250400, Merck KGaA, Darmstadt
NBT	N6876-50MG, Sigma Aldrich
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	8147330100, Merck KGaA, Darmstadt
KCl	8147490301, Merck KGaA, Darmstadt
TrisHCL pH 7,8	214-684-5, Carl Roth
Brij [®] 35 solution	B4184, Merck KGaA, Darmstadt
CaCl ₂	8146583302, Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	254-457-8; BioScience Grade

6.5. Grafikverzeichnis

Grafik 1: α -Synukleinpathologie in Nerven der Glandula submandibularis bei PD/DLB: Vergleich der Intensität verschiedener Nachweismethoden und verschiedener Antikörper... 42
Grafik 2: Darstellung der Menge der sichtbar gemachten immunreaktiven Strukturen in Abhängigkeit von Nachweisverfahren und verwendeten Antikörper 45
Grafik 3: Grafische Darstellung der in Tabelle 15 aufgeführten Daten. 50
Grafik 4: Mindestfläche einer Biopsie, die für die Diagnose ausreichend ist..... 52

6.6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die pathophysiologischen Prozesse bei MP. Erstellt gemäß (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015).....	11
Abbildung 2: Schrittweise Vorgehen für klinische Diagnostik von iPD. Schema erstellt gemäß UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Kriterien (HUGHES et al., 1992).	20
Abbildung 3: Immunhistochemische Färbung mit dem Antikörper LB509 (1:500 verdünnt), 400x Vergrößerung	28
Abbildung 4: PET-Blot Membranen zwischen Papiertuchstreifen unter beschwerten Glasplatten.....	33
Abbildung 5: Einzelne Nervenzellenfortsätze in dem Drüsenparenchym. Immunhistochemie mit dem Neurofilament-Antikörper. Vergrößerung : 200x	37
Abbildung 6: mit den Antikörpern 10D2 und pSer129 detektierte immunreaktive Fasern. Immunhistochemie mit PK Verdau. Links Vergrößerung 200x, rechts Vergrößerung 400x ..	38
Abbildung 7: mit Antikörpern 10D2 und pSer129 detektierte immunreaktive Nerven. Immunhistochemie mit PK Verdau. Links Vergrößerung 200x, rechts Vergrößerung 400x .	39
Abbildung 8: Typische Befunde der PET-Blot Färbung mit Antikörpern 10D2 und pSer129. Mit den roten Pfeilen sind die immunreaktiven Nerven markiert. Vergrößerung 100x	42
Abbildung 8: Illustration der sichtbar gemachten immunreaktiven Strukturen in Abhängigkeit von Nachweisverfahren und verwendeten Antikörper. Bilder 1-4 100x Gesamtvergrößerung. Bilder 5 und 6 200x Gesamtvergrößerung. IHC = Immunhistochemie	47
Abbildung 9: Visuelle Repräsentation der eingeschätzten Biopsie Mindestfläche für Aggregatdetektion mittels PET-Blot mit dem Antikörper 10D2.	54

6.7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Stadien von Morbus Parkinson. Abgeleitet von (STERN et al., 2012) und (MAHLKNECHT et al., 2015)	8
Tabelle 2: Anzahl von Patienten in der Untersuchungs- und Kontrollgruppe, Patientenalter und Geschlecht	24

Tabelle 3: Übersicht Erkrankungsdauer in der Untersuchungsgruppe.....	25
Tabelle 4: Diagnosen Übersicht der Kontrollgruppe	26
Tabelle 5: Für die Endversuche Verwendete Antikörper	29
Tabelle 6: Auswertung der im Gewebsschnitt vorhandenen Nerven.....	32
Tabelle 7: Für PET-Blot Färbungen verwendeten Antikörper.....	34
Tabelle 8: Quantifizierung der α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven der glandula submandibularis von PD/DLB-Autopsien	39
Tabelle 9: Korrelationsanalyse zwischen α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven in Immunhistochemie Präparaten und Erkrankungsdauer.....	40
Tabelle 10: Korrelationsanalyse zwischen α -Synuklein-Immunreaktivität der Nerven in PET-Blot Präparaten und Erkrankungsdauer.....	43
Tabelle 11: Anzahl von in 10 Gesichtsfeldern identifizierten immunreaktiven Strukturen (Scores) bei verschiedenen Alpa-Synuklein-Nachweismethoden.....	44
Tabelle 12: Erläuterung zu Grafik 2.....	45
Tabelle 13: Willcoxon-Test Ergebnisse	46
Tabelle 14: Korrelation des Scores der Anzahl von in 10 Gesichtsfeldern identifizierten immunreaktiven Strukturen zur Erkrankungsdauer	48
Tabelle 15: Anzahl der Gesichtsfelder bei 200x Vergrößerung, die eine sichere Diagnose der α -Synuklein Pathologie in der autoptischen glandula submandibularis von PD/DLB-Patienten ermöglichten. Bzw. Anzahl der positiven Gesichtsfelder für jeweilige Methode	49
Tabelle 16: Anzahl benötigten Gesichtsfeldern für jeweilige Methode, um auf eine sicher zur Diagnose führende Pathologie mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 95% zu treffen....	50
Tabelle 17: Mindestfläche einer Biopsie in mm ²	51
Tabelle 18: Willcoxon-Test Ergebnisse	53
Tabelle 19: Mindestfläche einer Biopsie: Obere Grenze des einseitigen 95% Konfidenzintervall bei unbekannter Varianz.....	54
Tabelle 20: Nur wegen Vorhandensein immunreaktiven Nerven als positiv bewertete Gesichtsfelder.....	55

Tabelle 21: Autopsie Studien, die das Vorkommen von α -Synukleinaggregaten in der Unterkieferspeicheldrüse untersucht haben	58
Tabelle 22: Überblick über die Studien, die mit bioptisch gewonnenem Drüsengewebe durchgeführt wurden	65

7. Publikation / Danksagung

7.2. Publikation

69th Annual Meeting German Society for Neuropathology and Neuroanatomy 2019 in Magdeburg

„Detection of α -Synuclein aggregates in the submandibular gland for the diagnosis of Parkinson's disease”

M. Gorbachuk, A. Wrede, J. Spiegel, W. J. Schulz-Schaeffer (Homburg/DE)

19. Saarländischer Neurologietag 2020 in Homburg

„Pathologische Alpha-Synuklein-Aggregate in der Glandula submandibularis beim Morbus Parkinson – Ergebnisse einer Autopsie-Studie“

M. Gorbachuk, W. J. Schulz-Schaeffer

7.3. Danksagung

Meinen Eltern Gurina Viktoria und Mykola Gorbachuk möchte ich dafür danken, dass sie mir mein Studium und meine Promotion in Deutschland ermöglicht haben sowie für ihre Unterstützung und Geduld.

Herrn Prof. Dr. med. Walter Schulz-Schaeffer möchte ich ausgesprochen herzlich für die hervorragende Betreuung, die tatkräftige Unterstützung sowohl bei der Doktorarbeit als auch im Studium und nicht zuletzt für die ehrliche und ausführliche Beratung bezüglich meines Berufseinstiegs danken.

Bei Frau Dr. med. vet. Wiebke Jürgens-Wemheuer möchte ich mich aufrichtig für die Korrektur der Arbeit und ihre Unterstützung bedanken.

Bei Herrn Dr. med. Arne Wrede möchte ich mich für seine ständige Bereitschaft, meine Fragen zu beantworten und auszudiskutieren, herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. Jörg Spiegel möchte ebenfalls herzlich für seinen Beitrag zu meiner Dissertation danken.

Unseren Forschungs-Technischen-Assistenten Irina Schaumburg, Nadja Martini, Dalia Krauceviciene und besonders Tatjana Pfander möchte ich mich für ihre Zeit, die Unterstützung, Beratung und die produktive Zusammenarbeit bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich Iris Konrad, Annika Pieper, Stefanie Schaffner, Lennart Walter Casper Brandes, Leonie Schneider, Daria Kleine, Florian Biersack, Anne Buning und Susanne Fehst-Pieper für ihre hervorragende Hilfe und Unterstützung bei der sprachlichen Korrektur sowie den notwendigen und schönen Ausgleich in einer arbeitsintensiven Zeit herzlich danken.

8. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.