

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

Nachweis und Analyse von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Hautnerven von Patienten mit Morbus Parkinson oder Multisystematrophie

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Katharina Schneider

aus Iphofen

Würzburg, Dezember 2017

Referentin: Prof. Dr. med. Claudia Sommer

Korreferent/in: Priv.-Doz. Dr. med. Camelia-Maria Monoranu

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Oktober 2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Morbus Parkinson.....	1
1.1.1	Epidemiologie.....	1
1.1.2	Definition und Klassifikation.....	1
1.1.3	Pathophysiologie	2
1.1.4	Diagnostik.....	2
1.1.5	Therapie	3
1.2	Alpha-Synuclein	4
1.2.1	Entdeckung und historischer Überblick.....	4
1.2.2	Physiologie und Pathophysiologie.....	4
1.2.3	Möglicher diagnostischer Marker für den Morbus Parkinson und die MSA	5
1.2.4	Verteilung im peripheren Nervensystem	7
1.3	Periphere Nervenschädigungen bei Morbus Parkinson	8
1.4	Störungen des autonomen Nervensystems bei Parkinson-Syndromen.....	9
1.5	Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Parkinson	10
1.5.1	Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	10
1.5.2	Beeinträchtigung des axonalen Transports	11
1.5.3	Veränderungen der Mitochondrien.....	12
1.6	Überblick über Zielsetzung und Aufbau dieser Studie	13
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Studienteilnehmer	14
2.1.1	Überblick	14
2.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	14
2.1.3	Patienten mit Morbus Parkinson.....	15
2.1.4	Patienten mit MSA	15
2.1.5	Patienten mit Tauopathien	15
2.1.6	Kontrollpersonen	16

2.2	Fragebögen	16
2.2.1	UPDRS	16
2.2.2	NMS	17
2.3	Vorerkrankungen und Orale Glukosetoleranztest	17
2.4	Vitaminbestimmungen.....	17
2.5	Sensible Neurographie des Nervus suralis	18
2.6	QST.....	18
2.7	Hautbiopsie	19
2.7.1	Durchführung der Probenentnahme und Probenaufbereitung.....	19
2.7.2	Durchführung der immunhistochemischen Färbung.....	19
2.7.3	Durchführung der Fluoreszenz-Mikroskopie.....	20
2.7.4	Verschiedene Fluoreszenzfärbungen	21
2.7.4.1	Färbung des Phospho-Alpha-Synucleins.....	21
2.7.4.2	Färbung des axonalen Markers PGP9.5	22
2.7.4.2.1	Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte	22
2.7.4.2.2	Bestimmung der Innervation der Schweißdrüsen	23
2.7.4.2.3	Bestimmung der Innervation der Musculi arrectores pilorum	24
2.7.4.3	Färbung von Nervenfasersubtypen.....	25
2.7.4.4	Färbung von axonalen Transportproteinen.....	27
2.7.4.5	Färbung von Mikrotubuli	28
2.7.4.6	Färbung von Mitochondrien.....	29
2.8	Fallzahlplanung und statistische Auswertung	29
2.9	Material.....	31
2.9.1	Antikörper.....	31
2.9.1.1	Primärantikörper.....	31
2.9.1.2	Sekundärantikörper	32
2.9.2	Reagenzien.....	33
2.9.3	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.9.4	Geräte	34
2.9.5	Software.....	35

3	ERGEBNISSE	36
3.1	Studienteilnehmer	36
3.1.1	Gruppen-Matching.....	36
3.1.1.1	Altersverteilung.....	36
3.1.1.2	Geschlechterverteilung.....	36
3.1.2	Krankheitsstadien nach Hoehn und Yahr	37
3.1.3	Krankheitsdauer.....	39
3.2	Auswertung der Fragebögen	39
3.2.1	Vergleich zwischen den Patientengruppen	39
3.2.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	39
3.3	Auswertung der Vitaminbestimmungen	40
3.3.1	Normabweichungen der Vitaminspiegel.....	40
3.3.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	40
3.3.3	Zusammenhang mit der Nervenfunktion und der Nervendichte	41
3.4	Einflüsse einer Therapie mit L-Dopa	41
3.4.1	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	41
3.4.2	Einfluss auf die Vitaminspiegel.....	42
3.4.3	Einfluss auf die Nervenfunktion und die Nervendichte.....	42
3.4.4	Einfluss auf die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	42
3.5	Auswertung der sensiblen Neurographie des Nervus suralis	42
3.5.1	Vergleich zwischen den Patientengruppen	42
3.5.2	Hinweise auf Nervenleitungsstörungen	44
3.5.3	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	44
3.5.4	Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	45
3.6	Auswertung der QST	45
3.6.1	Auswertung der Daten der einzelnen Patientengruppen	45
3.6.1.1	Patienten mit Morbus Parkinson	45
3.6.1.2	Patienten mit MSA.....	46
3.6.1.3	Patienten mit Tauopathien.....	48
3.6.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	49
3.6.3	Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	50

3.7	Auswertung der Hautbiopsien	50
3.7.1	Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	50
3.7.1.1	Häufigkeitsverteilung	50
3.7.1.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium, der Familienanamnese und dem Erkrankungsalter	52
3.7.1.3	Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle	52
3.7.1.4	Abhängigkeit von der Seitendominanz	55
3.7.1.5	Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern	55
3.7.1.5.1	Vergleich zwischen den Patienten mit Morbus Parkinson und den Patienten mit MSA	55
3.7.1.5.2	Betroffenheit somatosensibler Nervenfasern	59
3.7.1.5.3	Betroffenheit autonomer Nervenfasern	60
3.7.1.6	Subtypen der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern	60
3.7.2	Intraepidermale Nervenfaserdichte	62
3.7.2.1	Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen	62
3.7.2.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	64
3.7.2.3	Zusammenhang mit der Nervenfunktion	65
3.7.2.4	Abhängigkeit von der Seitendominanz	65
3.7.2.5	Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	65
3.7.3	Innervation der Schweißdrüsen	66
3.7.3.1	Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen	66
3.7.3.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	67
3.7.3.3	Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	67
3.7.4	Innervation der Musculi arrectores pilorum	68
3.7.4.1	Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen	68
3.7.4.2	Abhängigkeit vom Krankheitsstadium	69
3.7.4.3	Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen	69
3.7.5	Axonale Transportproteine	71
3.7.6	Mikrotubuli	72
3.7.7	Mitochondrien	72
4	DISKUSSION	74
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	74
4.2	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung und Interpretation	76
4.2.1	Alpha-Synuclein als möglicher diagnostischer Marker für den Morbus Parkinson und die MSA	76

4.2.2	Verteilung von Alpha-Synuclein im peripheren Nervensystem	78
4.2.3	Periphere Nervenschädigungen bei Parkinson-Syndromen	79
4.2.4	Störungen des autonomen Nervensystems bei Parkinson-Syndromen	82
4.2.5	Pathogenese des Morbus Parkinson.....	83
4.2.5.1	Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen.....	83
4.2.5.2	Beeinträchtigung des axonalen Transports und Veränderungen der Mitochondrien.....	84
4.3	Limitationen der vorliegenden Studie und Ausblick.....	85
4.3.1	Begrenzte Fallzahl	85
4.3.2	Limitiertes Untersuchungsareal	86
4.3.3	Vorselektierte Studienpopulation	86
4.3.4	Eingeschränkte Aussagekraft der Methoden.....	87
5	ZUSAMMENFASSUNG	88
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	90
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	100

1 Einleitung

1.1 Morbus Parkinson

1.1.1 Epidemiologie

Nach dem Morbus Alzheimer stellt der Morbus Parkinson mit einer im Alter auf bis zu 4 % ansteigenden Prävalenz die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung in unserer Gesellschaft dar.¹ Aufgrund der sich daraus ergebenden gesellschaftlichen Relevanz bei einer bisher nur unzureichend möglichen Diagnosesicherung und Therapie wird die Bedeutsamkeit weiterer Forschung ersichtlich (siehe 1.1.4 und 1.1.5).

1.1.2 Definition und Klassifikation

Als Leitsymptome eines Parkinson-Syndroms gelten Akinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität.² Bei Morbus Parkinson kann dabei je nach klinischem Erscheinungsbild ein akinetisch-rigider von einem Tremor-dominanten Typ unterschieden werden. Treten beide Ausprägungen gleichermaßen auf, so wird von einem Äquivalenztyp gesprochen.² Aber auch verschiedene nicht-motorische Begleitsymptome können auftreten, wie zum Beispiel Störungen in der Blutdruckregulation, Schmerzen oder auch psychische und kognitive Symptome, wie Depressionen und Gedächtnisprobleme.²

Neben dem idiopathischen Morbus Parkinson gibt es weitere Parkinson-Syndrome. Dazu zählen genetische Formen, neurodegenerative Erkrankungen oder auch symptomatische Parkinson-Syndrome, welche zum Beispiel medikamenteninduziert oder vaskulär- bzw. tumorbedingt sein können.² Parkinson-Syndrome, welche auf andere neurodegenerative Erkrankungen zurückgeführt werden können, werden häufig auch als atypische Parkinson-Syndrome bezeichnet.² Dazu gehören die Multisystematrophie vom Parkinson-Typ (MSA-P) bzw. ihre zerebelläre Form (MSA-C), die progressive supranukleäre Blickparese

(PSP, progressive supranuclear palsy), die kortikobasale Degeneration (CBD, corticobasal degeneration) sowie die Demenz vom Lewy-Körper-Typ (DLK).² Diese auch als Parkinson-plus-Syndrome bezeichneten Erkrankungen lassen sich manchmal erst im Verlauf vom klassischen Morbus Parkinson durch das Auftreten zusätzlicher Symptome und ein schlechtes Ansprechen auf eine Therapie mit L-Dopa abgrenzen (siehe 1.1.5).^{2,3} So gehören, neben der Parkinson-Symptomatik, autonome Symptome, eine Ataxie sowie eine Pyramidenbahnschädigung zu den Leitsymptomen der MSA.³ Als charakteristisch für die PSP gelten, neben der Akinese, eine vertikale supranukleäre Blicklähmung, ein ausgeprägter axialer Rigor sowie häufige Stürze.³ Eine starke Seitenbetonung der Parkinson-Symptomatik sowie eine ausgeprägte Gangstörung und eine Dysarthrie deuten hingegen auf das Vorliegen einer CBD hin.³ Demgegenüber steht bei der DLK das Auftreten kognitiver Defizite im Vordergrund.³

1.1.3 Pathophysiologie

Als ursächlich für die motorischen Symptome des Morbus Parkinson gilt die Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra, welche zu einem Dopaminmangel im Striatum führt.⁴ Dies bewirkt auf direktem Weg oder indirekt über eine Übererregung des Nucleus subthalamicus eine gesteigerte Hemmung des motorischen Thalamus und Kortex und dient damit insbesondere als Erklärungsmodell für die akinetisch-rigiden Symptome bei Parkinson-Syndromen.⁴

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnose eines Parkinson-Syndroms sowie die Abgrenzung des idiopathischen Morbus Parkinson von den atypischen Parkinson-Syndromen erfolgt weitgehend anhand der klinischen Symptomatik (siehe 1.1.2).² Höchsten Stellenwert in der Basisdiagnostik besitzt daher die komplette klinisch-neurologische Untersuchung.² Zum Staging gehören die Bestimmung des Hoehn-und-Yahr-Stadiums,⁵ welches den Schweregrad der motorischen Beeinträchtigung widerspiegelt, sowie die Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)⁶ und die Non-Motor Symptoms Assessment Scale (NMS),^{7,8} welche auch auf die

nicht-motorischen Symptome eingehen.² Zusätzlich kann eine Kernspintomographie Hinweise auf eine symptomatische Ursache oder auf das Vorliegen eines atypischen Parkinson-Syndroms liefern.²

Die histopathologische Diagnosesicherung war bislang nur post mortem durch den Nachweis von bestimmten Zelleinschlüssen, den Alpha-Synuclein-haltigen Lewy-Körperchen, im Hirngewebe möglich.^{9,10} Erst seit Kurzem gibt es Ansätze, auch periphere Gewebe auf Proteinaggregate in Nervenzellen zu untersuchen. Ein Ziel ist dabei, einen Biomarker für den Morbus Parkinson zu entwickeln, um die Diagnosesicherheit bereits zu Lebzeiten der Patienten zu verbessern.¹¹⁻¹⁷

1.1.5 Therapie

Die wichtigsten Ansätze zur Therapie des Morbus Parkinson basieren auf den pathophysiologischen Hintergründen der Erkrankung (siehe 1.1.3). So wird versucht, den Dopaminmangel durch Gabe von Dopaminagonisten bzw. der Dopaminvorstufe L-Dopa in Kombination mit einem Decarboxylasehemmer auszugleichen.² Unterstützend können den Dopaminabbau hemmende Substanzen, wie Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer (COMT-Inhibitoren) und Monoaminoxidase-B-Hemmer (MAO-B-Inhibitoren), eingesetzt werden.² In fortgeschrittenen Krankheitsstadien kann außerdem eine Tiefe Hirnstimulation (THS) erwogen werden, welche die überaktiven Zellen im Nucleus subthalamicus über eine Dauerstimulation hemmt und so zu einer Bewegungsförderung beiträgt.^{2,4}

Trotz all dieser Therapiemöglichkeiten gilt der Morbus Parkinson als bis heute nicht heilbar und die Symptomatik aufgrund von Wirkfluktuationen insbesondere bei einer langjährigen Therapie mit L-Dopa mitunter als nur schwer kontrollierbar.²

1.2 Alpha-Synuclein

1.2.1 Entdeckung und historischer Überblick

1988 gelang es Maroteaux et al. aus dem Nervengewebe eines Zitterrochens ein Protein zu isolieren, das sie, entsprechend seiner Lokalisation an Synapsen und am Nukleus, Synuclein nannten.¹⁸ Sechs Jahre später gewannen Jakes et al. mittels Immunoblot zwei gleichwertige Proteine aus dem Gehirn von Gesunden und von Alzheimer-Patienten, welche sie als Alpha- und Beta-Synuclein bezeichneten.¹⁹

Hinweise auf eine Bedeutung von Alpha-Synuclein in der Pathogenese des Morbus Parkinson fanden sich erstmals im Jahr 1997. Durch Polymeropoulos et al. wurden Mutationen im Alpha-Synuclein-Gen bei familiären Formen des Parkinson-Syndroms nachgewiesen²⁰ und durch Spillantini et al. wurde Alpha-Synuclein als wichtiger Bestandteil der Lewy-Körperchen identifiziert.²¹ Diese Einschlusskörperchen waren bereits 1912 von Friedrich Heinrich Lewy in verschiedenen Hirnregionen von Parkinson-Patienten beschrieben worden.¹⁰ Erst nach seinem Tod jedoch wurde die Bedeutung des Nachweises von Lewy-Körperchen, insbesondere in der Substantia nigra der Patienten, für die postmortale Diagnosesicherung des Morbus Parkinson erkannt.^{9,10}

1.2.2 Physiologie und Pathophysiologie

Die physiologische Funktion des Alpha-Synucleins ist bis heute nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass es eine Rolle spielt bei der synaptischen Plastizität, der Ausschüttung von Neurotransmittern an Synapsen und der Aufrechterhaltung des Vorrats an synaptischen Vesikeln.²²⁻²⁸

Wird Alpha-Synuclein jedoch phosphoryliert, so wird angenommen, dass dies eine pathologische Proteinaggregation begünstigt, wie sie in den sogenannten Synucleinopathien zu finden ist, zu denen unter anderem der Morbus Parkinson, die MSA sowie die DLK gezählt werden.²⁸⁻³⁰ Im Gegensatz dazu rechnet man die CBD und die PSP zu den

Tauopathien, das heißt zu neurodegenerativen Erkrankungen, die über eine Ablagerung des Tau-Proteins definiert sind.²

Unterschiede zwischen den Synucleinopathien ergeben sich bei der Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb des zentralen Nervensystems. Während die Lewy-Körper bei Morbus Parkinson meist innerhalb dopaminergener Neurone der Substantia nigra zu finden sind,¹⁰ gilt Alpha-Synuclein bei der MSA als wichtiger Bestandteil sogenannter oligodendroglialer Einschlusskörper (Glial Cytoplasmic Inclusions, GCI).³⁰ Dem Namen entsprechend finden sich dort Alpha-Synuclein-Ablagerungen vornehmlich in Oligodendrozyten und Mikroglia, aber auch in Neuronen und Astrozyten.³⁰ Nachzuweisen sind die Einschlusskörper dabei in vielen Regionen des zentralen Nervensystems, besonders aber in den Basalganglien.³⁰

1.2.3 Möglicher diagnostischer Marker für den Morbus Parkinson und die MSA

Einen ersten Schritt in Richtung einer prä-mortalen histopathologischen Diagnosesicherung des Morbus Parkinson gingen Michell et al., als sie 2005 mittels Immunoblot Alpha-Synuclein nicht mehr nur im Gehirn Verstorbener erforschten, sondern unter anderem auch in Hautbiopsien lebender Patienten, mit dem Ziel, einen Biomarker für den Morbus Parkinson zu entwickeln.¹¹ Die Methode stellte sich jedoch als nicht geeignet heraus, da sich keine Korrelation des Alpha-Synuclein-Nachweises mit der Diagnose eines Morbus Parkinson zeigte.¹¹

Erfolgreicher war hingegen der Ansatz von Ikemura et al., die 2008 die Haut verstorbener Parkinson-Patienten mit nachgewiesener Alpha-Synuclein-Pathologie im Gehirn immun-histochemisch mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Alpha-Synuclein, also gegen die pathologische, aggregierte Form des Proteins, untersuchten.³¹ In ihrer Kohorte erreichten sie eine Sensitivität von 70 % bei einer Spezifität von 100 % für den Nachweis von phosphoryliertem Alpha-Synuclein im Vergleich zu Patienten ohne Alpha-Synuclein-Pathologie im Gehirn.³¹

Nachfolgende Studien untersuchten Hautbiopsien von lebenden Patienten immunhistochemisch auf phosphoryliertes Alpha-Synuclein. Miki et al. beschrieben zunächst lediglich eine Sensitivität von 10 % in der Haut der Brustwand, während sie Phospho-Alpha-Synuclein am Unterschenkel gar nicht nachweisen konnten.¹² Bei Donadio et al. variierte die Sensitivität je nach Lokalisation zwischen 100 % am Hals, 52 % am Oberschenkel und 24 % am Unterschenkel.¹⁴ Die bisherigen Daten aus Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten bei den untersuchten Patienten mit Morbus Parkinson eine vergleichbare Abnahme der Ablagerungen in Richtung Peripherie mit einem Anteil an Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Proben von 35 % am Rücken, 19 % am Oberschenkel und 16 % am Unterschenkel.³² Insgesamt war somit bisher eine Tendenz zu einer körpernahen Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen mit Abnahme in Richtung Extremitäten erkennbar.^{12,14,31,32} Erklärt werden könnte diese Verteilung durch eine Ausbreitung des phosphorylierten Alpha-Synucleins von den Spinalganglien ausgehend entlang der Nerven des peripheren Nervensystems.¹⁴

Neben dem Morbus Parkinson gibt es jedoch noch weitere Erkrankungen, bei denen der Nachweis von Alpha-Synuclein eine Rolle spielt.²⁸ Während das Vorhandensein von phosphoryliertem Alpha-Synuclein im zentralen Nervensystem bei Patienten mit MSA schon seit längerem bekannt war,³⁰ war unsere Arbeitsgruppe die erste, der ein Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein auch in den Nervenfasern der Haut gelang.³³

Die Tatsache, dass sich phosphoryliertes Alpha-Synuclein über die Untersuchung von Hautproben unter dem Mikroskop nachweisen lässt, kann als vielversprechender Schritt für die Entwicklung eines Biomarkers für den Morbus Parkinson und die MSA gewertet werden. Dennoch wird die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen angesichts der deutlichen Sensitivitätsunterschiede zwischen den Forschungsgruppen erkennbar. Darüber hinaus bleibt die Frage nach einer Korrelation zwischen den Alpha-Synuclein-Ablagerungen und dem Krankheitsstadium bzw. der Erkrankungsdauer umstritten.^{13,14,32}

1.2.4 Verteilung im peripheren Nervensystem

Trotz aller Fortschritte der vergangenen Jahre ist die Untersuchung von Alpha-Synuclein im peripheren Nervensystem noch immer ein sehr junges und aktuelles Forschungsgebiet, bei dem weiterhin viele Fragen nicht ausreichend geklärt sind und bisher vor allem Studien an größeren Kohorten fehlen.

Zunächst bleibt die Frage nach der Lokalisation der Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb der einzelnen Strukturen der Haut interessant. Erste Ergebnisse in diesem Zusammenhang erbrachten Wang et al. im Jahr 2013.¹³ In ihrer Färbung mit einem Antikörper gegen unphosphoryliertes, also natives Alpha-Synuclein fanden sie, dass bei Patienten mit Morbus Parkinson die Intensität in den Nervenfasern von Schweißdrüsen und Musculi arrectores pilorum (Haarbalgmuskeln) erhöht war, während dies bei sensiblen, intraepidermalen Fasern nicht der Fall war.¹³ Demgegenüber konnten Donadio et al. Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins vor allem in Nervenfasern von dermalen Nervenbündeln und Blutgefäßen nachweisen.¹⁴ Bei den ersten idiopathischen Parkinson-Patienten, die von unserer Arbeitsgruppe untersucht wurden, waren Phospho-Alpha-Synuclein-positive Nervenfasern insbesondere in Blutgefäßen, Schweißdrüsen und Arrector pili-Muskeln nachweisbar, was autonomen Nervenfasern entspricht.³² Bei den in Folge untersuchten Patienten mit MSA jedoch waren die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen überwiegend subepidermal, also in somatosensiblen Nervenfasern, oder innerhalb dermalen Nervenfaserbündel zu finden.³³

Untersuchungen, welche Nervenfasersubtypen von Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins bzw. von einer Lewy-Körper-Pathologie betroffen sind, waren bislang weitgehend auf das zentrale und das autonome Nervensystem beschränkt.^{32,34-37} Wie bereits erwähnt, lassen sich Lewy-Körperchen im zentralen Nervensystem überwiegend in dopaminergen Neuronen der Substantia nigra nachweisen (siehe 1.2.2).¹⁰ Als entscheidendes Enzym der Dopamin-Synthese dient die Tyrosinhydroxylase (TH) als Marker für dopaminerge und noradrenerge Neurone.³⁸⁻⁴⁰ Zudem gibt es Hinweise darauf, dass eine Zunahme an Alpha-Synuclein zu einer Reduktion an TH in den betroffenen Nervenzellen führt.^{38,41} Dennoch konnten im zentralen Nervensystem nicht nur innerhalb

TH-haltiger Nervenfasern Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachgewiesen werden, sondern auch Substanz P (SP)-haltige Nervenfasern sind betroffen.^{34,36,37} Im enterischen Nervensystem sowie in sympathischen Ganglien war Alpha-Synuclein außerdem in Fasern feststellbar, die immunreaktiv für VIP (Vasoaktives Intestinales Peptid) oder TH waren.³⁵

Im peripheren Nervensystem war unsere Arbeitsgruppe hingegen eine der ersten, die sich näher damit auseinandersetzte, in welchen Nervenfasersubtypen sich Phospho-Alpha-Synuclein besonders ablagert, also in adrenergen (TH-positiven), cholinergen (VIP-positiven) oder peptidergen (SP-positiven bzw. CGRP (calcitonin gene-related peptide)-positiven) Nervenfasern.^{32,33} In den Hautbiopsien der ersten Untersuchungsserie war hierbei sowohl bei den Patienten mit Morbus Parkinson als auch bei denen mit MSA der Anteil an TH-positiven Nervenfasern am höchsten,^{32,33} was sich gut in die Befunde im zentralen Nervensystem einfügt.^{34,37-41}

1.3 Periphere Nervenschädigungen bei Morbus Parkinson

Während der Ursprung der motorischen Symptome des Morbus Parkinson vornehmlich in dem Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra zu begründen ist (siehe 1.1.3), sprechen die nicht-motorischen Symptome gegen eine reine Störung der Basalganglien und für eine systemische Beteiligung.⁴² Insbesondere Schmerzen und Sensibilitätsdefizite wurden mehrfach bei Patienten mit Morbus Parkinson beschrieben und teilweise auf periphere Nervenschädigungen zurückgeführt.⁴²⁻⁴⁵ Allerdings besteht noch immer Uneinigkeit über Art und Ursache dieser Nervenschädigungen.⁴²

Nolano et al. konnten im Jahr 2008 eine Verminderung der kleinen Nervenfasern der Haut feststellen.⁴³ Doch während in ihrem Kollektiv die Nervenleitgeschwindigkeit der Parkinson-Patienten in der Elektroneurographie unbeeinträchtigt war, konnten andere Arbeitsgruppen, insbesondere im Zusammenhang mit einer L-Dopa-Therapie, auch Funktionsstörungen der mittleren und großen Nerven feststellen.^{42,46-49} All diese Studien ergaben außerdem Hinweise darauf, dass eine L-Dopa-Gabe zu einer Reduktion an Vitamin B6, Vitamin B12 und Folsäure sowie, in Folge des Vitamin B12-Mangels, zu einer

Erhöhung des Methylmalonsäure- und Homocystein-Spiegels führt.^{42,46-49} Diese Vitaminveränderungen stellen bekannte Ursachen für die Entstehung einer Polyneuropathie dar.^{3,50}

Für die Patienten von deutlich wichtigerer Bedeutung als elektrophysiologische Tests ist jedoch der Nachweis einer funktionellen Störung der Nervenfasern. Die Quantitative Sensorische Testung (QST) stellt ein geeignetes Mittel dar, diese zu quantifizieren.⁵¹ Und tatsächlich konnten bereits Nolano et al. bei ihren Patienten eine Dysfunktion der kleinen Nervenfasern feststellen.⁴³

Einen Zusammenhang zwischen dem Nachweis von Alpha-Synuclein und einer Schädigung kleiner Nervenfasern stellten schließlich Donadio et al. im Jahr 2014 her.¹⁴ Bei ihnen ergab sich eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen der epidermalen Nervenfaserdichte des Beines und des Prozentsatzes an Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Strukturen.¹⁴

Dennoch kann das Zusammenspiel der intraepidermalen Nervenfaserdichte, der Dysfunktion kleiner Nervenfasern in der QST und der Ablagerung von Alpha-Synuclein noch lange nicht als geklärt betrachtet werden, da die bisher untersuchten Studienkollektive häufig nur sehr klein waren und meist nur einzelne Aspekte untersucht wurden.

1.4 Störungen des autonomen Nervensystems bei Parkinson-Syndromen

Neben den motorischen und sensiblen Einschränkungen der Patienten mit Morbus Parkinson rücken auch autonome Funktionsstörungen zunehmend in den Fokus. Die sich daraus ergebenden Symptome treten bereits in frühen Krankheitsstadien auf und können die Lebensqualität der Patienten grundlegend verschlechtern.^{52,53}

Veränderungen wurden dabei bereits in vielen Regionen des autonomen Nervensystems, wie dem kardiovaskulären System, dem Harn- und Gastrointestinaltrakt sowie neuroendokrinen Strukturen identifiziert.⁵³ Ein auffälliges Merkmal der Patienten ist zum Beispiel auch eine Dysregulation der Schweißdrüsenfunktion, welche sich sowohl durch Hyper-, als auch durch Hypohidrose äußern kann.⁵³ Als histopathologisches Korrelat

konnten Dabby et al. 2006 auch tatsächlich eine signifikant verminderte Innervation von autonomen Hautstrukturen, wie Blutgefäßen, Schweißdrüsen und Haarbalgmuskeln, feststellen.⁵⁴

Gerade bei Patienten mit MSA gehören autonome Störungen zum Krankheitsbild.³ Diese werden primär auf degenerative Veränderungen verschiedener Anteile des zentralen Nervensystems, insbesondere mehrerer Strukturen im Hirnstamm, zurückgeführt.⁵⁵ Aber auch im peripheren Nervensystem ließen sich bereits Veränderungen autonomer Strukturen nachweisen.^{55,56} So konnten Provitera et al. in der Haut von MSA-Patienten eine Verminderung der Schweißdrüsen-Innervation feststellen.⁵⁶ Donadio et al. fanden hingegen lediglich morphologische Veränderungen der Schweißdrüsen-Nerven.⁵⁷

Welche Rolle eine Akkumulation von Alpha-Synuclein in Hautnerven für die autonome Dysfunktion bei Morbus Parkinson einnimmt, wurde erstmals von Wang et al. im Jahr 2013 erforscht.¹³ Bei ihren Untersuchungen zeigte sich nicht nur eine im Gegensatz zu anderen Nervenfasern der Haut verstärkte Ablagerung von Alpha-Synuclein in autonomen Strukturen, wie Schweißdrüsen und Arrector pili-Muskeln, sondern auch eine bei erhöhtem Alpha-Synuclein-Level verminderte Innervation der autonomen Strukturen, welche zudem in Funktionstests des autonomen Nervensystems, wie Valsalva-Manöver oder Kipptisch-Untersuchungen, nachvollzogen werden konnte.¹³ Bei der Untersuchung von Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins konnten Donadio et al. 2014 ebenfalls eine negative Korrelation zur Schweißdrüsen-Innervation zeigen.¹⁴

1.5 Hypothesen zur Pathogenese des Morbus Parkinson

1.5.1 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Die wohl bekannteste und wichtigste Pathologie bei Morbus Parkinson ist der Untergang dopaminerger Neurone in der Substantia nigra.³ In den Ganglienzellen konnten hierbei Alpha-Synuclein-haltige Lewy-Körperchen nachgewiesen werden, wobei eine Korrelation zwischen pathologischen Befunden und der Krankheitsaktivität gezeigt werden konnte.⁵⁸

Auf der anderen Seite gab es jedoch Befunde, die dafür sprachen, dass die Neurodegeneration der Ablagerung von Lewy-Körpern vorausgeht, was wiederum Zweifel an ihrer pathophysiologischen Relevanz aufkommen ließ.⁵⁹

Allerdings sind die Lewy-Körperchen des zentralen Nervensystems nicht die einzige Form, in der die Ablagerung von Alpha-Synuclein bei Parkinson-Patienten eine Rolle spielt, und so bietet die Haut eine einmalige Gelegenheit, prae mortem die Auswirkungen einer Akkumulation des phosphorylierten Alpha-Synucleins auf Nervenfasern zu beurteilen.

1.5.2 Beeinträchtigung des axonalen Transports

Ein pathogenetischer Faktor, der mit Alpha-Synuclein in Verbindung gebracht wird und wohl insbesondere in den frühen Stadien eine Rolle spielt, ist die Beeinträchtigung des axonalen Transports und der synaptischen Transmission.^{27,28,60}

So wurde beobachtet, dass es in Neuronen mit Alpha-Synuclein-Ablagerungen verstärkt zu einer Degeneration der Synapsen und einer Beeinträchtigung der Dopamin-Freisetzung kam.^{27,60-62} Dies könnte zum einen auf Interaktionen mit der Zellmembran oder SNARE-Proteinen an den Synapsen selbst zurückgeführt werden.^{63,64} Zum anderen gab es aber auch Hinweise darauf, dass axonale Vorgänge eine Rolle spielen, die sekundär zu Versorgungsproblemen führen, insbesondere aufgrund der Beobachtung, dass gerade dopaminerge Axone durch ihre Länge und dünne Myelinisierung besonders anfällig zu sein scheinen.^{27,65} Axonale Schäden würden zudem die längenabhängige, also in peripheren Regionen zunehmende, Degeneration der kleinen Nervenfasern der Haut erklären.³²

Bis jetzt ist jedoch unklar, an welchem Punkt der Transport gestört wird. Zum einen könnten die axonalen Transportproteine Dynein und Kinesin betroffen sein, aber auch die Mikrotubuli könnten die entscheidende Rolle spielen.

Für beide Theorien ließen sich Hinweise im zentralen Nervensystem finden. Auf der einen Seite konnten Chu et al. bei Parkinson-Patienten eine Alpha-Synuclein-abhängige Reduktion sowohl an Kinesin als auch an Dynein in dopaminergen Neuronen entdecken,

wobei Kinesin wohl schon in frühen Krankheitsstadien beeinträchtigt ist, während Dynein erst später vermindert wird.³⁷

Auf der anderen Seite fanden Qureshi et al. heraus, dass eine Überexpression an Alpha-Synuclein in vitro zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli-Struktur führen kann.⁶⁶ Darüber hinaus konnten Cartelli et al. unter anderem in einem Mausmodell, mit einem durch das Neurotoxin MPTP hervorgerufenen Parkinson-Syndrom, zeigen, dass es in verschiedenen Hirnregionen zu Veränderungen der Mikrotubuli innerhalb dopaminergischer Neurone kam.^{67,68} Sie analysierten dabei Umverteilungen im Hinblick auf verschiedene posttranslationale Veränderungen, deren Gleichgewicht als entscheidender Faktor im Hinblick auf die Funktionalität der Mikrotubuli angesehen wird.^{67,69} Allgemein gilt tyrosiniertes Tubulin als typischer Bestandteil dynamischer Mikrotubuli, während sich in stabilen und langlebigen Mikrotubuli vor allem detyrosinierte sowie acetylierte Tubuline nachweisen lassen.^{68,70} Bei ihren Untersuchungen stellten Cartelli et al. im Western Blot und mittels Immunhistochemie insbesondere einen Anstieg des Gehalts an detyrosinierten Tubulinen fest, der mit einer Beeinträchtigung des axonalen Transportes und einer konsekutiven Neurodegeneration in Verbindung gebracht werden kann.⁶⁷

1.5.3 Veränderungen der Mitochondrien

Seit einigen Jahren ist bekannt, dass eine mitochondriale Dysfunktion eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Parkinson-Syndroms spielen kann. So führen Mutationen in der mitochondrialen Kinase PINK1 oder des mitochondrialen Bindeproteins Parkin zu familiären Parkinson-Formen.^{28,71-75}

Und auch hier gibt es starke Indizien für ein Zusammenwirken mit Alpha-Synuclein. Zum einen konnte gezeigt werden, dass es sowohl an der äußeren als auch an der inneren Membran der Mitochondrien zu Alpha-Synuclein-Ablagerungen kommt.^{74,76-79} Zum anderen führte Alpha-Synuclein in Zellkulturen zu einer Fragmentierung von Mitochondrien^{28,75,77,80-82} und auch in vivo, insbesondere in einem Mausmodell mit einer A53T-Punktmutation im Alpha-Synuclein-Gen, konnten morphologische Veränderungen

nachgewiesen werden.^{74,83,84} Zusätzlich führt Alpha-Synuclein wohl auch zu funktionellen Störungen, wie einer Blockade des Komplex I der Atmungskette.^{28,74,75,78,79,85}

Somit ist die Frage berechtigt, ob auch in den Mitochondrien der peripheren Nerven entsprechende Veränderungen nachgewiesen werden können.

1.6 Überblick über Zielsetzung und Aufbau dieser Studie

Ziel der vorliegenden Studie war es, anknüpfend an den dargestellten Stand der Forschung, die Bedeutung der Akkumulation des phosphorylierten Alpha-Synucleins in der Haut von Parkinson-Patienten als Biomarker zu evaluieren sowie die Auswirkungen solcher Ablagerungen im peripheren Nervensystem zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Hautbiopsien von Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson und Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen sowie von gesunden Kontrollpersonen entnommen. Zusätzlich wurden Proben von Probanden, die bereits zu einem früheren Zeitpunkt an der Studie unserer Arbeitsgruppe teilgenommen hatten, weitergehend analysiert, um eine möglichst aussagekräftige Fallzahl zu erreichen.

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Hautschnitte zunächst auf das Vorhandensein von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen geprüft, sowie die Art der betroffenen Nervenfasern im Hinblick auf Lokalisation und Subtyp bestimmt. Daraufhin wurde die Auswirkung der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen auf die Dichte der sensiblen Nervenfasern sowie die Innervation der Musculi arrectores pilorum und der Schweißdrüsen ermittelt. Weiterhin wurden Vergleiche zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern im Hinblick auf Veränderungen an Mitochondrien, Mikrotubuli oder axonalen Transportproteinen durchgeführt.

Darüber hinaus wurden die experimentell ermittelten Ergebnisse mit klinischen Untersuchungen und Befunden der Patienten verknüpft. Dafür wurden verschiedene für Parkinson-Patienten validierte Fragebögen, Vitaminbestimmungen, die Neurographie des Nervus suralis sowie die QST einbezogen.

2 Material und Methoden

2.1 Studienteilnehmer

2.1.1 Überblick

Die vorliegende Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Würzburg und der Landesärztekammer Hessen befürwortet und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt.³² Alle Studienteilnehmer erhielten eine umfassende Aufklärung über den Umfang der Studie und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.³²

In den Jahren 2011 bis 2014 konnten insgesamt 190 Personen von mehreren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Claudia Sommer der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg für die Studie gewonnen werden. Davon wurden 181 Personen am Neurologischen Universitätsklinikum Würzburg und 9 Personen an der Paracelsus-Klinik in Kassel in die Studie aufgenommen.

An 29 Patienten mit Morbus Parkinson, 5 Patienten mit MSA-P, 5 Patienten mit PSP, 2 Patienten mit CBD und 20 Kontrollpersonen führte ich die Untersuchungen und Analysen weitgehend selbst durch, während mir die Daten der übrigen Studienteilnehmer zur gemeinsamen Auswertung von Dr. med. Kathrin Doppler zur Verfügung gestellt wurden.

2.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Da angestrebt wurde, die Einflüsse von Parkinson-Syndromen auf die kleinen Nervenfasern der Haut zu untersuchen, wurde versucht, andere Störfaktoren in diesem Zusammenhang zu minimieren. Dementsprechend wurden Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie formuliert, die insbesondere Hinweise auf Symptome einer Polyneuropathie bzw. bekannte Risikofaktoren für die Entwicklung einer solchen umfassten. Dazu gehörten das Vorliegen eines Diabetes mellitus, Alkoholmissbrauch, die Einnahme von Medikamenten, welche

eine Polyneuropathie auslösen können, sowie andere Erkrankungen, die mit einer Polyneuropathie einhergehen können (z. B. Kollagenosen, HIV, ...).⁸⁶

Rekrutiert wurden alle Patienten, ungeachtet ihres Krankheitsstadiums, mit der klinischen Diagnose eines idiopathischen Morbus Parkinson nach den Kriterien der United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank⁸⁷ sowie Patienten mit MSA-P bzw. MSA-C basierend auf den Gilman-Kriterien,⁸⁸ Patienten mit PSP oder CBD nach den Kriterien von Armstrong et al.⁸⁹ wie auch gesunde Kontrollpersonen.

2.1.3 Patienten mit Morbus Parkinson

Von den 92 untersuchten Patienten mit Morbus Parkinson litten 68 Patienten an einem akinetisch-rigiden Parkinson-Syndrom, 11 an einer Tremor-dominanten Form und 13 Patienten hatten ein Parkinson-Syndrom vom Äquivalenztyp.

2.1.4 Patienten mit MSA

Insgesamt nahmen 12 Patienten mit MSA an der Studie teil. Darunter litten 11 an der MSA-P und ein Patient an der MSA-C.

2.1.5 Patienten mit Tauopathien

Außerdem wurden 13 Patienten mit Tauopathien in die Studie eingeschlossen, wobei 8 an der PSP und 5 an der CBD erkrankt waren.

Um die im Ergebnisteil (siehe 3) dargestellte statistische Auswertung nachvollziehen zu können, ist es notwendig, sich die Unterschiede hinsichtlich der Gruppenstärke zwischen den Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson und denen mit atypischen Parkinson-Syndromen vor Auge zu führen. Aufgrund der großen Anzahl untersuchter Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson war es einfacher für diese Gruppe signifikante Beziehungen nachzuweisen als für die beiden anderen Patientengruppen mit nur 12 bzw. 13 Personen.

2.1.6 Kontrollpersonen

Neben den Parkinson-Patienten nahmen auch 83 Probanden als Kontrollpersonen an der Studie teil. Diese stammten aus dem persönlichen Umfeld der an der Studie beteiligten Doktoranden oder waren Patienten, die aufgrund anderer Erkrankungen, wie zum Beispiel Epilepsien oder Zephalgien, stationär in der Neurologischen Klinik waren. Ausschlusskriterien für die Teilnahme als Kontrollperson waren klinische Hinweise auf ein Parkinson-Syndrom oder eine Polyneuropathie sowie das Vorliegen von Sensibilitätsstörungen oder von Erkrankungen, die mit einer Polyneuropathie in Zusammenhang stehen. Zusätzlich wurden Probanden, die eine auffällige Suralis-Neurographie zeigten, für die Analyse der Nervenfaserdichten ausgeschlossen. Um einen validen Vergleich zu der eher älteren Studienpopulation der Parkinson-Patienten zu gewährleisten, wurden nur Kontrollpersonen, die über 45 Jahre alt waren, in die Auswertung aufgenommen.

2.2 Fragebögen

Um einen Einblick in den aktuellen klinischen Zustand der Patienten zu erlangen, wurden die Fragebögen der UPDRS sowie der NMS erhoben.

2.2.1 UPDRS

Im ersten und zweiten Teil der UPDRS wird auf nicht-motorische bzw. motorische Symptome des täglichen Lebens eingegangen. Das Ergebnis des dritten Teils wurde aus aktuellen Arztbriefen entnommen, da es sich hierbei um die klinisch-neurologische Untersuchung der motorischen Symptome handelt, welche als Teil der Aufnahmeuntersuchung bei jeder Vorstellung in der Neurologischen Klinik erhoben wird. Im vierten Teil werden motorische Komplikationen erfragt.⁶

2.2.2 NMS

Die NMS dient der zusätzlichen detaillierten Erfassung nicht-motorischer Symptome. Abgefragt werden eine orthostatische Dysregulation, einschließlich Synkopen (Bereich 1), Tagesmüdigkeit oder Schlafprobleme (Bereich 2), depressive Stimmungslagen (Bereich 3), Wahrnehmungsprobleme oder Halluzinationen (Bereich 4), Aufmerksamkeits- oder Gedächtnisschwierigkeiten (Bereich 5), Probleme im Gastrointestinal- oder Urogenitaltrakt (Bereiche 6-8) und andere Auffälligkeiten (Bereich 9).^{7,8}

2.3 Vorerkrankungen und Oraler Glukosetoleranztest

Neben der anamnestischen Abklärung von Vorerkrankungen wurde ein Oraler Glukosetoleranztest (OGTT) durchgeführt, um das Vorliegen einer pathologischen Glukosetoleranz bzw. eines Diabetes mellitus auszuschließen.

Tatsächlich ergaben sich bei 5 der Patienten mit Morbus Parkinson, 2 der Patienten mit MSA, einem Patienten mit PSP sowie einer Kontrollperson Hinweise auf eine gestörte Glukosetoleranz.

Darüber hinaus fand sich bei 2 Patienten mit Morbus Parkinson ein Alkohol-Abusus in der Anamnese.

Um möglicherweise darauf zurückzuführende Einflüsse auf die Ergebnisse der Untersuchungen der Nervendichte und der Nervenfunktion zu vermeiden, wurden diese Teilnehmer von allen weiteren Auswertungen ausgeschlossen und ihre Hautbiopsien lediglich zur Analyse von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen herangezogen.

2.4 Vitaminbestimmungen

Da Vitaminmangelsyndrome Ursache einer Polyneuropathie sein können (siehe 1.3), wurden Vitaminbestimmungen aus dem Serum der teilnehmenden Patienten durchgeführt. Dazu gehörten die Bestimmung von Vitamin B6, Vitamin B12, Folsäure, Methylmalonsäure und Homocystein.

2.5 Sensible Neurographie des Nervus suralis

Die Funktionsfähigkeit größerer Nerven wurde in der retrograden sensiblen Neurographie des Nervus suralis untersucht. Nach Stimulation des Nervs durch eine Oberflächenelektrode in der Wadenmitte wurde hinter dem lateralen Malleolus das sensible Nervenaktionspotenzial abgeleitet, der Abstand zwischen Stimulations- und Ableiteort gemessen und so die Nervenleitgeschwindigkeit sowie die Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials bestimmt.^{90,91}

Außerdem wurde entsprechend definierter klinikinterner Normdaten der Anteil an pathologischen Neurographie-Werten bestimmt. Für Personen, die über 65 Jahre alt waren, galten dabei Werte der Nervenleitgeschwindigkeit über 40 m/s und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials über 5 μ V als normal. Für Probanden, die unter 65 Jahre alt waren, musste die Amplitude über 10 μ V liegen.

2.6 QST

Zur Untersuchung der Funktion der sensiblen Nervenfasern und der Schmerzwahrnehmung der Haut diente die QST (siehe 2.9 (31)). Dabei wurden nach einem Protokoll des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS) bei jedem Probanden sowohl Werte am Fuß als auch an der Wange ermittelt.⁵¹

Zunächst wurden mithilfe einer Thermode die Kälte- und Wärmewahrnehmungsschwelle (cold/warm detection threshold, CDT/WDT), die Kälte- und Hitzeschmerzschwelle (cold/heat pain threshold, CPT/HPT) sowie die thermische Unterschiedsschwelle (thermal sensory limen, TSL) getestet. Daraufhin wurde durch Berührung mit genormten von-Frey-Haaren die taktile Wahrnehmungsschwelle (mechanical detection threshold, MDT) bestimmt. Nadelreizstimulatoren (Pinpricks) dienten der Ermittlung der mechanischen Schmerzschwelle (mechanical pain threshold, MPT) und der Schmerzsensitivität (mechanical pain sensitivity, MPS). Schließlich wurde noch mittels einer 64 Hz Stimmgabel die Vibrationswahrnehmung (vibration detection threshold, VDT) geprüft und anhand

eines Druckalgometers die Druckschmerzschwelle (pressure pain threshold, PPT) bestimmt.⁵¹

Zur statistischen Auswertung der Daten wurden Kontrollpersonen aus der Datenbank der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg hinzugezogen, um eine übereinstimmende Alters- und Geschlechterverteilung in Bezug auf die Patienten zu gewährleisten.

2.7 Hautbiopsie

Schließlich wurden Hautbiopsien durchgeführt und die kleinen Nervenfasern der Haut nach immunhistochemischer Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.7.1 Durchführung der Probenentnahme und Probenaufbereitung

Die Hautproben wurden mit einer 5 mm-Stanze (27) am Unterschenkel, ca. 10 cm proximal des Malleolus lateralis, am Oberschenkel, etwa 10 bis 15 cm distal der Spina iliaca anterior superior, und am Rücken, auf Höhe Th12, entnommen. Zur Fixierung wurde das gewonnene Gewebe zunächst eine halbe Stunde in 4%iger Paraformaldehyd (PFA)-Lösung (19) aufbewahrt. Nach dreimaligem Waschen in 0,1-molarem Phosphatpuffer (20) wurde das Probenmaterial in 10%ige Saccharose (21) überführt. Schließlich erfolgten die Kryokonservierung, das Schneiden und das Aufbringen auf einen Objektträger (28). Für die Färbungen mit Anti-PGP9.5 (3) zur Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte wurden je 3 Schnitte der Dicke 40 µm verwendet, während für alle weiteren Färbungen je 2 Schnitte mit 20 µm Schichtdicke genommen wurden.

2.7.2 Durchführung der immunhistochemischen Färbung

Um gezielt Nervenfasern und ihre einzelnen Bestandteile analysieren zu können, wurden Fluoreszenz-Doppelfärbungen der Schnitte durchgeführt. Dabei wurden immer zwei verschiedene Strukturen von Nervenfasern unter Verwendung von Antikörpern spezifisch gefärbt.

Das Grundprinzip der immunhistochemischen Färbung besteht darin, dass im ersten Schritt zwei verschiedene Primärantikörper auf die Probe gegeben werden, welche spezifisch an diejenigen Substanzen binden, die in der aktuellen Färbung untersucht werden sollen. Im zweiten Schritt werden zwei gegen die Primärantikörper gerichtete Sekundärantikörper hinzugegeben. Diese mit unterschiedlich fluoreszierenden Farbstoffen markierten Antikörper binden nun gezielt an einen der beiden ersten Antikörper, sodass letztlich die zu untersuchenden Substanzen unter dem Fluoreszenzmikroskop als leuchtende Strukturen sichtbar werden. An welchen Primärantikörper ein Sekundärantikörper bindet, ergibt sich aus der Wirtsspezies, aus welcher der Primärantikörper stammt (z. B. mouse), und der Spezifität des Sekundärantikörpers (z. B. donkey anti-mouse).

Für die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen wurden die Schnitte zunächst mit einem PAP Pen (30) umrandet, um eine hydrophobe Barriere aufzubauen. Daraufhin wurde zuerst 10 %-BSA (bovine serum albumin) (22) gelöst in PBS (phosphate buffered saline) (23) auf die Probe gegeben, um unspezifische Bindungen der Primärantikörper im Gewebe zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgekippt und durch die in 1 %-BSA/PBS (22, 23) mit 0,3 %-Triton (24) verdünnten spezifischen Primärantikörper (1-13) ersetzt. Nachdem die Schnitte über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert worden waren, wurden die Primärantikörper gründlich mit PBS (23) abgewaschen und zuletzt die Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (14-18) in 1 %-BSA/PBS (22, 23) für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur darauf gegeben. Danach wurden die Objektträger ein letztes Mal mit PBS (23) gewaschen, unter Zugabe von Vectashield (25) mit einem Deckglas (29) versehen und mit Deckglaslack (26) versiegelt. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4 °C unter Lichtabschluss.

2.7.3 Durchführung der Fluoreszenz-Mikroskopie

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden anschließend unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops analysiert. Wie unter 2.7.4 näher erläutert wird, wurden die Proben dabei auf gefärbte Nervenfasern durchsucht, Nervenfaserdichten bestimmt und die

Farbintensität fluoreszierender Nervenfasern verglichen. Um quantitative Vergleiche zwischen verschiedenen Proben durchführen zu können, benötigt man die Fläche sowie die Länge der Epidermis des untersuchten Hautabschnittes. Um diese Werte zu ermitteln, wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Axiophot 2 (32, 34) mit SPOT Software (36)) mit 2,5-fach vergrößerndem Objektiv verwendet. Alle weiterführenden Untersuchungen, die auf der Auswertung einzelner Strukturen und Nervenfasern beruhten, wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit CARVII-System (Ax10 (33, 35)) und dem Programm Visiview (37) mit 20-, 40- oder 63-fach vergrößernden Objektiven durchgeführt. Insbesondere zur Bestimmung der Innervation der Schweißdrüsen und der Musculi arrectores pilorum sowie zum Vergleich der Farbintensitäten von Nervenfasern wurden die mit Visiview (37) aufgenommenen Bilder mittels ImageJ (38) weiter analysiert.

2.7.4 Verschiedene Fluoreszenzfärbungen

2.7.4.1 Färbung des Phospho-Alpha-Synucleins

Alle Immunfluoreszenzfärbungen wurden als Doppelfärbung durchgeführt, bei der ein Antikörper gegen phosphoryliertes Alpha-Synuclein (1, 2) mit verschiedenen weiteren Antikörpern (3-13) kombiniert wurde. Für die Färbung des Phospho-Alpha-Synucleins standen je nach Wirtsspezies des anderen Primärantikörpers zwei verschiedene Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörper zur Verfügung (siehe Tabelle 1). Durch die doppelte Färbung konnte die Anzahl der Phospho-Alpha-Synuclein-haltigen Nervenfasern in allen Schnitten bestimmt werden. Außerdem konnten Kollokalisierungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein mit anderen Nervenfasernbestandteilen analysiert sowie ein direkter Vergleich zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern durchgeführt werden.

Alle Doppelfärbungen mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein und PGP9.5-, CGRP-, SP-, TH- bzw. VIP-Antikörpern wurden zur Suche nach Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins verwendet. Dadurch standen pro Biopsie mindestens 3 Schnitte mit 40 µm und

8 Schnitte mit 20 µm Schichtdicke zur Verfügung, wodurch die Sensitivität des Screenings erhöht werden konnte.

Zur standardisierten Quantifizierung der Ablagerungen pro Patient und Biopsieentnahmestelle wurde die Zahl der positiven Nervenfasern pro untersuchter Biopsiefläche bestimmt. Außerdem wurde dokumentiert, in welcher Struktur die Ablagerungen detektiert wurden, also in dermalen Nervenfaserbündeln, um Gefäße oder Schweißdrüsen bzw. sub- oder intraepidermal (siehe 2.7.4.3).

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (mouse) (1)	Cy3 (donkey anti-mouse) (14)
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (rabbit) (2)	Cy3 (donkey anti-rabbit) (15)

Tabelle 1: Antikörper der Färbung des Phospho-Alpha-Synucleins

2.7.4.2 Färbung des axonalen Markers PGP9.5

Durch einen Antikörper gegen den axonalen Marker PGP9.5 (3) wurden alle dermalen und epidermalen Nervenfasern gefärbt. Dadurch war es möglich, die Innervation verschiedener Strukturen der Haut quantitativ zu erfassen.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-PGP9.5 (rabbit) (3)	Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)

Tabelle 2: Antikörper der Färbung des PGP9.5

2.7.4.2.1 Bestimmung der intraepidermalen Nervenfaserdichte

Gemäß den in der Literatur beschriebenen Zählregeln wurde zunächst die intraepidermale Nervenfaserdichte der Hautproben bestimmt, wobei in der Regel der arithmetische Mittelwert aus drei Schnitten gebildet wurde.⁹² Dazu wurde, wie in Abbildung 1 dargestellt, unter Verwendung eines 40-fach vergrößernden Objektivs als Erstes die Zahl der Nervenfasern ermittelt, welche, vom subepidermalen Plexus ausgehend, die Basalmembran

kreuzten. Die sich daraus ergebende Anzahl wurde durch die Länge des untersuchten Epidermis-Abschnittes in mm geteilt, sodass man den Wert der intraepidermalen Nervenfaserdichte in 1/mm erhielt.

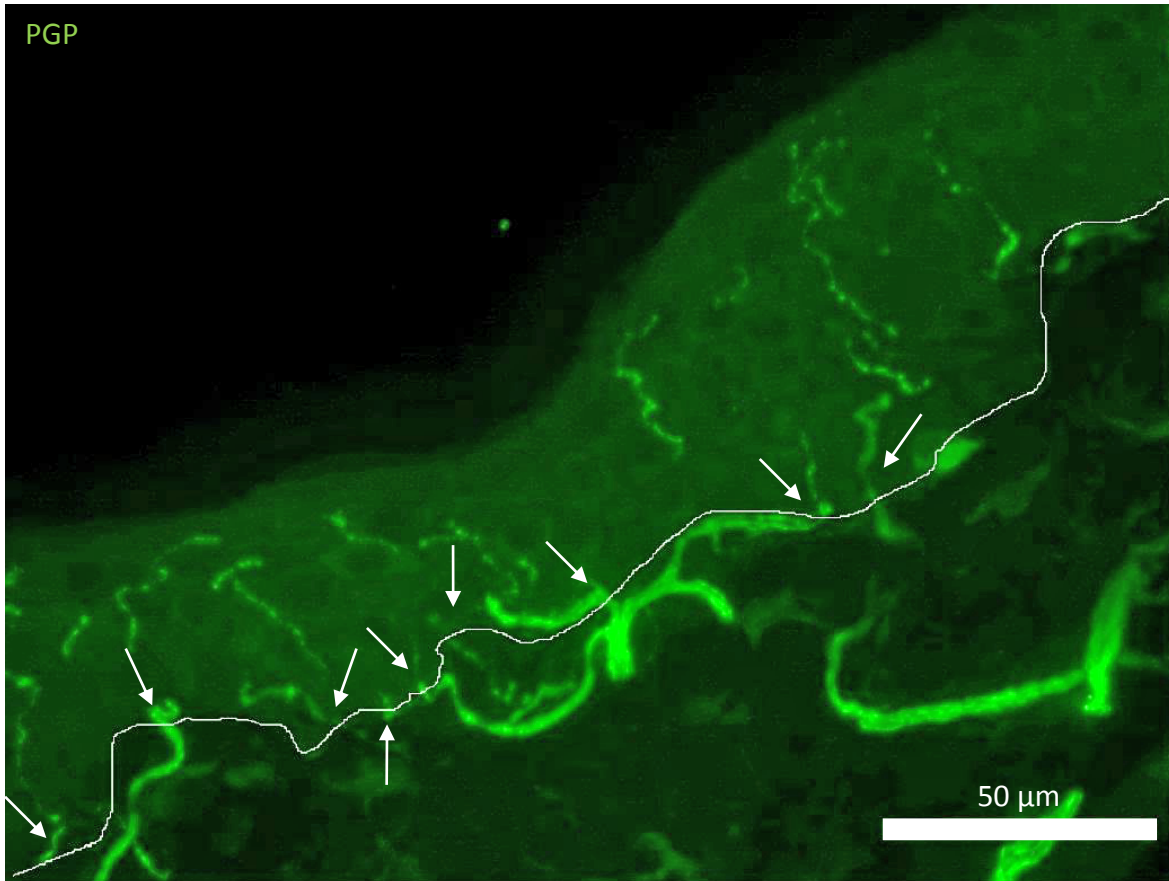


Abbildung 1: Dargestellt ist ein mit einem Antikörper gegen PGP9.5 gefärbter Epidermis-Abschnitt. Man bestimmt die Anzahl der Nervenfasern (weiße Pfeile), welche die Basalmembran (weiße Linie) kreuzen, und berechnet daraus die intraepidermale Nervenfaserdichte.

2.7.4.2.2 Bestimmung der Innervation der Schweißdrüsen

Zur quantitativen Analyse der Schweißdrüsen-Innervation wurden mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv mittels der Z-Series-Funktion von Visiview Schichtbilder von Schweißdrüsen aufgenommen. Diese wurden in ImageJ zu Bildern mit maximaler Intensität überlagert (siehe Abbildung 2). Daraufhin wurde der Bereich der Schweißdrüse freihändig umrandet und über den voreingestellten Schwellenwert in ImageJ die am stärksten

gefärbten Areale markiert. Auf diese Weise konnte der Anteil der gefärbten Fläche am Schweißdrüsenareal in Prozent bestimmt und so interindividuelle Unterschiede der Faserdichte um Schweißdrüsen untersucht werden.

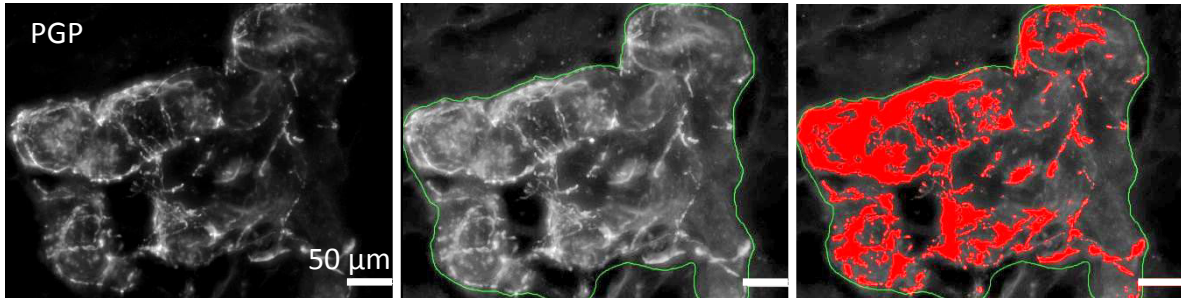


Abbildung 2: Abgebildet ist ein mit einem Antikörper gegen PGP9.5 gefärbter Schweißdrüsen-Ausschnitt. Die aufgenommenen Schichtbilder wurden dafür zu einem Bild mit maximaler Intensität überlagert (linkes Bild). Im nächsten Schritt wurde die Fläche der Schweißdrüse freihändig mit einer grünen Linie umrandet (mittleres Bild). Zuletzt wurden die Areale, deren Intensität über dem voreingestellten Schwellenwert lag, rot markiert (rechtes Bild). Der Anteil der gefärbten Areale an der Schweißdrüsenfläche diente als Maß für die Innervation der Schweißdrüsen.

2.7.4.2.3 Bestimmung der Innervation der Musculi arrectores pilorum

Schließlich wurde nach einem von Nolano et al. beschriebenen Verfahren die Dichte der Musculus arrector pili-Innervation (Innervation der Haarbalgmuskeln) ermittelt.⁹³ Hierfür wurden mit einem 20-fach vergrößernden Objektiv aufgenommene Schichtbilder von parallel zur Schnittebene verlaufenden Arrector pili-Muskeln verwendet (siehe Abbildung 3). In ImageJ wurde eine auf der Faserrichtung senkrecht stehende Linie eingefügt und die Zahl der Nervenfasern, welche diese Linie schneiden, in der obersten, mittleren und untersten Schnittebene bestimmt. Der daraus berechnete arithmetische Mittelwert wurde durch die Länge der Linie (Breite des Muskels an dieser Stelle) geteilt, sodass man den Wert der pilomotorischen Nervenfaserdichte in 1/mm erhielt.

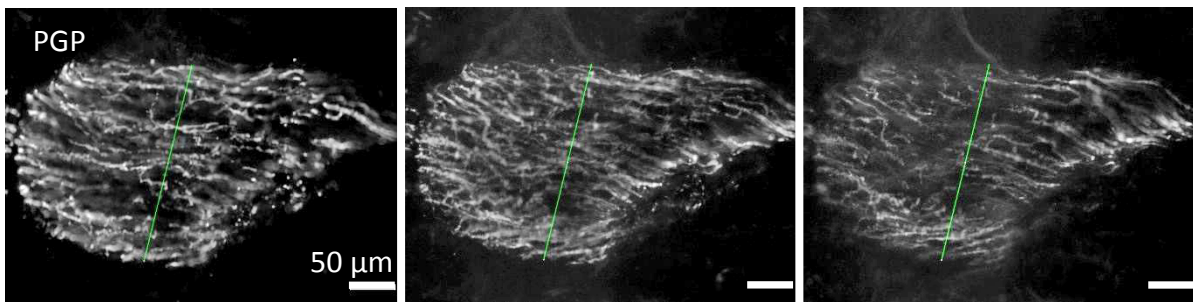


Abbildung 3: Die Abbildungen zeigen von links nach rechts die oberste, die mittlere und die unterste Schnittebene eines mit einem Antikörper gegen PGP9.5 gefärbten Ausschnittes eines Musculus arrector pili. Die Zahl der Nervenfasern, welche die eingezeichnete, grüne Linie schneiden, dividiert durch die Länge der Linie, wurde als Maß für die Innervation der Musculi arrectores pilorum verwendet.

2.7.4.3 Färbung von Nervenfasersubtypen

Zur Untersuchung der Nervenfasersubtypen wurden Färbungen mit gegen CGRP, SP, TH und VIP gerichteten Antikörpern (4-7) vorgenommen. Unter dem Mikroskop wurde mit einem 40-fach vergrößernden Objektiv bestimmt, in welchen Strukturen der Haut Phospho-Alpha-Synuclein-positive Fasern zu finden waren sowie welcher Anteil der Ablagerungen innerhalb von Fasern eines bestimmten Subtyps lokalisiert war (siehe Abbildung 4).

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-Alpha-CGRP (rabbit) (4)	Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)
Anti-SP (rabbit) (5)	Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)
Anti-TH (guinea pig) (6)	Alexa Fluor (goat anti-guinea pig) (17)
Anti-VIP (rabbit) (7)	Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)

Tabelle 3: Antikörper der Färbung der Nervenfasersubtypen

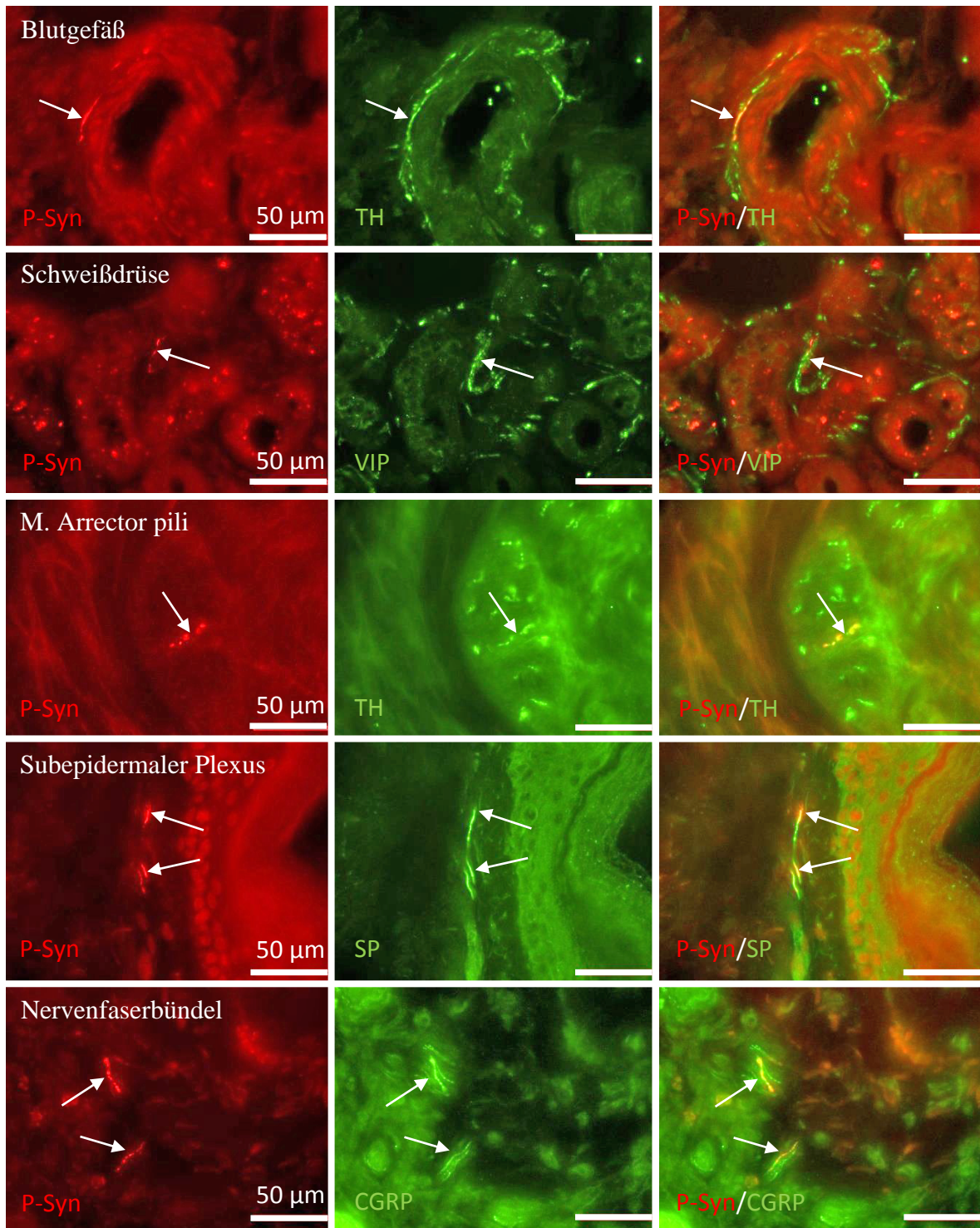


Abbildung 4: Dargestellt sind mit einem Antikörper gegen Phospho-Alpha-Synuclein sowie Antikörpern gegen CGRP, SP, TH und VIP gefärbte Ausschnitte verschiedener dermaler Strukturen. Die weißen Pfeile markieren Kolokalisationen von Phospho-Alpha-Synuclein und den

einzelnen Nervenfasersubtypen innerhalb eines Blutgefäßes, einer Schweißdrüse, eines Musculus arrector pili, im subepidermalen Plexus sowie in einem Nervenfaserbündel.

2.7.4.4 Färbung von axonalen Transportproteinen

An Schnitten von Hautproben, in denen Phospho-Alpha-Synuclein nachweisbar war, wurden zusätzlich Immunfluoreszenzfärbungen von axonalen Transportproteinen, Mikrotubuli und Mitochondrien durchgeführt, um die Auswirkungen solcher Ablagerungen auf die genannten Strukturen in Nervenfasern der Haut zu untersuchen.

Zunächst wurden dafür mithilfe von Antikörpern gegen Mitglieder der Dynein- bzw. Kinesin-Motorproteinfamilie die Nervenfasern je nach Gehalt an den spezifischen Proteinen mit unterschiedlicher Intensität gefärbt. Hierfür wurde ein Antikörper gegen eine Dynein-Leichtkette (DYNLT3) (8) verwendet, welche zusammen mit DYNLT1 die Bindung des Dynein-Komplexes an spezifische Lasten vermittelt.⁹⁴ Als Vertreter der Kinesin-Motorproteinfamilie wurde ein Antikörper gegen eine Kinesin-Schwerkette (KIF5A) (9) eingesetzt, welche einen Teil der eigentlichen Motor-Domäne des Kinesin-Komplexes darstellt.⁹⁵

In dermalen Nervenfaserbündeln, in denen Phospho-Alpha-Synuclein-positive und -negative Fasern nebeneinander lagen, konnte nun die Intensität der Färbung von DYNLT3 und KIF5A in den Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern direkt verglichen werden. Dazu wurde mit einem 63-fach vergrößernden Objektiv je ein Bild des Nervenfaserbündels in der Phospho-Alpha-Synuclein-Färbung und der Dynein- bzw. Kinesin-Färbung aufgenommen (siehe Abbildung 5). Dann wurde in ImageJ anhand des Bildes, in der die Färbung des phosphorylierten Alpha-Synucleins dargestellt war, die Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Nervenfasern bestimmt. In dem entsprechenden Bild, mit der Färbung der axonalen Motorproteine, wurde schließlich die Intensität der Fluoreszenzfärbung an der ermittelten Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Nervenfasern sowie zweier umliegender Kontrollpunkte ermittelt, bei denen man davon ausgehen konnte, dass sie innerhalb des Nervenfaserbündels und somit auf Phospho-Alpha-Synuclein-negativen Nervenfasern lagen. Die Intensität wurde dabei

über Graustufen bestimmt, welche bei den verwendeten 16-Bit-Grauwertbildern anhand eines automatisch ausgewählten Intensitätsfensters dargestellt wurden, wobei Weiß dem maximalen und Schwarz dem minimalen Intensitätswert entspricht.

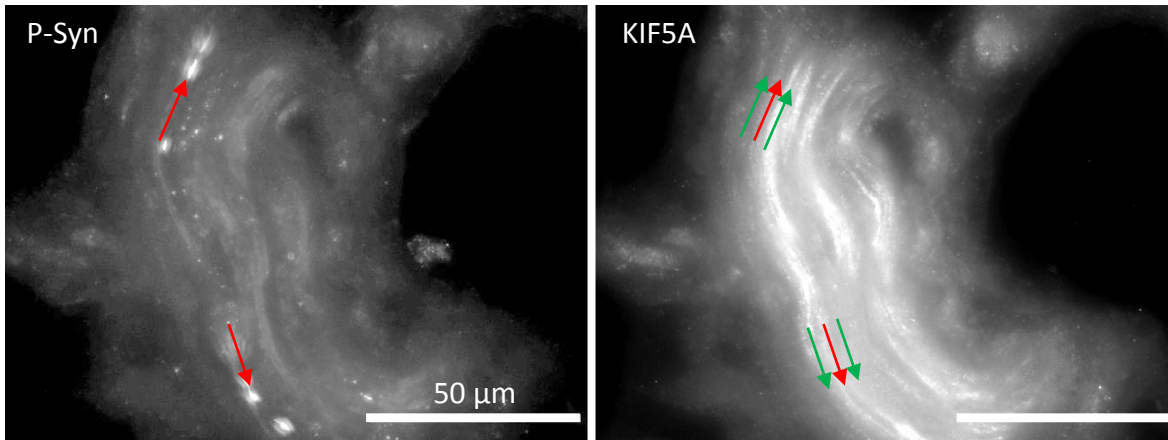


Abbildung 5: Die Abbildungen zeigen einen mit einem Antikörper gegen Phospho-Alpha-Synuclein (linkes Bild) sowie KIF5A (rechtes Bild) gefärbten Ausschnitt eines Nervenfaserbündels. Die roten Pfeile deuten auf Phospho-Alpha-Synuclein-positive Nervenfasern. Die grünen Pfeile zeigen auf umliegende Kontrollpunkte, die Phospho-Alpha-Synuclein-negativen Nervenfasern entsprechen. Anhand der Graustufen an den markierten Punkten konnten Intensitätsunterschiede zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Nervenfasern bestimmt werden.

Primärantikörper

Anti-DYNLT3 (rabbit) (8)

Anti-KIF5A (rabbit) (9)

Sekundärantikörper

Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)

Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)

Tabelle 4: Antikörper der Färbung der axonalen Transportproteine

2.7.4.5 Färbung von Mikrotubuli

Um nach Unterschieden zwischen der Mikrotubuli-Struktur in Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Nervenfasern zu suchen, wurden Antikörper gegen Tubuline mit unterschiedlichen posttranslationalen Modifikationen verwendet. Dazu gehörten Antikörper gegen eher stabile Tubuline, wie die acetylierte und detyrosinierte Form, sowie gegen das

eher dynamische tyrosinierte Tubulin (10-12).^{67,69} Im Gegensatz zur Analyse der axonalen Transportproteine und der Mitochondrien wurden hier die Farbintensitäten jedoch nur qualitativ direkt unter dem Mikroskop verglichen.

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-Acetylated Tubulin (mouse) (10)	Alexa Fluor (donkey anti-mouse) (18)
Anti-Detyrosinated Tubulin (rabbit) (11)	Alexa Fluor (donkey anti-rabbit) (16)
Anti-Tyrosine Tubulin (mouse) (12)	Alexa Fluor (donkey anti-mouse) (18)

Tabelle 5: Antikörper der Färbung der Mikrotubuli

2.7.4.6 Färbung von Mitochondrien

Schließlich wurde noch ein Antikörper gegen einen Teil des katalytischen Kerns der Cytochrom-c-Oxidase, also des Komplexes IV der mitochondrialen Atmungskette, (MTCO1) (13) eingesetzt, um die Einflüsse von Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins auf Mitochondrien zu untersuchen.⁹⁶ Dafür wurden, wie bei den axonalen Transportproteinen beschrieben, Intensitätsunterschiede zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern in dermalen Nervenfaserbündeln analysiert (siehe 2.7.4.4).

Primärantikörper	Sekundärantikörper
Anti-MTCO1 (mouse) (13)	Alexa Fluor (donkey anti-mouse) (18)

Tabelle 6: Antikörper der Färbung der Mitochondrien

2.8 Fallzahlplanung und statistische Auswertung

Die Fallzahlplanung wurde mit dem Programm GPower 3.1 (39) durchgeführt. Sie basierte auf der primären Fragestellung, ob sich zwischen Fasern mit und ohne Ablagerung von phosphoryliertem Alpha-Synuclein Unterschiede in der Intensität der Färbung zeigen. Auf der Grundlage von Studien am zentralen Nervensystem wurde von einer Effektgröße von

0,67 ausgegangen. Für eine Power von 0,9 und ein Signifikanzniveau von 0,05 ergibt sich eine notwendige Anzahl an ausgewerteten Fasern von 51 pro Gruppe, d.h. je 51 Phospho-Alpha-Synuclein-positive und -negative Fasern. Aus Erfahrungen von früheren Studien gingen wir von einer Rate an positiven Biopsaten von mindestens 50 % aus, sodass sich unter der Annahme einer durchschnittlichen Anzahl von 3 bis 4 positiven Fasern pro positiver Biopsie eine benötigte Fallzahl von 30 Patienten ergibt. Da sich zum Teil erst im Verlauf eine sichere Einordnung in die Kategorien „idiopathischer M. Parkinson“ und „atypisches Parkinson-Syndrom“ ergab, weichen die tatsächlich rekrutierten Zahlen leicht ab. Jedoch zeigte sich eine höhere Anzahl an positiven Nervenfasern insgesamt, sodass mehr positive Fasern ausgewertet werden konnten, als in der Fallzahlplanung als Mindestmenge veranschlagt.

Zur statistischen Analyse der gewonnenen Daten wurde die Software SPSS Statistics 21 (40) verwendet. Mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden die Datensätze zunächst auf Normalverteilung geprüft. Aufgrund der Tatsache, dass die meisten Variablen diese Bedingung nicht erfüllten, wurde in der Auswertung der Median, statt des Mittelwertes verwendet. Entsprechend kam beim Vergleich zweier Variablen der Mann-Whitney-U-Test, bei mehreren Gruppen hingegen der Kruskal-Wallis-Test zur Anwendung. Um Trends und Beziehungen zu ermitteln, wurde die Spearman-Korrelation (Korrelationskoeffizient ρ) herangezogen. Kategoriale Daten wurden anhand von Kreuztabellen und des exakten Tests nach Fisher ausgewertet. Häufigkeiten verschiedener Merkmale innerhalb mehrerer Gruppen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson miteinander verglichen. Zur Auswertung der QST wurden aus den log-transformierten Daten ermittelte Z-Scores herangezogen, bei denen ein Z-Score von 1 einer Abweichung der Testwerte von den Kontrollwerten um eine Standardabweichung entspricht.⁹⁷ Die Relevanz der ermittelten Z-Scores wurde mithilfe eines t-Tests überprüft.⁹⁷ Einfluss- und Störfaktoren wurden durch die sorgfältige Auswahl der Studienteilnehmer minimiert. War dies jedoch nicht ausreichend möglich, wie zum Beispiel im Hinblick auf Unterschiede in der Geschlechterverteilung zwischen den untersuchten Gruppen, so wurden die entsprechenden Einflussfaktoren mithilfe der Kovarianzanalyse (ANCOVA) auf Relevanz überprüft.

2.9 Material

Im Anschluss sind die in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper, Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Geräte sowie die Software aufgeführt.

2.9.1 Antikörper

2.9.1.1 Primärantikörper

	Antikörper	Details	Hersteller
(1)	Anti-Phospho-Alpha-Synuclein	mouse, 1:500	Covance, Princeton, New Jersey, USA
(2)	Anti-Phospho-Alpha-Synuclein	rabbit, 1:500	Abcam, Cambridge, UK
(3)	Anti-PGP9.5	rabbit, 1:1000	Ultraclone, Isle of Wight, UK
(4)	Anti-Alpha-CGRP	rabbit, 1:500	Peninsula Laboratories, San Carlos, Kalifornien, USA
(5)	Anti-SP	rabbit, 1:100	Immunostar, Hudson, Wisconsin, USA
(6)	Anti-TH	guinea pig, 1:200	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
(7)	Anti-VIP	rabbit, 1:1000	Peninsula Laboratories, San Carlos, Kalifornien, USA
(8)	Anti-DYNLT3	rabbit, 1:100	Abcam, Cambridge, UK
(9)	Anti-KIF5A	rabbit, 1:50	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

(10)	Anti-Acetylated Tubulin	mouse, 1:1000	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
(11)	Anti-Detyrosinated Tubulin	rabbit, 1:200	Millipore, Temecula, Kalifornien, USA
(12)	Anti-Tyrosine Tubulin	mouse, 1:100	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
(13)	Anti-MTCO1	mouse, 1:500	Abcam, Cambridge, UK

Tabelle 7: Primärantikörper

2.9.1.2 Sekundärantikörper

	Antikörper	Details	Hersteller
(14)	Cy3	donkey anti-mouse, 1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
(15)	Cy3	donkey anti-rabbit, 1:100	Dianova, Hamburg, Deutschland
(16)	Alexa Fluor	donkey anti-rabbit, 1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland
(17)	Alexa Fluor	goat anti-guinea pig, 1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland
(18)	Alexa Fluor	donkey anti-mouse, 1:400	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tabelle 8: Sekundärantikörper

2.9.2 Reagenzien

Reagenz	Details	Hersteller
(19) PFA	Paraformaldehyd in Phosphatpuffer, 4 %	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
(20) Phosphatpuffer	di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat mit Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat, 0,1 M	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
(21) Saccharose	Saccharose in Phosphatpuffer, 10 %	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
(22) BSA	Rinderserumalbumin	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
(23) PBS	0,1 M	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
(24) Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenylpolyethylene glycol	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
(25) Vectashield	Eindeckmedium mit DAPI	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
(26) Deckglaslack	CoverGrip Coverslip Sealant	Biotium, Hayward, Kalifornien, USA

Tabelle 9: Reagenzien

2.9.3 Verbrauchsmaterialien

	Verbrauchsmaterial	Details	Hersteller
(27)	Hautstanze	5 mm	Stiefel Laboratorium, Offenbach am Main, Deutschland
(28)	Objektträger	/	R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
(29)	Deckgläser	/	R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
(30)	PAP Pen	/	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

2.9.4 Geräte

	Gerät	Details	Hersteller
(31)	Instrumente für die QST	/	Somedic, Hörby, Schweden
(32)	Fluoreszenzmikroskop	Axiophot 2	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
(33)	Fluoreszenzmikroskop	Ax10	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
(34)	Kamera zu Axiophot 2	Axiocam MRm	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
(35)	Kamera zu Ax10	CARVII-system	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Tabelle 11: Geräte

2.9.5 Software

Software	Details	Hersteller
(36) SPOT	/	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, Michigan, USA
(37) Visiview	/	Visitron GmbH, Puchheim, Deutschland
(38) ImageJ 1.48v	Bildbearbeitung und Bildverarbeitung	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
(39) GPower 3.1	Statistik	Universität Düsseldorf, Deutschland
(40) SPSS Statistics 21	Statistik	IBM, Ehningen, Deutschland

Tabelle 12: Software

3 Ergebnisse

3.1 Studienteilnehmer

3.1.1 Gruppen-Matching

3.1.1.1 Altersverteilung

Um eine möglichst repräsentative Kontrollgruppe zu erhalten, wurde bei der Auswahl eine ähnliche Verteilung hinsichtlich des Alters und des Geschlechts gegenüber dem Patientenkollektiv angestrebt.

Dementsprechend wurden nur Kontrollpersonen, die über 45 Jahre alt waren, in die Statistik aufgenommen. Zwar war die Altersverteilung im Kruskal-Wallis-Test selbst dann noch signifikant verschieden ($p < 0,05$), jedoch waren beim paarweisen Vergleich der einzelnen Gruppen keine Unterschiede erkennbar.

	Alter
M. Parkinson (N = 92)	66 (34-88) Jahre
MSA (N = 12)	71 (52-75) Jahre
Tauopathie (N = 13)	67 (60-75) Jahre
Kontrollen (N = 73)	61 (46-80) Jahre
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	$p < 0,05$

Tabelle 13: Altersmediane (mit Minimum und Maximum) der Studienteilnehmer (N ist die Anzahl der untersuchten Personen)

3.1.1.2 Geschlechterverteilung

In Bezug auf die Geschlechterverteilung ließ sich das Matching jedoch nicht so gut realisieren. Während bei den Patienten mit Morbus Parkinson sowie bei den Tauopathien

deutlich mehr Männer als Frauen an der Studie teilnahmen, war das Verhältnis bei den MSA-Patienten sowie bei den Kontrollpersonen eher ausgeglichen, sodass der Chi-Quadrat-Test nach Pearson signifikante Gruppenunterschiede aufzeigte ($p < 0,01$).

Da jedoch bekannt ist, dass es zwischen den Geschlechtern Unterschiede hinsichtlich der Nervenfaserdichte und der Nervenfunktion geben kann, welche unter anderem auch in geschlechtsspezifischen Normdaten für die intraepidermale Nervenfaserdichte und die QST zum Ausdruck kommen,^{51,97,98} wurde im Folgenden mithilfe der ANCOVA die tatsächliche Relevanz für die jeweiligen Untersuchungen einzeln geprüft oder, wie im Falle der QST, eine alters- und geschlechtsadaptierte Kontrollgruppe aus der Datenbank der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg herangezogen.

	männlich	weiblich
M. Parkinson	71 % (65/92)	29 % (27/92)
MSA	42 % (5/12)	58 % (7/12)
Tauopathie	77 % (10/13)	23 % (3/13)
Kontrollen	47 % (34/73)	53 % (39/73)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	$p < 0,01$	

Tabelle 14: Geschlechterverteilung der Studienteilnehmer

3.1.2 Krankheitsstadien nach Hoehn und Yahr

Die Hoehn-und-Yahr-Stadien waren bei den Patienten recht gleichmäßig verteilt, wobei das mediane Krankheitsstadium bei den Patienten mit MSA mit 4 (3-5) tendenziell etwas höher war als bei den Patienten mit Morbus Parkinson mit 3 (1-5) oder den Patienten mit einer Tauopathie mit 3 (2-5).

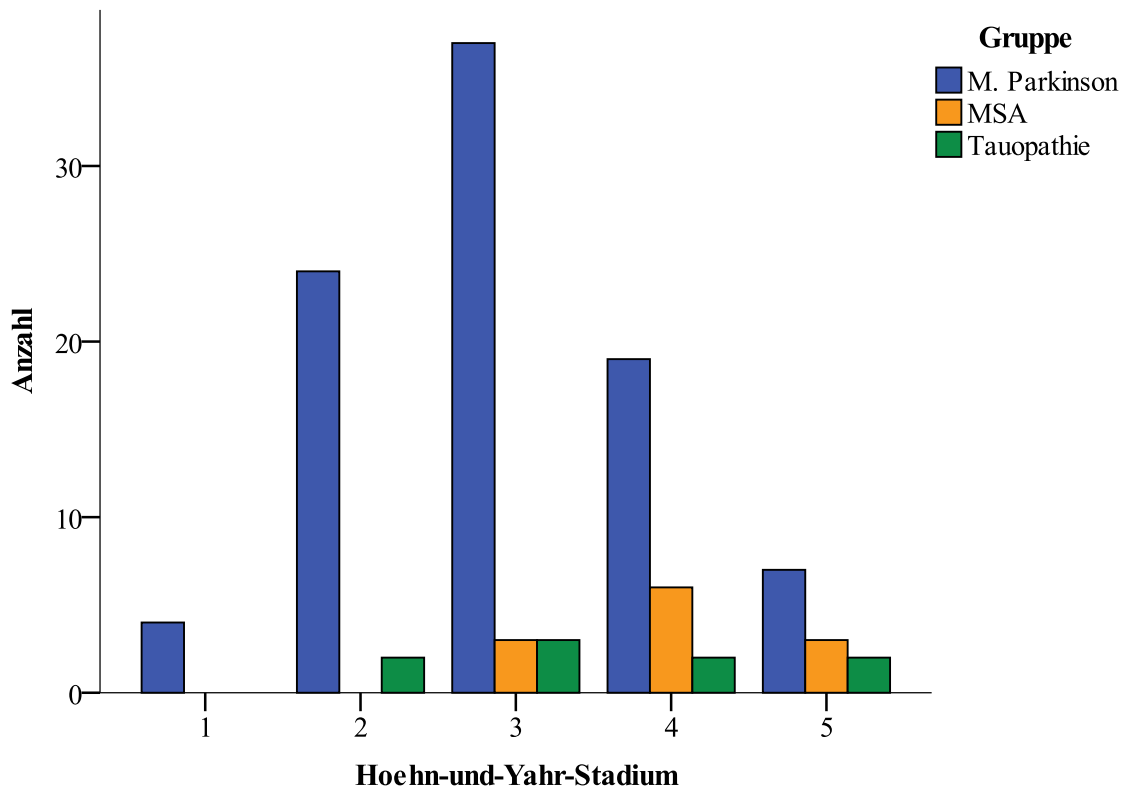


Diagramm 1: Verteilung der Hoehn-und-Yahr-Stadien innerhalb der verschiedenen Gruppen

	1	2	3	4	5
M. Parkinson	4 % (4/91)	26 % (24/91)	41 % (37/91)	21 % (19/91)	8 % (7/91)
MSA	0 % (0/12)	0 % (0/12)	25 % (3/12)	50 % (6/12)	25 % (3/12)
Tauopathie	0 % (0/9)	22 % (2/9)	33 % (3/9)	22 % (2/9)	22 % (2/9)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	nicht signifikant				

Tabelle 15: Verteilung der Hoehn-und-Yahr-Stadien innerhalb der verschiedenen Gruppen

3.1.3 Krankheitsdauer

Die Krankheitsdauer der einzelnen Patientengruppen, das heißt der Zeitraum zwischen der Erstmanifestation und dem Untersuchungsjahr, verhielt sich jedoch anders als die Verteilung der Krankheitsstadien. Diese war bei den idiopathischen Parkinson-Patienten im Median 11 Jahre (1-40 Jahre), während sie bei den Patienten mit MSA nur 5 Jahre (1-12 Jahre) und bei den Patienten mit einer Tauopathie gerade einmal 3 Jahre (1-12 Jahre) betrug ($p < 0,001$ im Kruskal-Wallis-Test), was den rascheren Progress der atypischen Parkinsonsyndrome widerspiegelt.

3.2 Auswertung der Fragebögen

3.2.1 Vergleich zwischen den Patientengruppen

In der UPDRS waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen erkennbar. Auch die motorische Untersuchung des dritten Abschnittes des UPDRS-Fragebogens (UPDRS 3) sowie die NMS zeigten ähnliche Ergebnisse.

	UPDRS	UPDRS 3	NMS
M. Parkinson (N = 88/58/91)	57 (9-173)	33 (3-102)	45 (5-209)
MSA (N = 10/6/12)	63 (30-159)	41 (23-66)	73 (38-190)
Tauopathie (N = 6/4/8)	53 (15-109)	32 (23-50)	61 (13-102)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 16: Mediane (mit Minimum und Maximum) der Ergebnisse in den Fragebögen der UPDRS, der UPDRS 3 und der NMS (N ist die Anzahl der untersuchten Patienten)

3.2.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Die Ergebnisse in den Fragebögen der UPDRS ($p < 0,001$; $\rho = 0,52$), der UPDRS 3 ($p < 0,01$; $\rho = 0,36$) und der NMS ($p < 0,001$; $\rho = 0,41$) wiesen eine signifikante positive

Spearman-Korrelation zum Hoehn-und-Yahr-Stadium auf. Dieser Zusammenhang blieb auch nach Prüfung auf einen möglichen Alterseffekt in der ANCOVA erhalten (UPDRS: $p < 0,001$; UPDRS 3: $p < 0,05$; NMS: $p < 0,001$). Insgesamt war folglich ein höheres Krankheitsstadium nicht nur mit starken motorischen, sondern auch mit deutlichen nicht-motorischen Einschränkungen verbunden. Eine negative Korrelation der UPDRS 3 zur Erkrankungsdauer ($p < 0,05$; $\rho = -0,27$) erwies sich hingegen in der ANCOVA mit dem Alter als Störvariable als nicht signifikant

3.3 Auswertung der Vitaminbestimmungen

3.3.1 Normabweichungen der Vitaminspiegel

Einige Patienten wiesen Abweichungen ihrer Vitamin B6-, Vitamin B12-, Folsäure-, Homocystein- oder Methylmalonsäure-Werte von den Normwerten auf, welche mit dem Vorliegen oder der Entwicklung einer Polyneuropathie in Zusammenhang stehen könnten.

	Vitamin B6 ($< 3,6$ ng/ml)	Vitamin B12 (< 197 pg/ml)	Folsäure (< 2 ng/ml)	Homo- cystein (> 14 μ mol/l)	Methyl- malonsäure (> 32 μ g/l)
M. Parkinson	15 % (9/59)	3 % (2/69)	0 % (0/67)	56 % (33/59)	25 % (14/57)
MSA	0 % (0/6)	0 % (0/8)	0 % (0/8)	40 % (2/5)	0 % (0/6)
Tauopathie	33 % (1/3)	0 % (0/6)	0 % (0/6)	33 % (1/3)	50 % (2/4)

Tabelle 17: Abweichungen der Vitaminspiegel in den verschiedenen Patientengruppen

3.3.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Der Vitamin B6-Spiegel zeigte eine negative Spearman-Korrelation zur Krankheitsdauer ($p < 0,05$; $\rho = -0,29$) und der Homocystein-Spiegel stieg mit zunehmendem Hoehn-und-Yahr-Stadium signifikant an ($p < 0,05$; $\rho = 0,26$). Allerdings war der Wert des Homocysteins auch abhängig vom Alter der Patienten, sodass in der ANCOVA, in der das

Alter als Störvariable heraus gerechnet wurde, nur noch die Korrelation der Erkrankungsdauer mit dem Vitamin B6-Spiegel signifikant war ($p < 0,05$).

3.3.3 Zusammenhang mit der Nervenfunktion und der Nervendichte

In der Suralis-Neurographie konnte für den Homocystein-Spiegel eine negative Spearman-Korrelation in Bezug auf die Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials verzeichnet werden ($p < 0,05$; $\rho = -0,28$), nicht jedoch für die anderen Werte. In der QST war außerdem eine signifikante positive Spearman-Korrelation zwischen Homocystein und der Wärme-wahrnehmungsschwelle (WDT) ($p < 0,05$; $\rho = 0,35$) sowie der thermischen Unterschiedsschwelle (TSL) ($p < 0,05$; $\rho = 0,34$) an der Wange erkennbar. Eine positive Spearman-Korrelation zur Druckschmerzschwelle (PPT) im Gesicht fand sich für den Methylmalonsäure-Spiegel ($p < 0,05$; $\rho = 0,41$). Zwischen der intraepidermalen Nerven-faserdichte sowie der Schweißdrüsen- und Musculus arrector pili-Innervation und den Vitaminspiegeln war kein Zusammenhang feststellbar.

3.4 Einflüsse einer Therapie mit L-Dopa

3.4.1 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Weder das Hoehn-und-Yahr-Stadium noch das Alter der Patienten korrelierte mit der kumulativen L-Dopa-Dosis, welche die Teilnehmer zum Studienzeitpunkt eingenommen hatten. Allerdings zeigte die Erkrankungsdauer eine starke Spearman-Korrelation zu der bereits stattgefundenen L-Dopa-Therapie ($p < 0,001$; $\rho = 0,67$). Aufgrund dieses Zusammenhanges war es nahezu unmöglich zu unterscheiden, ob es sich bei den im Folgenden dargestellten Veränderungen um einen Therapieeffekt oder um einen krankheitseigenen Prozess handelt.

3.4.2 Einfluss auf die Vitaminspiegel

Mögliche Hinweise auf eine Abhängigkeit der zuvor genannten Vitaminspiegel von der kumulativen L-Dopa-Dosis, wie sie in der Literatur beschrieben wurde,^{42,46-49} konnten für Vitamin B6 ($p < 0,001$; $\rho = -0,53$) und Homocystein ($p < 0,05$; $\rho = 0,38$) ermittelt werden.

3.4.3 Einfluss auf die Nervenfunktion und die Nervendichte

In der QST waren einige Schwellenwerte der mechanischen Berührungs- und Schmerz-wahrnehmung bei vermehrter L-Dopa Therapie erhöht (MDT (Wange): $p < 0,01$; $\rho = 0,35$; MPS (Fuß): $p < 0,05$; $\rho = 0,30$; MPS (Wange): $p < 0,05$; $\rho = 0,27$) und die Innervation der Arrector pili-Muskeln am Unterschenkel erschien reduziert ($p < 0,05$; $\rho = -0,34$). Eine Korrelation der Therapie mit L-Dopa zu den Parametern der Suralis-Neurographie, der intraepidermalen Nervenfaserdichte sowie der Innervation der Schweißdrüsen zeigte sich nicht.

3.4.4 Einfluss auf die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Die Menge an Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins ließ eine negative Spearman-Korrelation zur kumulativen L-Dopa-Dosis erkennen ($p < 0,05$; $\rho = -0,37$).

3.5 Auswertung der sensiblen Neurographie des Nervus suralis

3.5.1 Vergleich zwischen den Patientengruppen

In der Suralis-Neurographie ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Patientengruppen feststellen. Die medianen Nervenleitgeschwindigkeiten sowie die Amplituden des sensiblen Nervenaktionspotenzials lagen hierbei für alle Gruppen im altersentsprechenden Normbereich.

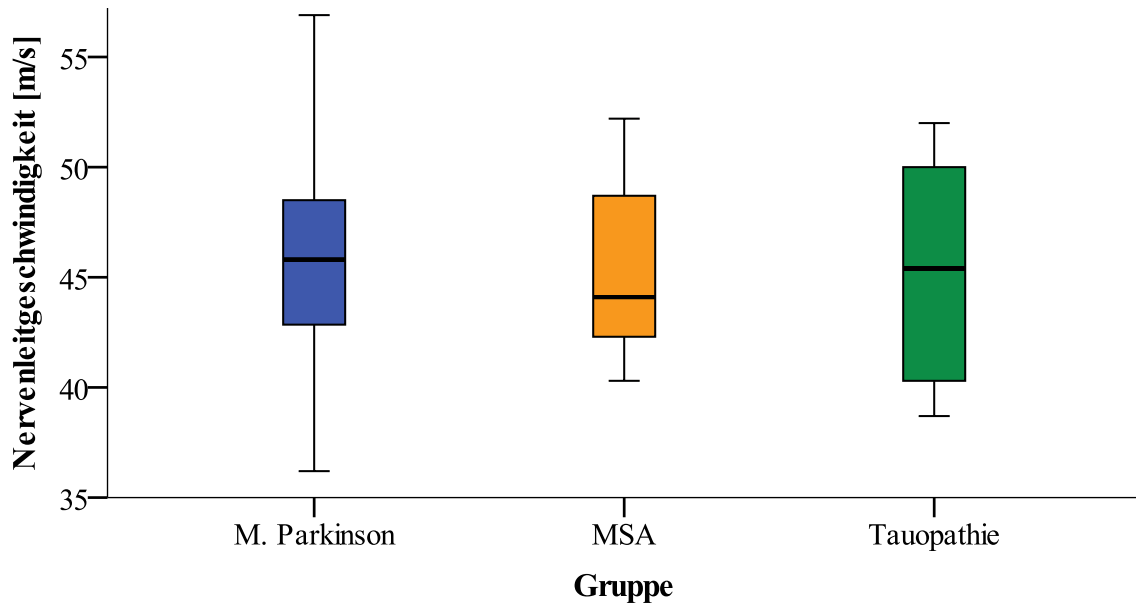


Diagramm 2: Vergleich der Nervenleitgeschwindigkeit in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis zwischen den verschiedenen Patientengruppen
(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

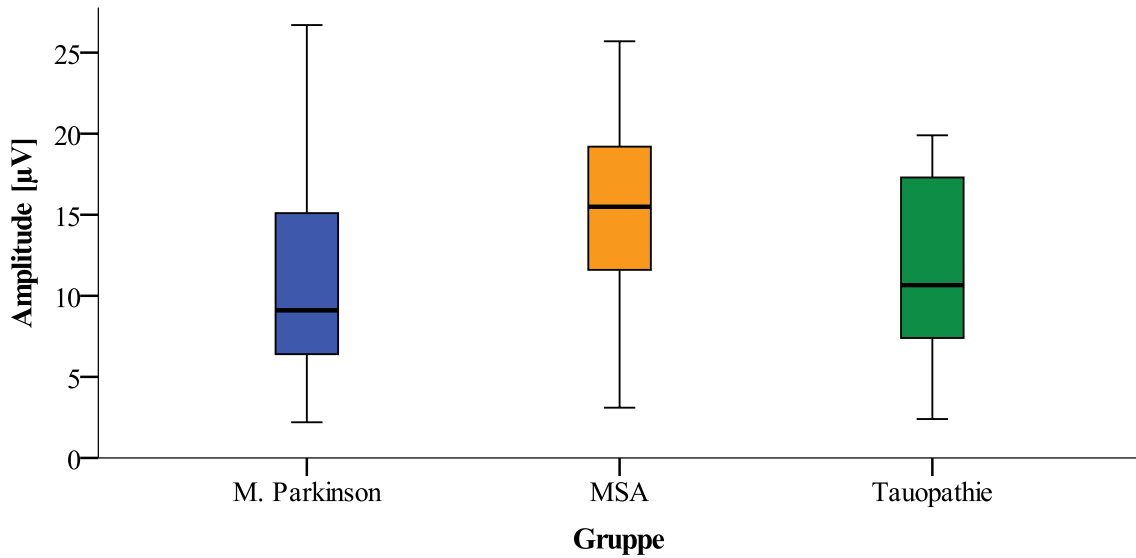


Diagramm 3: Vergleich der Amplitude in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis zwischen den verschiedenen Patientengruppen
(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	Nervenleitgeschwindigkeit	Amplitude
M. Parkinson (N = 72)	45,8 m/s (36,2-59,4 m/s)	9,1 μ V (2,2-38,6 μ V)
MSA (N = 9)	44,1 m/s (40,3-52,2 m/s)	15,5 μ V (3,1-25,7 μ V)
Tauopathie (N = 9/10)	45,4 m/s (38,7-52,0 m/s)	10,7 μ V (2,4-32,3 μ V)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 18: Mediane (mit Minimum und Maximum) der Nervenleitgeschwindigkeit und der Amplitude des Nervenaktionspotenzials in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis (N ist die Anzahl der untersuchten Patienten)

3.5.2 Hinweise auf Nervenleitungsstörungen

Auch der Anteil von der Norm abweichender Werte der Nervenleitgeschwindigkeit bzw. der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials war bei den untersuchten Patientengruppen nicht signifikant unterschiedlich.

	Nervenleitgeschwindigkeit reduziert	Amplitude reduziert
M. Parkinson	11 % (8/72)	32 % (23/72)
MSA	0 % (0/9)	22 % (2/9)
Tauopathie	11 % (1/9)	30 % (3/10)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 19: Hinweise auf Nervenleitungsstörungen in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis in den verschiedenen Patientengruppen

3.5.3 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Die Amplitude des Nervenaktionspotenzials zeigte im Gegensatz zur Nervenleitgeschwindigkeit eine signifikante negative Spearman-Korrelation zur Krankheitsdauer ($p < 0,05$; $\rho = -0,22$) und dem Hoehn-und-Yahr-Stadium ($p < 0,05$; $\rho = -0,23$). Allerdings konnte auch eine signifikante negative Spearman-Korrelation der Amplitude des Nerven-

aktionspotenzials zum Alter der untersuchten Personen festgestellt werden ($p < 0,01$; $\rho = -0,34$), sodass der Zusammenhang der Amplitude mit dem Krankheitsstadium und der Erkrankungsdauer in der ANCOVA nicht erhalten blieb.

3.5.4 Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Die Werte in der Suralis-Neurographie waren unabhängig von dem Vorhandensein bzw. der Menge an Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins in den kleinen Nervenfasern der Haut.

3.6 Auswertung der QST

3.6.1 Auswertung der Daten der einzelnen Patientengruppen

In der QST konnten sowohl für die Patienten mit Morbus Parkinson als auch für die Patienten mit MSA bzw. einer Tauopathie Abweichungen von der Kontrollgruppe festgestellt werden.

3.6.1.1 Patienten mit Morbus Parkinson

Während die Parkinson-Patienten für Kälteschmerz (CPT) empfindlicher waren, war dies im Hinblick auf die Hitzeschmerzschwelle (HPT) genau umgekehrt. Darüber hinaus war ihre Berührungsempfindlichkeit (MDT) zwar geringer, doch waren sie insgesamt empfindlicher gegenüber mechanischen Schmerzreizen (MPT und MPS). Das Vibrationsempfinden (VDT) war an beiden Untersuchungsarealen signifikant eingeschränkt. Dagegen werteten sie Druck an der Wange schneller als die Kontrollpersonen als unangenehm (PPT).

Insgesamt war somit die sensible Wahrnehmung über die A β -Fasern eingeschränkt (MDT und VDT), während die nozizeptiven A δ - und C-Fasern eine erhöhte Sensibilität zeigten (MPT, MPS, CPT und PPT).⁵¹

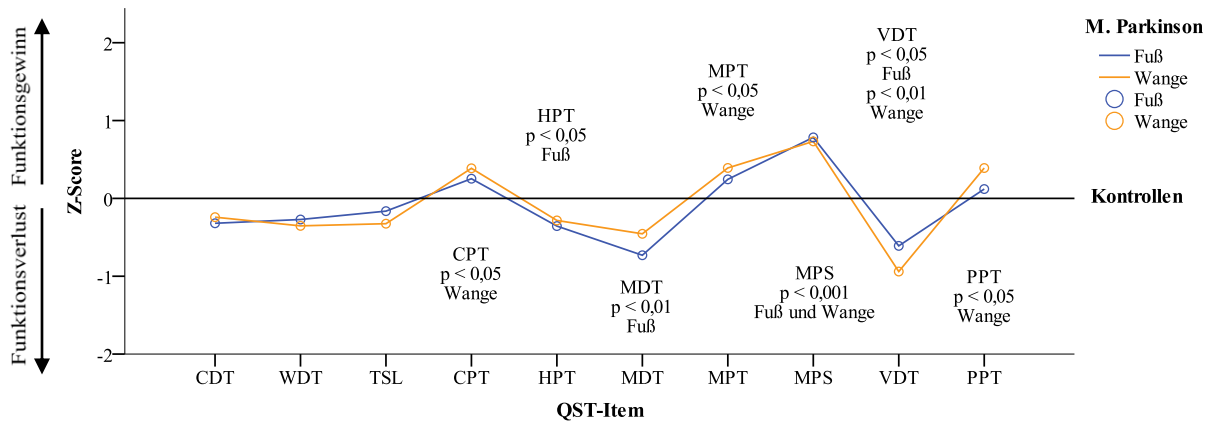


Diagramm 4: Vergleich zwischen den Patienten mit Morbus Parkinson und den Kontrollpersonen in der QST

	CDT	WDT	TSL	CPT	HPT	MDT	MPT	MPS	VDT	PPT
Fuß	-0,32 ± 0,13	-0,27 ± 0,17	-0,16 ± 0,17	0,25 ± 0,09	-0,36 ± 0,05	-0,73 ± 0,18	0,24 ± 0,11	0,78 ± 0,11	-0,61 ± 0,18	0,12 ± 0,12
Signifi- kanz im t-Test	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	p < 0,05	p < 0,01	n. s.	p < 0,001	p < 0,05	n. s.
Wange	-0,24 ± 0,12	-0,35 ± 0,12	-0,33 ± 0,13	0,39 ± 0,12	-0,28 ± 0,05	-0,46 ± 0,31	0,39 ± 0,08	0,73 ± 0,10	-0,94 ± 0,32	0,39 ± 0,10
Signifi- kanz im t-Test	n. s.	n. s.	n. s.	p < 0,05	n. s.	n. s.	p < 0,05	p < 0,001	p < 0,01	p < 0,05

Tabelle 20: Mittelwerte und Standardfehler der Z-Scores der Patienten mit Morbus Parkinson (N = 63) gegenüber den Kontrollpersonen (N = 53) in der QST (N ist die Anzahl der untersuchten Personen)

3.6.1.2 Patienten mit MSA

Den untersuchten Patienten mit MSA fiel es an der Wange schwerer als den Kontrollpersonen kalte und warme Reize gegeneinander abzugrenzen (TSL). Analog zu

den Patienten mit Morbus Parkinson empfanden sie mechanische Schmerzreize am Gesicht schneller als die Kontrollen als unangenehm (MPT) und stufen diese zudem insgesamt als schmerzhafter ein (MPS). Außerdem konnten auch sie Vibrationen, insbesondere am Fuß, nur abgeschwächt spüren (VDT), während die Druckschmerzhaftigkeit (PPT) an der Wange erhöht war.

Auch bei den Patienten mit MSA war somit die Funktion der berührungsempfindlichen A β -Fasern reduziert (VDT), während die Schmerzempfindung über die A δ - und C-Fasern gesteigert war (MPT, MPS, PPT).⁵¹

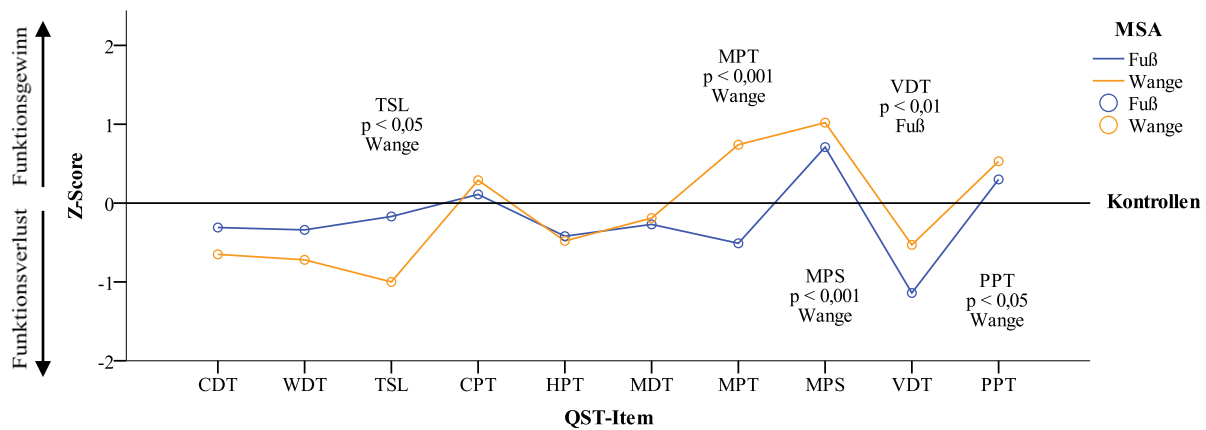


Diagramm 5: Vergleich zwischen den MSA-Patienten und den Kontrollpersonen in der QST

	CDT	WDT	TSL	CPT	HPT	MDT	MPT	MPS	VDT	PPT
Fuß	-0,31 ± 0,40	-0,34 ± 0,40	-0,17 ± 0,42	0,11 ± 0,29	-0,42 ± 0,07	-0,27 ± 0,55	-0,51 ± 0,39	0,71 ± 0,24	-1,14 ± 0,28	0,30 ± 0,28
Signifi- kanz im t-Test	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	p < 0,01	n. s.
Wange	-0,65 ± 0,42	-0,72 ± 0,47	-1,00 ± 0,49	0,29 ± 0,38	-0,48 ± 0,10	-0,19 ± 0,22	0,74 ± 0,00	1,02 ± 0,14	-0,53 ± 0,44	0,53 ± 0,17
Signifi- kanz im t-Test	n. s.	n. s.	p < 0,05	n. s.	n. s.	n. s.	p < 0,001	p < 0,001	n. s.	p < 0,05

Tabelle 21: Mittelwerte und Standardfehler der Z-Scores der MSA-Patienten (N = 7) gegenüber den Kontrollpersonen (N = 53) in der QST (N ist die Anzahl der untersuchten Personen)

3.6.1.3 Patienten mit Tauopathien

Besonders bei der Kälte- und Wärmewahrnehmung (CDT, WDT und TSL) im Gesicht wiesen die Patienten mit PSP oder CBD Defizite auf. Zusätzlich wurde Hitze am Fuß erst später als schmerzhaft empfunden (HPT).

Im Gegensatz zu den anderen untersuchten Patientengruppen mit Morbus Parkinson oder MSA war bei den Patienten mit einer Tauopathie somit eine eingeschränkte Funktion der Temperatur wahrnehmenden A δ - und C-Fasern feststellbar (CPT, WDT und HPT), während die Funktionsfähigkeit der A β -Fasern unbeeinflusst blieb.⁵¹

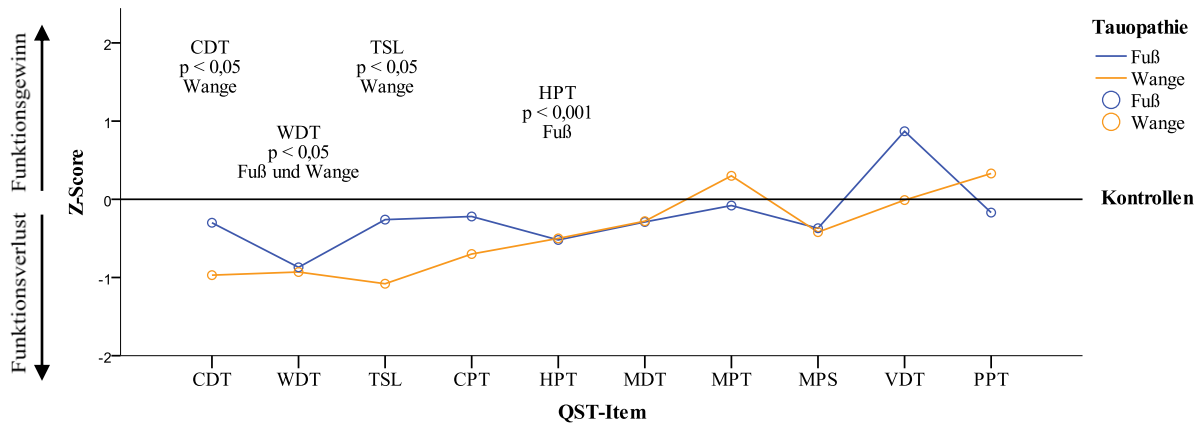


Diagramm 6: Vergleich zwischen den Patienten mit einer Tauopathie und den Kontrollpersonen in der QST

	CDT	WDT	TSL	CPT	HPT	MDT	MPT	MPS	VDT	PPT
Fuß	-0,30 ± 0,31	-0,87 ± 0,34	-0,26 ± 0,20	-0,22 ± 0,21	-0,52 ± 0,01	-0,29 ± 0,64	-0,08 ± 0,44	-0,37 ± 0,27	0,87 ± 0,77	-0,17 ± 0,38
Signifi- kanz im t-Test	n. s.	p < 0,05	n. s.	n. s.	p < 0,001	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.
Wange	-0,97 ± 0,46	-0,93 ± 0,44	-1,08 ± 0,46	-0,70 ± 0,39	-0,50 ± 0,11	-0,28 ± 0,59	0,30 ± 0,35	-0,42 ± 0,26	-0,01 ± 0,33	0,33 ± 0,37
Signifi- kanz im t-Test	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.	n. s.

Tabelle 22: Mittelwerte und Standardfehler der Z-Scores der PSP-Patienten (N = 5) und der CBD-Patienten (N = 2) gegenüber den Kontrollpersonen (N = 53) in der QST (N ist die Anzahl der untersuchten Personen)

3.6.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Die mechanische Schmerzschwelle (MPT) war im Gesicht signifikant abhängig von der Erkrankungsdauer ($p < 0,01$; $\rho = 0,34$). Außerdem wiesen neben der mechanischen

Schmerzsensitivität (MPS) ($p < 0,01$; $\rho = 0,30$) im Gesicht sowohl die Wärmewahrnehmungsschwelle (WDT) ($p < 0,05$; $\rho = 0,26$) und die Hitzeschmerzschwelle (HPT) ($p < 0,05$; $\rho = 0,25$) am Fuß als auch die thermische Unterschiedsschwelle (TSL) ($p < 0,05$; $\rho = 0,23$) an der Wange eine signifikante positive Spearman-Korrelation zum Hoehn-und-Yahr-Stadium auf. Allerdings waren viele Werte der QST auch vom Alter signifikant abhängig (CDT (Fuß): $p < 0,001$; $\rho = -0,40$; CDT (Wange): $p < 0,001$; $\rho = -0,44$; WDT (Fuß): $p < 0,01$; $\rho = 0,25$; WDT (Wange): $p < 0,001$; $\rho = 0,41$; TSL (Fuß): $p < 0,05$; $\rho = 0,23$; TSL (Wange): $p < 0,01$; $\rho = 0,30$; MPT (Fuß): $p < 0,05$; $\rho = 0,19$, MPS (Fuß): $p < 0,05$; $\rho = 0,22$; MPS (Wange): $p < 0,01$; $\rho = 0,32$; VDT (Fuß): $p < 0,001$; $\rho = -0,36$; PPT (Wange): $p < 0,05$; $\rho = -0,19$), sodass in der ANCOVA kein signifikanter Zusammenhang erhalten blieb.

3.6.3 Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Die taktile Wahrnehmungsschwelle (MDT) am Fuß lag bei den Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen signifikant höher als bei den Patienten ohne solche Ablagerungen ($p < 0,01$). Auch quantitativ war eine Korrelation einer erhöhten taktilen Wahrnehmungsschwelle (MDT) am Fuß zu einer erhöhten Anzahl Phospho-Alpha-Synuclein-positiver Fasern nachweisbar ($p < 0,05$; $\rho = 0,42$). Die Wärmewahrnehmungsschwelle (WDT) an der Wange zeigte hingegen eine negative Spearman-Korrelation zur Zahl der Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins ($p < 0,05$; $\rho = -0,38$).

3.7 Auswertung der Hautbiopsien

3.7.1 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

3.7.1.1 Häufigkeitsverteilung

Eine Ablagerung von phosphoryliertem Alpha-Synuclein fand sich in der Haut von 52 % der idiopathischen Parkinson-Patienten. Der Anteil der Patienten, bei denen Phospho-

Alpha-Synuclein-positive Fasern festgestellt werden konnten, war dabei unabhängig davon, ob die Patienten an einem akinetisch-rigiden, einem Tremor-dominanten oder einem Äquivalenztyp des Morbus Parkinson litten. Außerdem konnten bei 8 von 11 Patienten mit MSA-P Ablagerungen entdeckt werden, nicht jedoch bei dem einen untersuchten Patienten mit MSA-C, sodass bei insgesamt 67 % der MSA-Patienten phosphoryliertes Alpha-Synuclein gefunden werden konnte. Dagegen konnten weder bei den Patienten mit einer Tauopathie noch bei den gesunden Kontrollpersonen Phospho-Alpha-Synuclein-positive Nervenfasern nachgewiesen werden.

Gruppe	Klassifikation	Anteil der Personen mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen
M. Parkinson:		52 % (48/92)
	- Akinetisch-rigider Typ	53 % (36/68)
	- Tremor-dominanter Typ	64 % (7/11)
	- Äquivalenztyp	39 % (5/13)
MSA:		67 % (8/12)
	- MSA-P	73 % (8/11)
	- MSA-C	0 % (0/1)
Tauopathie:		0 % (0/13)
	- PSP	0 % (0/8)
	- CBD	0 % (0/5)
Kontrollen:		0 % (0/73)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson		p < 0,001

Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb der verschiedenen Patientengruppen

3.7.1.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium, der Familienanamnese und dem Erkrankungsalter

Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen waren in jedem Krankheitsstadium nachweisbar. Das Vorhandensein wie auch die Menge an Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern war dabei weder vom Alter noch vom Hoehn-und-Yahr-Stadium oder der Erkrankungsdauer abhängig. Auch der in der Tabelle 24 erkennbare Trend, wonach Phospho-Alpha-Synuclein-positive Fasern bei den Patienten mit MSA vermehrt in höheren Krankheitsstadien aufzutreten scheinen, war aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht signifikant. Weiterhin war weder für eine positive Familienanamnese noch für ein Auftreten der Erkrankung vor dem 45. Lebensjahr (Early-Onset-Parkinson) eine Assoziation mit dem Vorliegen von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen erkennbar.

	1	2	3	4	5
M. Parkinson	100 % (4/4)	42 % (10/24)	51 % (19/37)	58 % (11/19)	57 % (4/7)
MSA	(0/0)	(0/0)	33 % (1/3)	67 % (4/6)	100 % (3/3)

Tabelle 24: Verteilung der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen auf die Hoehn-und-Yahr-Stadien

3.7.1.3 Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

Die Häufigkeit, mit der eine Akkumulation an phosphoryliertem Alpha-Synuclein festgestellt werden konnte, zeigte in der untersuchten Kohorte keine Unterschiede hinsichtlich der Biopsieentnahmestelle.

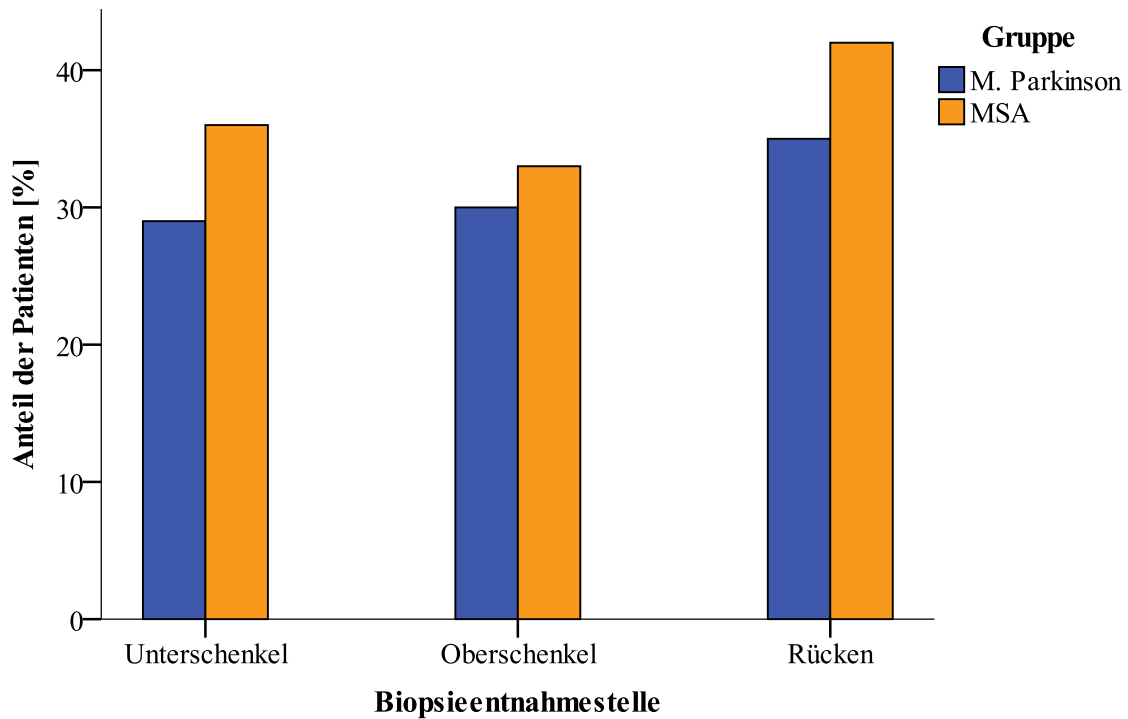


Diagramm 7: Anteil der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

	M. Parkinson	MSA
Unterschenkel	29 % (26/89)	36 % (4/11)
Oberschenkel	30 % (27/91)	33 % (4/12)
Rücken	35 % (31/89)	42 % (5/12)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 25: Anteil der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

Bei der quantitativen Analyse war lediglich am Oberschenkel der Patienten mit MSA eine leicht geringere Anzahl der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern pro Fläche erkennbar. Diese Reduktion war jedoch nicht signifikant.

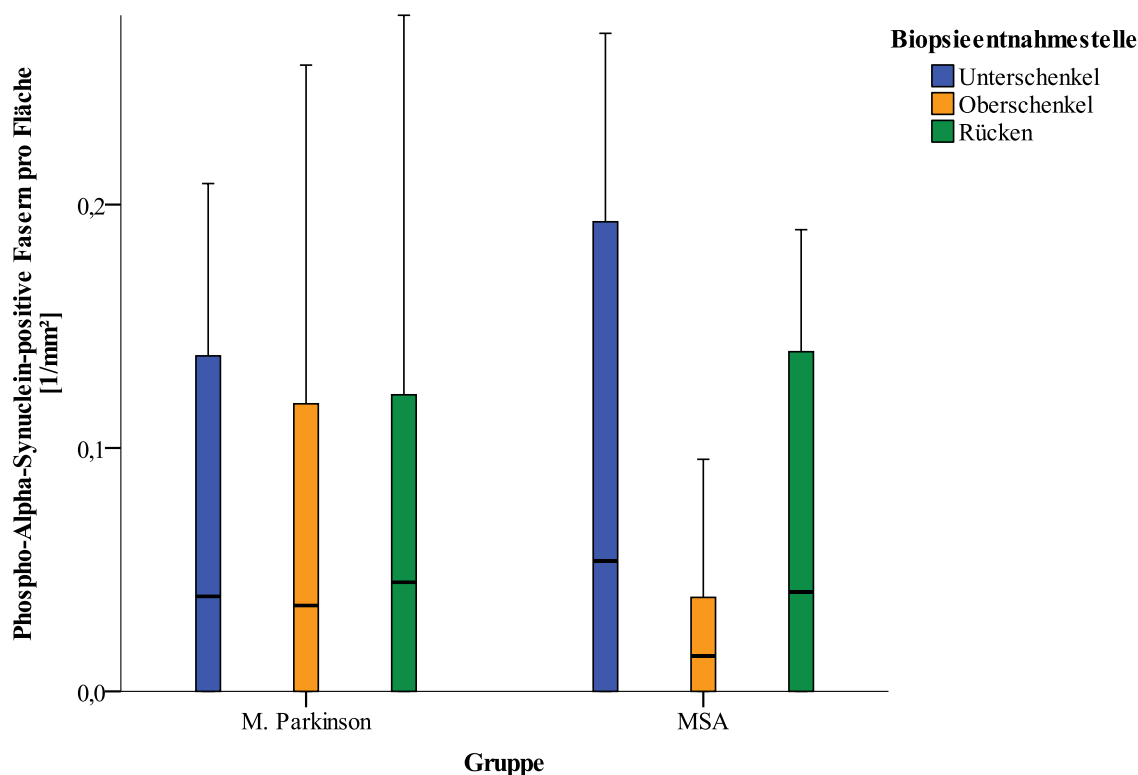


Diagramm 8: Phospho-Alpha-Synuclein-positiv Fasern pro Fläche in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle
(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	M. Parkinson (N = 46-48)	MSA (N = 7-8)
Unterschenkel	0,04/mm ² (0,00-1,64/mm ²)	0,05/mm ² (0,00-0,75/mm ²)
Oberschenkel	0,04/mm ² (0,00-0,72/mm ²)	0,01/mm ² (0,00-0,10/mm ²)
Rücken	0,04/mm ² (0,00-2,03/mm ²)	0,04/mm ² (0,00-1,46/mm ²)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 26: Median (mit Minimum und Maximum) der Anzahl der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern pro untersuchter Schnittfläche in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (N ist die Anzahl der untersuchten Biopsien je Biopsieentnahmestelle)

Die Anzahl autonomer Strukturen, wie Blutgefäße, Schweißdrüsen oder Musculi arrectores pilorum, pro untersuchter Biopsiefläche wurde dabei mittels ANCOVA als Confounder ausgeschlossen.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen, entsprechend einer Ausbreitung von proximal nach distal, erst in höheren Krankheitsstadien bzw. nach längerer Krankheitsdauer in Nervenfasern des Unterschenkels nachweisbar waren. Dafür ließen sich jedoch anhand der vorliegenden Daten keine Hinweise finden.

3.7.1.4 Abhängigkeit von der Seitendominanz

Darüber hinaus wurde geprüft, ob Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins vermehrt auf der von der Krankheit stärker betroffenen Seite der Parkinson-Patienten auftraten. Dies war jedoch nicht der Fall.

	Phospho-Alpha-Synuclein-positiv
Stärker betroffene Seite biopsiert	57 % (24/42)
Schwächer betroffene Seite biopsiert	50 % (25/50)
Signifikanz im exakten Test nach Fisher	nicht signifikant

Tabelle 27: Anteil Phospho-Alpha-Synuclein-positiver Biopsien in Abhängigkeit von der Seitendominanz

3.7.1.5 Lokalisation der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern

3.7.1.5.1 Vergleich zwischen den Patienten mit Morbus Parkinson und den Patienten mit MSA

Bei der Auswertung der Verteilung der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern auf die verschiedenen Strukturen der Haut war erkennbar, dass die Patienten mit Morbus Parkinson Proteinablagerungen außer in dermalen Nervenfaserbündeln vor allem in autonom innervierten Strukturen, wie Gefäßen, Schweißdrüsen und Musculi arrectores pilorum, aufwiesen, während bei den Patienten mit MSA eher sub- und intraepidermale Fasern

betroffen waren. Allerdings war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen bei dieser Untersuchung nicht signifikant.

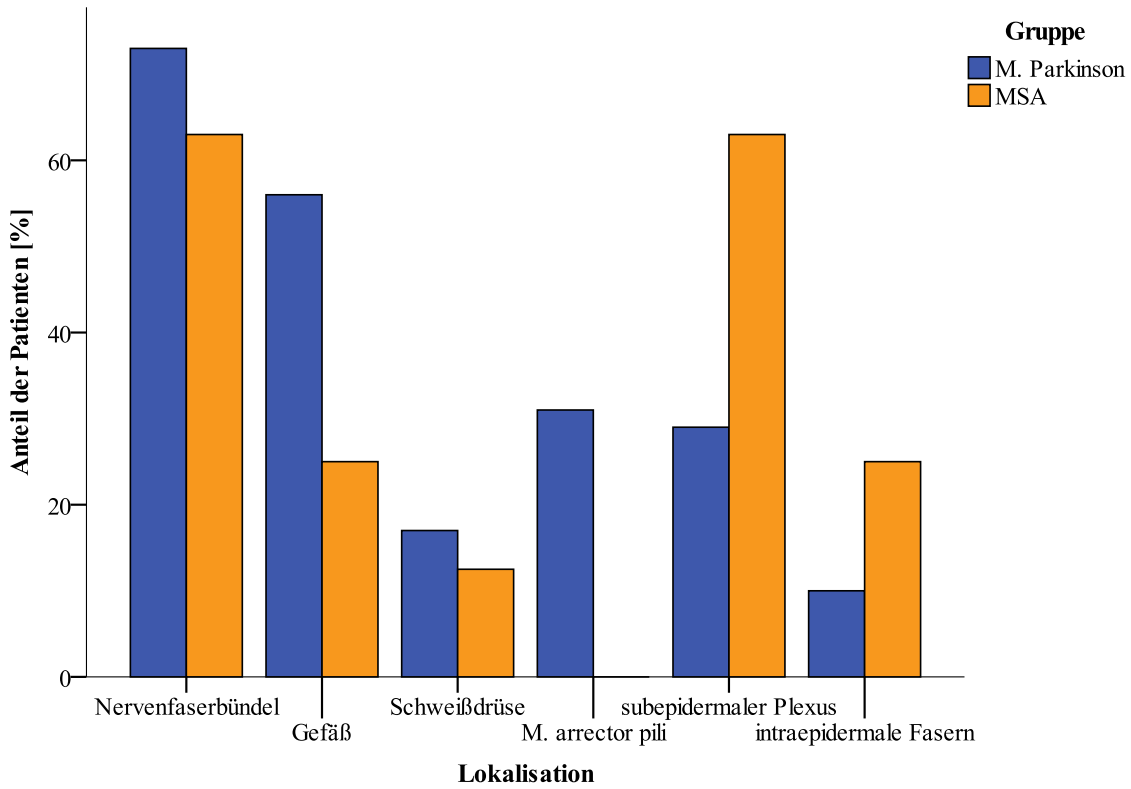


Diagramm 9: Anteil der Patienten, bei denen Phospho-Alpha-Synuclein-positive Fasern innerhalb der verschiedenen Hautstrukturen nachweisbar waren

	Nervenfa- serbündel	Gefäß	Schweiß- drüse	Musculus arrector pili	Subepi- dermaler Plexus	Intraepi- dermale Fasern
M. Parkinson (N = 48)	73 % (35/48)	56 % (27/48)	17 % (8/48)	31 % (15/48)	29 % (14/48)	10 % (5/48)
MSA (N = 8)	63 % (5/8)	25 % (2/8)	13 % (1/8)	0 % (0/8)	63 % (5/8)	25 % (2/8)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	nicht signifikant					

Tabelle 28: Anteil der Patienten, bei denen Phospho-Alpha-Synuclein-positive Fasern innerhalb der verschiedenen Hautstrukturen nachweisbar waren (N ist die Anzahl der untersuchten Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen)

Um eine genauere Analyse der Verteilung zu erreichen, wurde bei den zuletzt rekrutierten 29 Patienten mit Morbus Parkinson und 5 Patienten mit MSA zusätzlich eine detaillierte Auswertung vorgenommen, wie viel Prozent der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern jeweils tatsächlich innerhalb der verschiedenen Lokalisationen nachweisbar waren. Dadurch konnte im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen den Patienten mit Morbus Parkinson und denen mit MSA gezeigt werden ($p < 0,001$). Dabei war auch hier die Tendenz erkennbar, wonach die idiopathischen Parkinson-Patienten Ablagerungen eher in autonomen und die MSA-Patienten eher in somatosensiblen Nervenfasern aufwiesen.

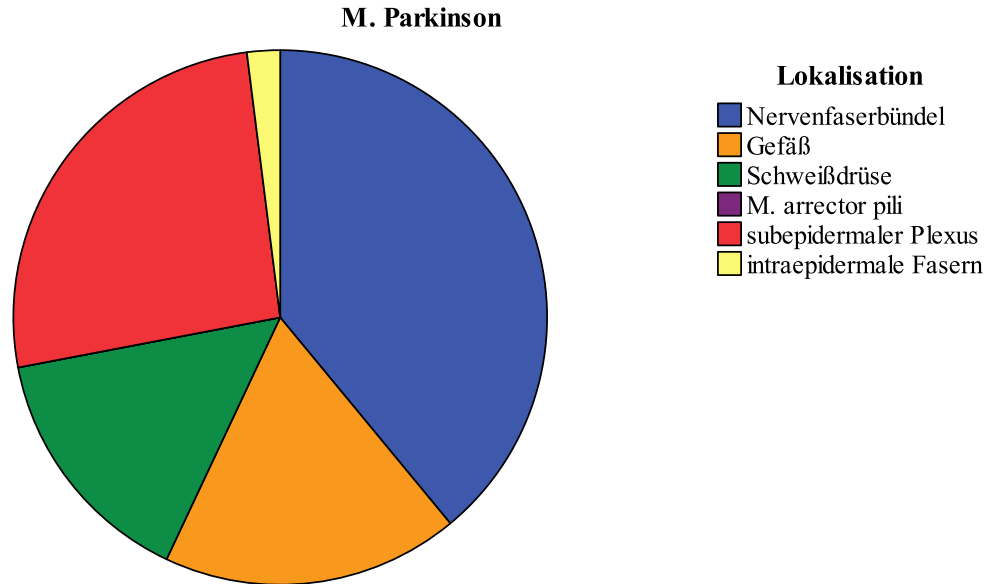


Diagramm 10: Verteilung der einzelnen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern auf die verschiedenen Strukturen der Haut bei den Patienten mit Morbus Parkinson

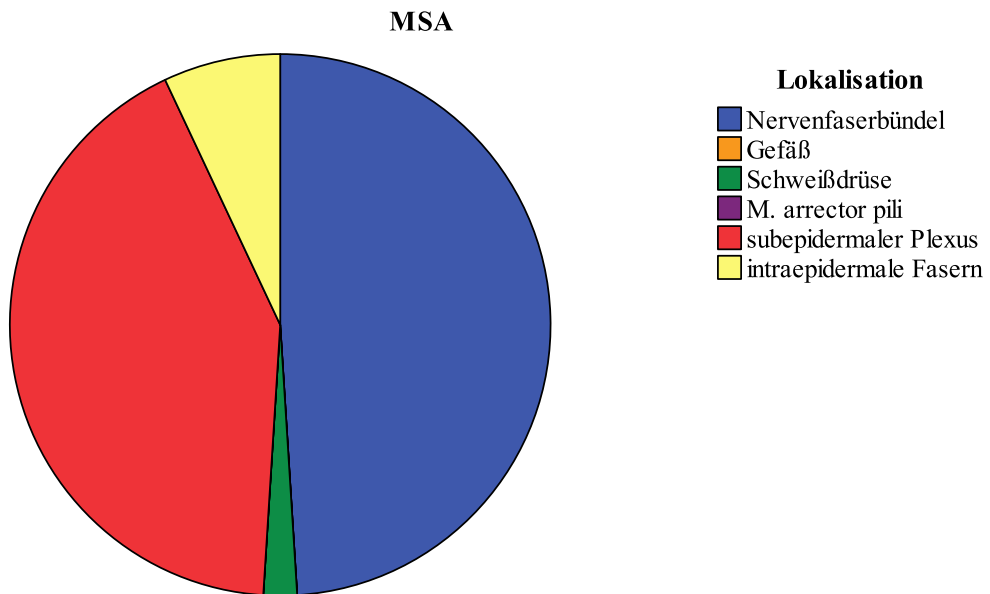


Diagramm 11: Verteilung der einzelnen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern auf die verschiedenen Strukturen der Haut bei den Patienten mit MSA

	Nervenfa- serbündel	Gefäß	Schweiß- drüse	Musculus arrector pili	Subepi- dermaler Plexus	Intraepi- dermale Fasern
M. Parkinson (N = 29)	39 % (213/548)	18 % (97/548)	15 % (83/548)	0 % (2/548)	26 % (141/548)	2 % (12/548)
MSA (N = 5)	49 % (36/74)	0 % (0/74)	2 % (3/74)	0 % (0/74)	42 % (31/74)	7 % (5/74)
Signifikanz im Chi-Quadrat-Test nach Pearson	p < 0,001					

Tabelle 29: Verteilung der einzelnen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern auf die verschiedenen Strukturen der Haut
(N ist die Anzahl der untersuchten Patienten)

3.7.1.5.2 Betroffenheit somatosensibler Nervenfasern

Der Anteil der Patienten, bei denen Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb der sub- und intraepidermal gelegenen, sensiblen Nervenfasern nachweisbar waren, an der Gesamtzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern war im exakten Test nach Fisher bei den MSA-Patienten mit 6 von 8 signifikant höher als bei den idiopathischen Parkinson-Patienten mit 14 von 48 Personen ($p < 0,05$). Unter Berücksichtigung aller Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen hatten weder das Alter, noch das Krankheitsstadium oder die Erkrankungsdauer einen Einfluss darauf, ob Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb somatosensibler Nervenfasern entdeckt werden konnten. Bei der isolierten Betrachtung der Patienten mit Morbus Parkinson war jedoch im Mann-Whitney-U-Test die Krankheitsdauer von den Patienten mit Ablagerungen innerhalb somatosensibler Fasern mit im Median 14 (6-27) Jahren signifikant höher als von den Patienten, bei denen Ablagerungen nur in autonomen Strukturen oder dermalen Nervenfaserbündeln nachweisbar waren, mit 9 (1-40) Jahren ($p < 0,05$). Zwischen

akinetisch-rigidem, Tremor-dominantem oder Äquivalenztyp konnten hinsichtlich der Betroffenheit somatosensibler Nervenfasern keine Unterschiede festgestellt werden.

3.7.1.5.3 Betroffenheit autonomer Nervenfasern

Das Vorhandensein von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb autonomer Fasern, die Gefäße, Schweißdrüsen oder Arrector pili-Muskeln innervieren, war in der aktuell untersuchten Studienkohorte, im Gegensatz zu Analysen früherer Stichproben durch unsere Arbeitsgruppe,³³ zwischen den Patienten mit Morbus Parkinson und den Patienten mit MSA nicht signifikant unterschiedlich. Auch die Symptomdominanz der Parkinson-Patienten, im Hinblick auf akinetisch-rigidem, Tremor-dominantem oder Äquivalenztyp, sowie das Alter und das Krankheitsstadium hatten keinen Einfluss. Die Krankheitsdauer war im Mann-Whitney-U-Test bei den Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen innerhalb autonomer Nervenfasern mit im Median 8 (1-27) Jahren signifikant geringer als bei den Patienten, bei denen Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen ausschließlich innerhalb anderer Strukturen nachweisbar waren, mit 14 (2-40) Jahren ($p < 0,05$). In der gesonderten Analyse der Patienten mit Morbus Parkinson trat dieser Zusammenhang sogar noch deutlicher zu Tage mit 8 (1-27) zu 19 (4-40) Jahren ($p < 0,01$).

3.7.1.6 Subtypen der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern

Bei den zuletzt untersuchten Patienten konnten in jeder der Doppelfärbungen mit sympathischen (TH), cholinergen (VIP) und peptidergen (SP und CGRP) Markern Kolo-kalisationen mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachgewiesen werden. Dabei waren Phospho-Alpha-Synuclein-positiv-positive Fasern jedoch in unterschiedlichem Ausmaß zusätzlich mit Antikörpern für die verschiedenen Nervenfasersubtypen markiert (Morbus Parkinson: $p < 0,001$ im Chi-Quadrat-Test nach Pearson; MSA: nicht signifikant). Außerdem wiesen auch hier die Patienten mit Morbus Parkinson bzw. mit MSA im Chi-Quadrat-Test nach Pearson ein unterschiedliches Verteilungsmuster auf ($p < 0,001$). Bei den Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson waren vor allem CGRP- und VIP-

positive Nervenfasern von einer Akkumulation des phosphorylierten Alpha-Synucleins betroffen, bei den MSA-Patienten hingegen eher Fasern, die TH, SP und CGRP enthielten.

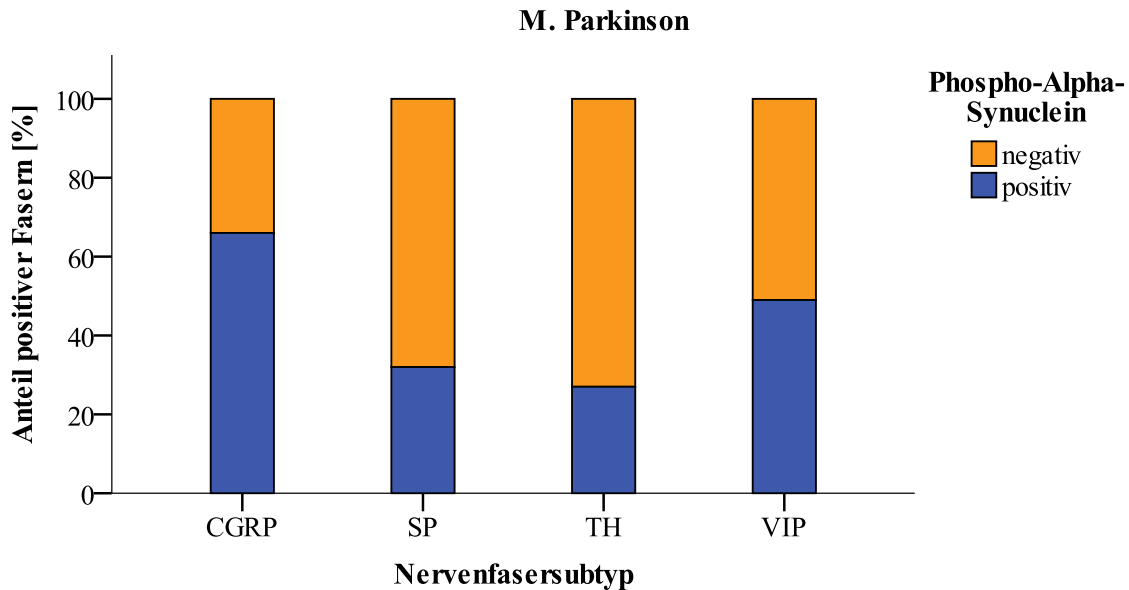


Diagramm 12: Anteil der CGRP-, SP-, TH- bzw. VIP-positiven Fasern an den Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern bei den Patienten mit Morbus Parkinson

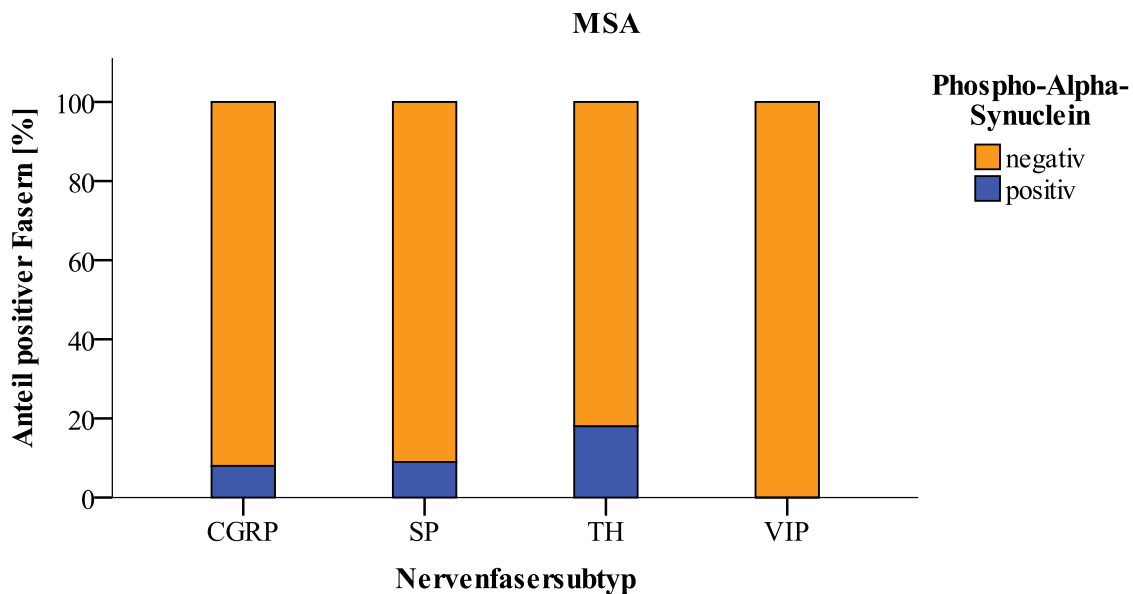


Diagramm 13: Anteil der CGRP-, SP-, TH- bzw. VIP-positiven Fasern an den Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern bei den Patienten mit MSA

	CGRP	SP	TH	VIP
M. Parkinson (N = 29)	66 % (56/85)	32 % (35/112)	27 % (34/128)	49 % (53/109)
MSA (N = 5)	8 % (1/13)	9 % (2/22)	18 % (4/22)	0 % (0/12)
Signifikanz im Chi- Quadrat-Test nach Pearson	p < 0,001			

Tabelle 30: Anteil der CGRP-, SP-, TH- bzw. VIP-positiven Fasern an den Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern
(N ist die Anzahl der untersuchten Patienten)

3.7.2 Intraepidermale Nervenfaserdichte

3.7.2.1 Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen

Am Rücken war im paarweisen Vergleich des Kruskal-Wallis-Tests die Zahl der sensiblen Nervenfasern der Haut bei den Patienten mit Morbus Parkinson ($p < 0,01$), ebenso wie bei den Patienten mit einer Tauopathie ($p < 0,05$), gegenüber den gesunden Kontrollpersonen signifikant reduziert. Am Bein war hingegen weder im Kruskal-Wallis-Test, noch im Mann-Whitney-U-Test zum direkten Vergleich der idiopathischen Parkinson-Patienten mit den Kontrollpersonen eine Differenz der intraepidermalen Nervenfaserdichte erkennbar.

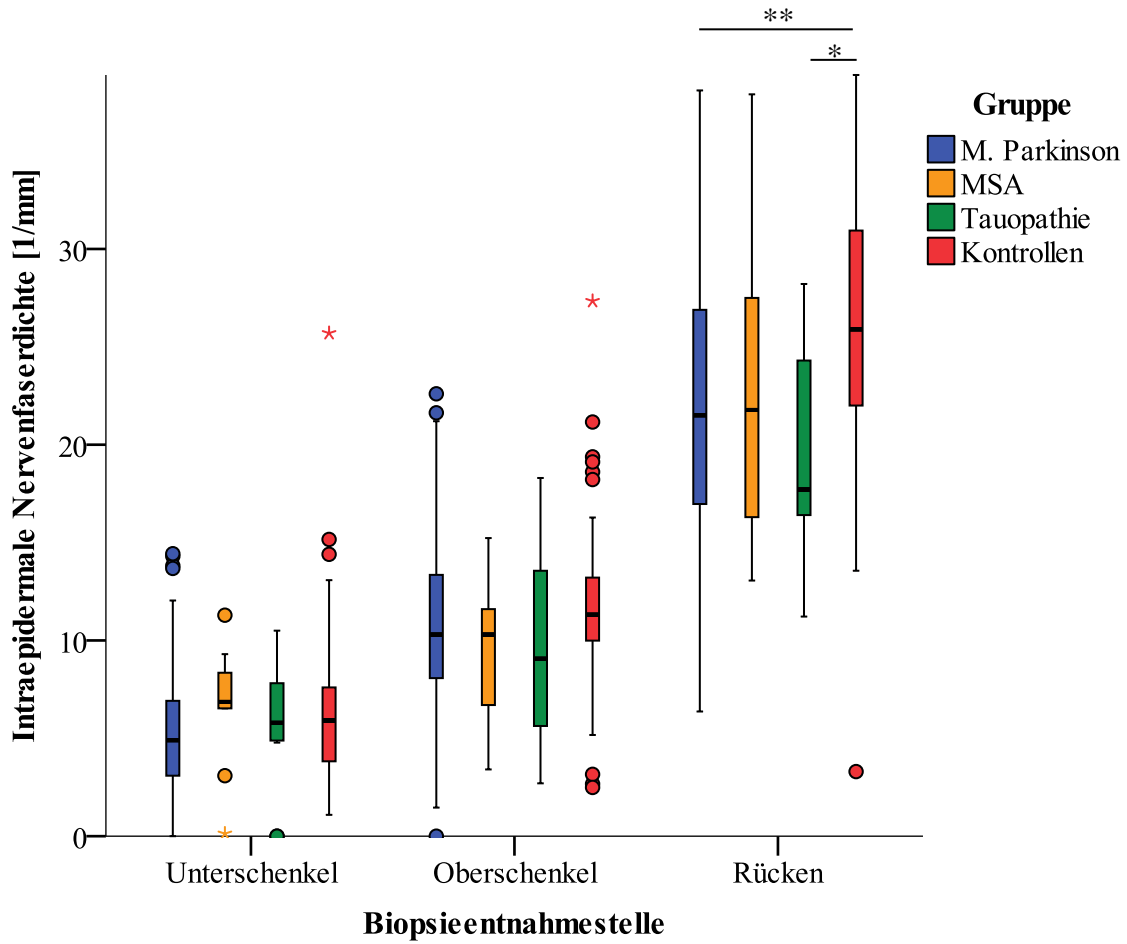


Diagramm 14: Vergleich der intraepidermalen Nervenfaserdichte zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) (Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	Unterschenkel	Oberschenkel	Rücken
M. Parkinson (N = 83/84/81)	4,9/mm (0,0-14,4/mm)	10,3/mm (0,0-22,6/mm)	21,5/mm (6,4-46,5/mm)
MSA (N = 9/10/10)	6,9/mm (0,1-11,3/mm)	10,3/mm (3,4-15,2/mm)	21,8/mm (13,1-37,9/mm)
Tauopathie (N = 12)	5,8/mm (0,0-10,5/mm)	9,1/mm (2,7-18,3/mm)	17,7/mm (11,2-28,2/mm)
Kontrollen (N = 67/65/62)	5,9/mm (1,1-25,7/mm)	11,3/mm (2,5-27,3/mm)	25,9/mm (3,3-46,7/mm)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	nicht signifikant	nicht signifikant	p < 0,01

Tabelle 31: Median (mit Minimum und Maximum) der intraepidermalen Nervenfaserdichte in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (N ist die Anzahl der untersuchten Personen)

Die in allen untersuchten Gruppen erkennbare Abnahme der intraepidermalen Nervenfaserdichte von proximaler zu distaler Lokalisation entspricht der Verteilung wie sie bereits in mehreren Studien veröffentlicht wurde, weshalb an dieser Stelle nicht näher darauf eingegangen wird.^{92,99,100}

3.7.2.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Am Oberschenkel ($p < 0,05$; $\rho = -0,24$) sowie am Rücken ($p < 0,01$; $\rho = -0,28$) war eine negative Spearman-Korrelation der intraepidermalen Nervenfaserdichte zum Hoehn-und-Yahr-Stadium, nicht aber zur Krankheitsdauer nachweisbar. Allerdings konnte auch eine signifikante negative Spearman-Korrelation zum Alter der Studienteilnehmer festgestellt werden (Oberschenkel: $p < 0,01$; $\rho = -0,33$; Rücken: $p < 0,01$; $\rho = -0,29$), wodurch nur noch die Verminderung der intraepidermalen Nervenfaserdichte bei höherem Krankheitsstadium am Rücken als signifikant gelten kann ($p < 0,05$ in der ANCOVA).

3.7.2.3 Zusammenhang mit der Nervenfunktion

Für die intraepidermale Nervenfaserdichte des Unterschenkels sowie des Rückens konnte in der Spearman-Korrelation eine Beziehung zur Funktion des Nervus suralis hergestellt werden (Nervenleitgeschwindigkeit: Rücken $p < 0,05$; $\rho = 0,26$; Amplitude: Unterschenkel $p < 0,05$; $\rho = 0,22$ und Rücken $p < 0,05$; $\rho = 0,26$).

In der QST war eine Korrelation von niedrigeren Werten der intraepidermalen Nervenfaserdichte mit erhöhten Schwellenwerten bei der Temperatur- und Schmerzwahrnehmung erkennbar (Unterschenkel: CDT (Wange) $p < 0,01$; $\rho = 0,29$; WDT (Wange) $p < 0,001$; $\rho = -0,35$; TSL (Fuß) $p < 0,05$; $\rho = -0,20$; TSL (Wange) $p < 0,01$; $\rho = -0,27$; HPT (Wange) $p < 0,05$; $\rho = -0,21$; MPS (Wange) $p < 0,01$; $\rho = -0,26$; PPT (Fuß) $p < 0,05$; $\rho = -0,22$; Oberschenkel: WDT (Fuß) $p < 0,01$; $\rho = -0,28$; MPT (Fuß) $p < 0,05$; $\rho = -0,20$; PPT (Fuß) $p < 0,05$; $\rho = -0,18$; Rücken: TSL (Wange) $p < 0,05$; $\rho = -0,20$). Einzig der Schwellenwert für die Vibrationswahrnehmung am Fuß war bei erniedrigter intraepidermaler Nervenfaserdichte am Rücken vermindert ($p < 0,05$; $\rho = 0,20$).

3.7.2.4 Abhängigkeit von der Seitendominanz

Die intraepidermale Nervenfaserdichte zeigte keine Abhängigkeit davon, ob die stärker oder die schwächer betroffene Seite biopsiert worden war.

3.7.2.5 Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Zudem war die intraepidermale Nervenfaserdichte unabhängig davon, ob die Patienten Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in somatosensiblen oder autonomen Fasern aufwiesen oder nicht.

3.7.3 Innervation der Schweißdrüsen

3.7.3.1 Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen

Mithilfe der zuvor erläuterten semiquantitativen Messmethode (siehe 2.7.4.2.2) konnte im Kruskal-Wallis-Test eine signifikante Reduktion der Schweißdrüsen-Innervation der Patienten mit Morbus Parkinson gegenüber den Kontrollpersonen am Ober- und Unterschenkel festgestellt werden (jeweils $p < 0,05$).

Zwar war die Innervation der Schweißdrüsen dabei im Mann-Whitney-U-Test für den Ober- und den Unterschenkel unabhängig vom Geschlecht, dennoch blieb der signifikante Gruppenunterschied in der ANCOVA nur am Unterschenkel erhalten ($p < 0,05$).

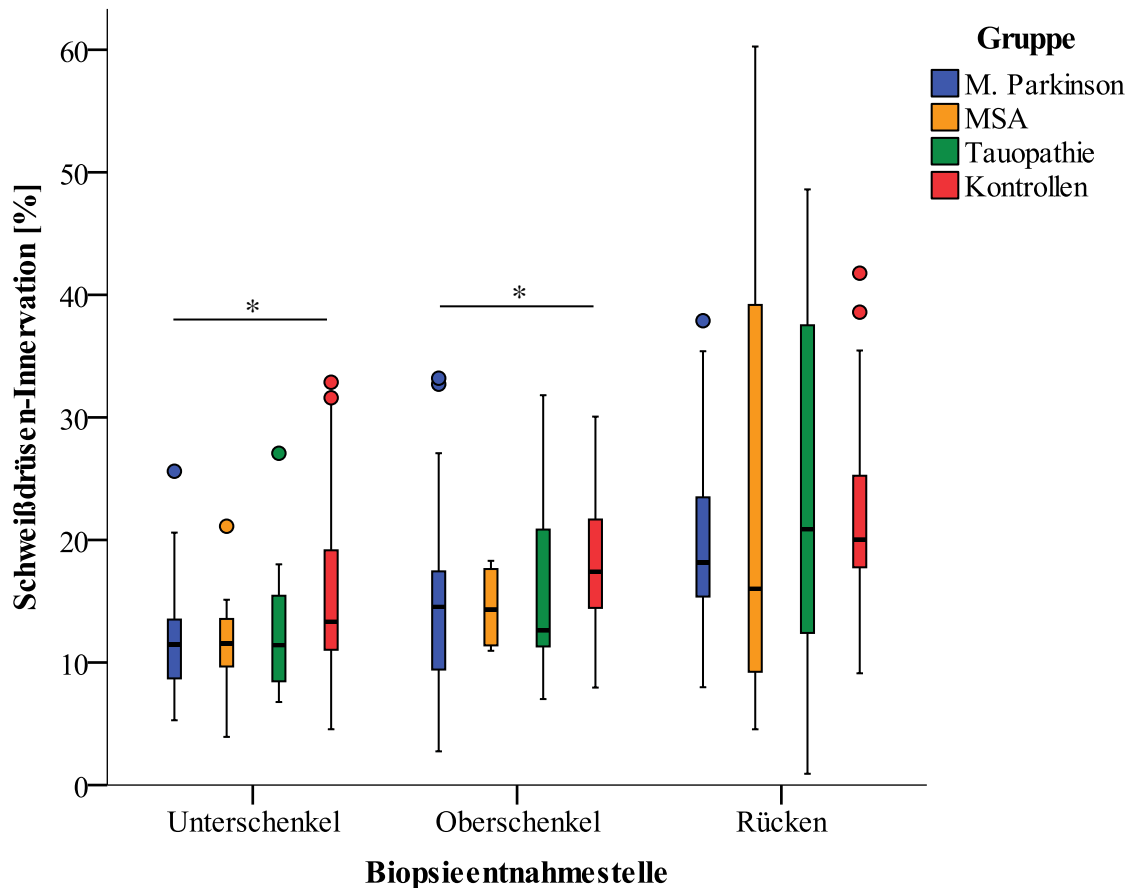


Diagramm 15: Vergleich der Schweißdrüsen-Innervation zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (* $p < 0,05$)

(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	Unterschenkel	Oberschenkel	Rücken
M. Parkinson (N = 59/52/40)	11,5 % (5,3-25,6 %)	14,5 % (2,8-33,2 %)	18,2 % (8,0-37,9 %)
MSA (N = 7/8/4)	11,6 % (3,9-21,1 %)	14,3 % (11,0-18,3 %)	16,0 % (4,6-60,3 %)
Tauopathie (N = 8/9/8)	11,4 % (6,8-27,1 %)	12,6 % (7,0-31,8 %)	20,9 % (0,9-48,6 %)
Kontrollen (N = 46/35/34)	13,3 % (4,6-32,9 %)	17,4 % (8,0-30,1 %)	20,0 % (9,1-41,8 %)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	p < 0,05	p < 0,05	nicht signifikant

Tabelle 32: Median (mit Minimum und Maximum) der Schweißdrüsen-Innervation in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (N ist die Anzahl der untersuchten Biopsien)

3.7.3.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Nur die Schweißdrüsen-Innervation des Oberschenkels zeigte eine signifikante Abnahme bei längerer Erkrankungsdauer ($p < 0,05$; $\rho = -0,26$), war jedoch unabhängig vom Hoehn- und-Yahr-Stadium. Zwar war keine Korrelation der Innervation der Schweißdrüsen zum Alter erkennbar, dennoch konnte die Signifikanz des Zusammenhangs der Innervation der Schweißdrüsen mit der Erkrankungsdauer in der ANCOVA nicht bestätigt werden.

Da es sich hierbei um eine Schädigung des autonomen Nervensystems handelt, wurde zusätzlich überprüft, ob sich die gefundenen Veränderungen auch in den Ergebnissen der NMS widerspiegeln. Eine Korrelation zu den Werten im NMS-Fragebogen konnte jedoch nicht gefunden werden.

3.7.3.3 Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Auch ein Unterschied zwischen der Schweißdrüsen-Innervation von Biopsien mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen und solchen ohne diese Ablagerungen war nicht erkennbar.

3.7.4 Innervation der Musculi arrectores pilorum

3.7.4.1 Vergleich zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen

Die Innervation der Haarbalgmuskeln unterschied sich in der untersuchten Studienpopulation an keiner der Biopsieentnahmestellen zwischen den untersuchten Gruppen.

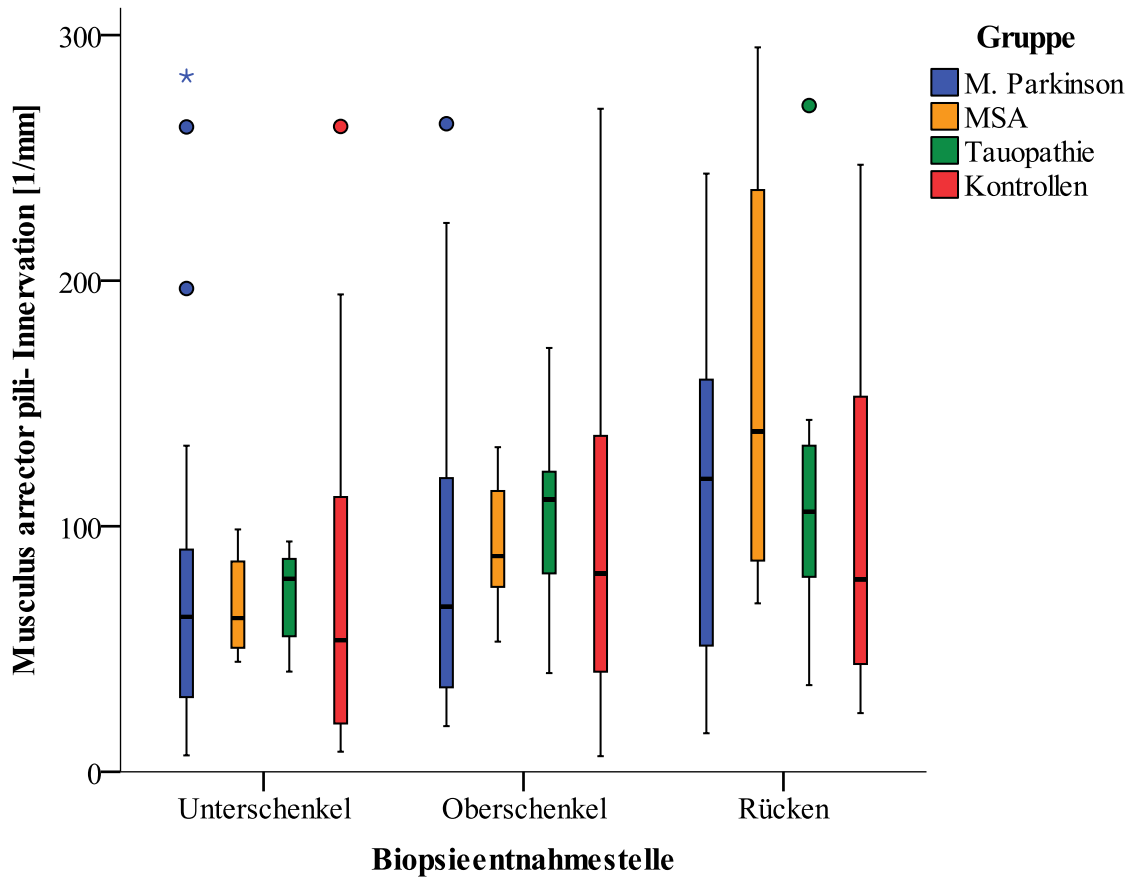


Diagramm 16: Vergleich der Musculus arrector pili-Innervation zwischen den Patienten und den Kontrollpersonen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle
(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	Unterschenkel	Oberschenkel	Rücken
M. Parkinson (N = 38/54/39)	63,1/mm (6,7-283,3/mm)	67,3/mm (18,6-263,9/mm)	119,3/mm (15,7-790,5/mm)
MSA (N = 8/8/6)	62,6/mm (44,8-98,7/mm)	87,9/mm (53,0-132,2/mm)	138,6/mm (68,6-295,0/mm)
Tauopathie (N = 5/10/7)	78,6/mm (40,8-93,8/mm)	110,9/mm (40,2-172,6/mm)	105,9/mm (35,3-271,3/mm)
Kontrollen (N = 26/40/28)	53,6/mm (8,2-262,8/mm)	80,8/mm (6,4-377,3/mm)	78,4/mm (23,9-247,2/mm)
Signifikanz im Kruskal-Wallis-Test	nicht signifikant	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 33: Median (mit Minimum und Maximum) der Musculus arrector pili-Innervation in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (N ist die Anzahl der untersuchten Biopsien)

3.7.4.2 Abhängigkeit vom Krankheitsstadium

Weder das Hoehn-und-Yahr-Stadium noch die Erkrankungsdauer hatten einen signifikanten Einfluss auf die Musculus arrector pili-Innervation an einer der drei Biopsieentnahmestellen.

Am Rücken konnte eine negative Spearman-Korrelation der Innervation der Arrector pili-Muskeln zum NMS-Fragebogen hergestellt werden ($p < 0,05$; $\rho = -0,34$). Die Musculus arrector pili-Innervation war unabhängig vom Alter, sodass der Zusammenhang zwischen der Innervation der Haarbalgmuskeln und den Ergebnissen der NMS auch in der ANCOVA erhalten blieb ($p < 0,05$).

3.7.4.3 Abhängigkeit von den Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Im Mann-Whitney-U-Test konnte sowohl am Unterschenkel ($p < 0,01$) als auch am Oberschenkel ($p < 0,05$) eine signifikante Reduktion der Musculus arrector pili-Innervation

zwischen Biopsien mit einer Phospho-Alpha-Synuclein-Akkumulation gegenüber Hautproben ohne eine solche Akkumulation festgestellt werden.

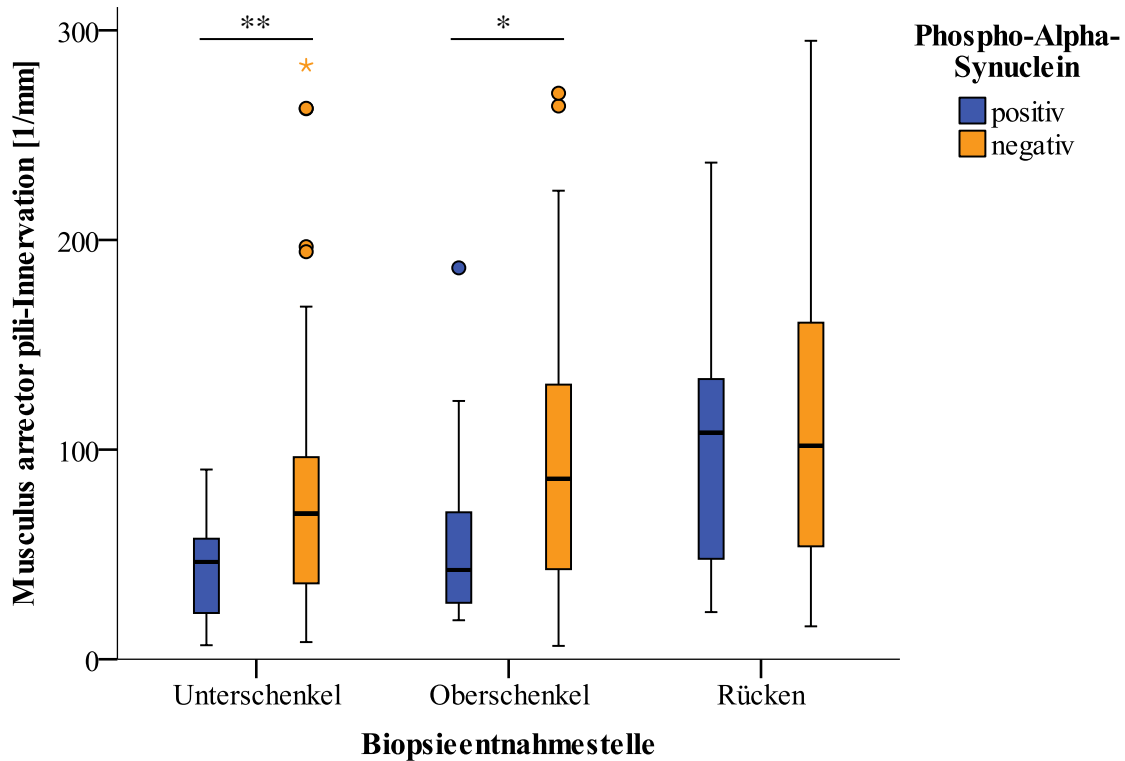


Diagramm 17: Vergleich der Musculus arrector pili-Innervation zwischen den Patienten mit bzw. ohne Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)
(Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	Unterschenkel	Oberschenkel	Rücken
Phospho-Alpha-Synuclein-positiv (N = 15/15/16)	46,4/mm (6,7-90,5/mm)	42,6/mm (18,6-186,7/mm)	108,1/mm (22,5-790,5/mm)
Phospho-Alpha-Synuclein-negativ (N = 35/57/36)	71,1/mm (12,3-283,3/mm)	86,9/mm (21,7-263,9/mm)	121,1/mm (15,7-402,9/mm)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test	$p < 0,01$	$p < 0,05$	nicht signifikant

Tabelle 34: Median (mit Minimum und Maximum) der Musculus arrector pili-Innervation bei Biopsien mit bzw. ohne Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (N ist die Anzahl der untersuchten Biopsien)

Allerdings war zumindest für den Unterschenkel und den Rücken auch eine signifikante Abhängigkeit der Innervation der Haarbalgmuskeln vom Geschlecht nachweisbar (jeweils $p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test), sodass die zunächst signifikanten Beziehungen zum Vorhandensein von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der ANCOVA nicht erhalten blieben.

3.7.5 Axonale Transportproteine

Die Intensität der Fluoreszenzfärbung war sowohl für den Antikörper gegen DYNLT3 als auch für den gegen KIF5A unabhängig davon, ob die ausgewerteten Nervenfasern Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen enthielten oder nicht. Die Testergebnisse lieferten somit keine Hinweise auf einen pathologischen Effekt von Alpha-Synuclein auf axonale Transportproteine.

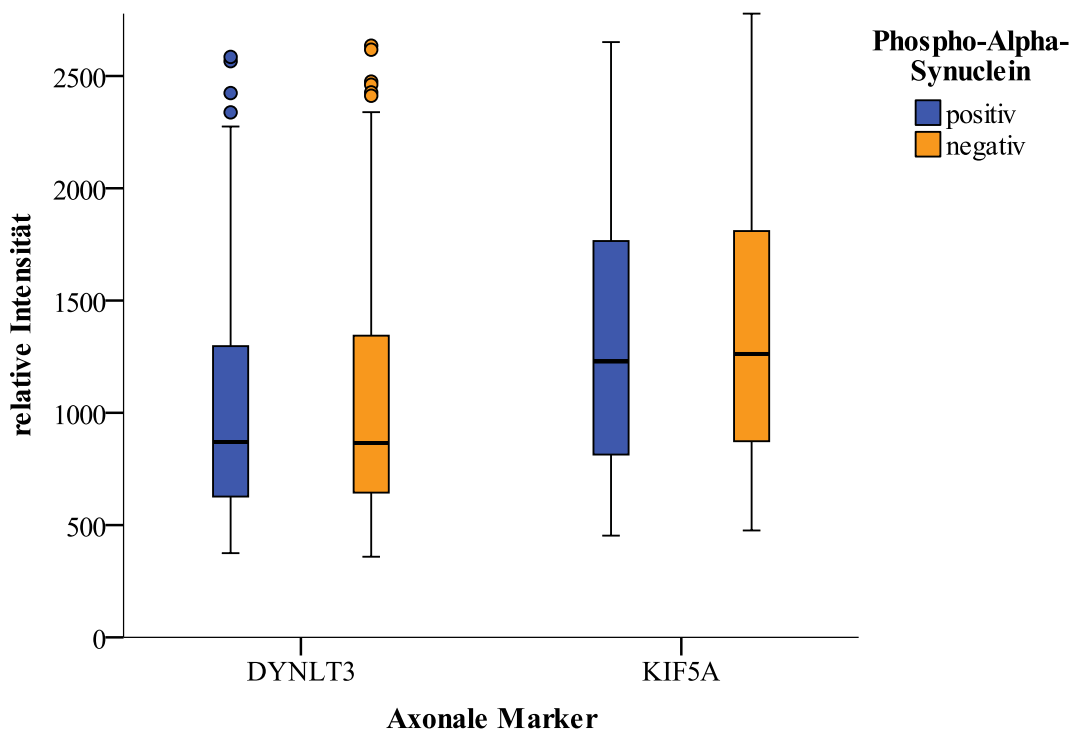


Diagramm 18: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität axonaler Marker zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern (Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	DYNLT3-Intensität	KIF5A-Intensität
Phospho-Alpha-Synuclein-positiv (N = 134/74)	871 (375-2585)	1229 (453-2651)
Phospho-Alpha-Synuclein-negativ (N = 268/148)	866 (358-2635)	1263 (476-2935)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test	nicht signifikant	nicht signifikant

Tabelle 35: Median (mit Minimum und Maximum) der relativen Fluoreszenzintensität axonaler Marker bei Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern (N ist die Anzahl der untersuchten Nervenfasern)

3.7.6 Mikrotubuli

Bei dem Vergleich Phospho-Alpha-Synuclein-positiver und -negativer Fasern ließen sich keine qualitativen Unterschiede in der Färbung von acetyliertem, detyrosiniertem und tyrosiniertem Tubulin feststellen. Untersucht wurden dabei 23 Phospho-Alpha-Synuclein-positiv Fasern in der Färbung des acetylierten Tubulins, 144 in der Färbung des detyrosinierten Tubulins und 11 in der Färbung des tyrosinierten Tubulins.

3.7.7 Mitochondrien

Auch in der Intensität der Fluoreszenzfärbung des mitochondrialen Proteins MTCO1 ließ sich kein Unterschied zwischen Nervenfasern mit oder ohne Phospho-Alpha-Synuclein nachweisen.

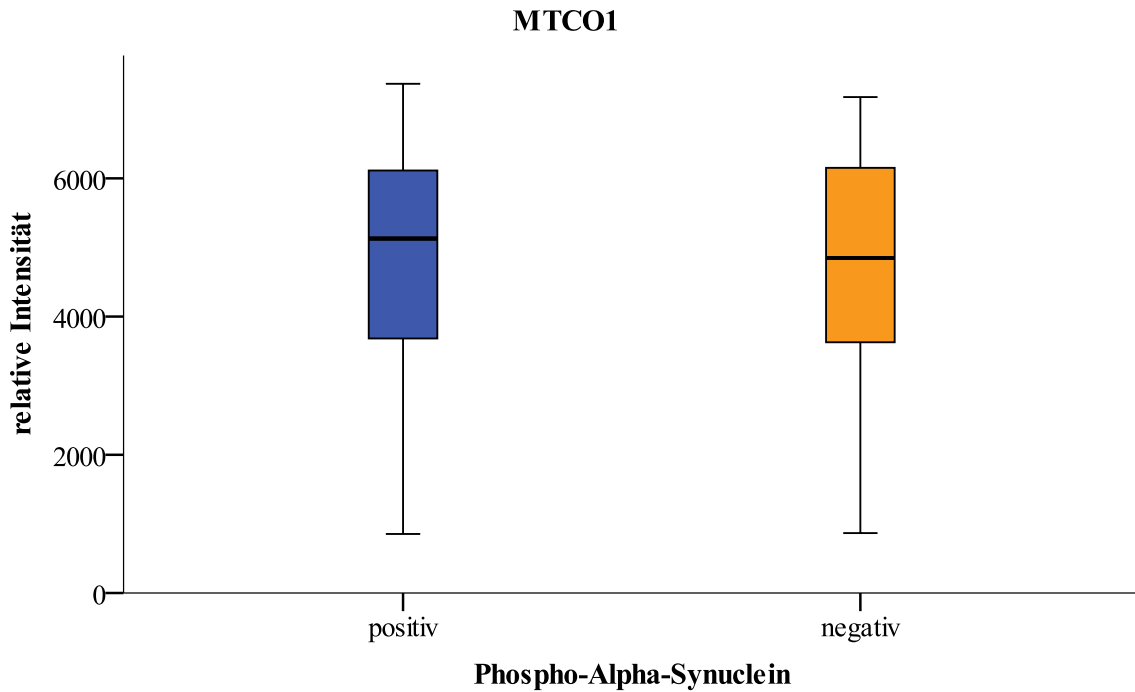


Diagramm 19: Vergleich der relativen Fluoreszenzintensität eines mitochondrialen Markers zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern (Bemerkung: Teilweise liegen Ausreißer und Extremwerte außerhalb des Diagrammbereichs)

	MTCO1-Intensität
Phospho-Alpha-Synuclein-positiv (N = 19)	5129 (854-7368)
Phospho-Alpha-Synuclein-negativ (N = 38)	4847 (867-7176)
Signifikanz im Mann-Whitney-U-Test	nicht signifikant

Tabelle 36: Median (mit Minimum und Maximum) der relativen Fluoreszenzintensität eines mitochondrialen Markers bei Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern (N ist die Anzahl der untersuchten Nervenfasern)

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden die Struktur und die Funktion von Nervenfasern bei Patienten mit Morbus Parkinson oder atypischen Parkinson-Syndromen, insbesondere im Hinblick auf mögliche Einflüsse einer Ablagerung von phosphoryliertem Alpha-Synuclein, untersucht. Im Folgenden sind die wichtigsten Ergebnisse zusammengefasst.

Bei einigen Patienten konnte ein Vitamin B6-Mangel bzw. ein Homocystein- oder Methylmalonsäure-Überschuss festgestellt werden. Dabei war eine Erhöhung an Homocystein mit einer Erniedrigung der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials in der Suralis-Neurographie und einer verschlechterten Temperaturwahrnehmung in der QST verbunden. Zudem konnte eine signifikante negative Korrelation von Vitamin B6 sowie eine positive Korrelation von Homocystein mit der kumulativen L-Dopa-Dosis nachgewiesen werden.

Bei allen Patientengruppen lagen in der Suralis-Neurographie die Mediane der Nervenleitgeschwindigkeit und der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials im altersentsprechenden Normbereich.

In der QST war bei den Patienten mit Morbus Parkinson die Sensibilität gegenüber mechanischen und vibrierenden Reizen eingeschränkt, während die Schmerzempfindlichkeit auf spitze und stumpfe Reize verstärkt war. Auch die Patienten mit MSA empfanden Nadelreize und Druck als überdurchschnittlich unangenehm, während sie Vibrationen und Temperaturunterschiede nur erschwert wahrnehmen konnten. Bei den Tauopathie-Patienten wiederum war die Temperaturwahrnehmung generell vermindert.

Bei der Untersuchung der Hautbiopsien fanden sich Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen bei ca. 52 % der Patienten mit Morbus Parkinson sowie bei 67 % der Patienten mit MSA. Im Gegensatz dazu waren weder bei einem der Patienten mit einer Tauopathie noch bei einer gesunden Kontrollperson Ablagerungen nachweisbar.

Phosphoryliertes Alpha-Synuclein in den kleinen Nervenfasern der Haut konnte in allen Krankheitsstadien gleichermaßen festgestellt werden und auch zwischen den gewählten Biopsieentnahmestellen zeigten sich keine Unterschiede. Während die Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson phosphoryliertes Alpha-Synuclein vor allem in autonomen Strukturen zu akkumulieren schienen, war das Protein bei den MSA-Patienten insbesondere sub- und intraepidermal nachweisbar. Dabei waren Ablagerungen in allen Nervenfasersubtypen zu finden, verstärkt jedoch bei den Patienten mit Morbus Parkinson in CGRP- und VIP-haltigen Fasern und bei den Patienten mit MSA in TH-, SP- und CGRP-positiven Fasern.

Die intraepidermale Nervenfaserdichte am Rücken war insbesondere in höheren Krankheitsstadien bei den Patienten mit Morbus Parkinson sowie bei den Patienten mit einer Tauopathie gegenüber den gesunden Kontrollpersonen vermindert. Funktionell war eine verminderte intraepidermale Nervenfaserdichte mit einer geringeren Nervenleitgeschwindigkeit und einer geringeren Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials in der Suralis-Neurographie sowie mit einer verschlechterten Temperatur- und Schmerz-wahrnehmung in der QST verbunden.

Die Innervation der Schweißdrüsen war am Ober- und Unterschenkel der Patienten mit Morbus Parkinson gegenüber den Kontrollpersonen vermindert. Die Innervation der Musculi arrectores pilorum war zwar nicht generell verringert, zeigte jedoch am Ober- und Unterschenkel eine signifikante Verminderung, sofern Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachweisbar waren. Außerdem war eine Reduktion der Musculus arrector pili-Innervation mit schlechteren Werten in der NMS verknüpft.

Veränderungen von axonalen Transportproteinen, Mikrotubuli oder Mitochondrien durch Phospho-Alpha-Synuclein konnten nicht nachgewiesen werden.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung und Interpretation

4.2.1 Alpha-Synuclein als möglicher diagnostischer Marker für den Morbus Parkinson und die MSA

Seit Michell et al. 2005 Alpha-Synuclein in der Haut lebender Patienten untersucht hatten,¹¹ gab es zahlreiche Studien, die auf verschiedenste Weise versuchten, den Nachweis von Alpha-Synuclein in Hautnerven als Biomarker für den Morbus Parkinson und die MSA zu nutzen.^{12,14-17,31,33} Zwar waren die Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein bislang immer spezifisch für das Vorliegen einer Synucleinopathie, doch schwankte die Rate der Nachweisbarkeit zwischen den verschiedenen Forschungsgruppen enorm.^{12,14-17,31,33} Dies könnte auf die Verwendung verschiedener Antikörper und unterschiedlicher Biopsieentnahmestellen sowie auf eine unterschiedliche Anzahl an untersuchten Schnitten bzw. eine variierende Fläche des untersuchten Areals zurückzuführen sein. Die in der vorliegenden Studie für die idiopathischen Parkinson-Patienten erreichte Sensitivität von 52 % nach der Auswertung von 3 Hautbiopsien mit je 11 mikroskopierten Schnitten konnte daher durchaus als zu den bisherigen Daten konsistent gewertet werden. Bei Patienten mit MSA war unsere Studiengruppe hingegen die erste, der ein Nachweis von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in den kleinen Nervenfasern der Haut gelang.^{16,17,31,33} Mit einem Anteil an MSA-Patienten, bei denen Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachweisbar waren, von 67 % lag die Sensitivität sogar über der von den Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson.

Allerdings konnte die mehrfach propagierte zur Peripherie hin abnehmende Ablagerung des phosphorylierten Alpha-Synucleins in dieser Kohorte nicht bestätigt werden.^{12,14,31} So war bei etwa gleich vielen Patienten Phospho-Alpha-Synuclein in Nervenfasern des Rückens wie auch des Ober- und Unterschenkels nachweisbar und auch die Menge an Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern pro Fläche variierte an den verschiedenen Biopsiestellen nicht. Darüber hinaus waren Ablagerungen in Nervenfasern des Unterschenkels nicht erst

in höheren Krankheitsstadien oder nach einer längeren Erkrankungsdauer nachweisbar. Während frühere Untersuchungen somit auf eine Ausbreitung des phosphorylierten Alpha-Synucleins vom zentralen ins periphere Nervensystem hindeuteten,¹⁴ konnten die Ergebnisse der vorliegenden Studie diese Hypothese nicht stützen. Stattdessen bleibt die Möglichkeit offen, dass phosphoryliertes Alpha-Synuclein direkt in der Peripherie entsteht.

Zusätzlich wurde untersucht, ob die vorliegende Subform des idiopathischen Morbus Parkinson einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen zeigt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen akinetisch-rigidem, Tremor-dominantem und Äquivalenztyp festgestellt werden. Weder der Schweregrad der Erkrankung noch die Krankheitsdauer hatten einen Einfluss auf die Nachweisbarkeit und auch das Vorliegen eines Early-Onset-Parkinsons oder eine positive Familienanamnese hatten keine Relevanz. Zudem spielte es keine Rolle, ob die stärker oder die schwächer betroffene Körperhälfte der Patienten untersucht wurde. Prinzipiell kann phosphoryliertes Alpha-Synuclein somit bei allen untersuchten Subformen des Morbus Parkinson und in allen Krankheitsstadien nachgewiesen werden. Weshalb Phospho-Alpha-Synuclein dennoch nicht bei allen Patienten mit Morbus Parkinson zu finden ist, kann verschiedene Gründe haben. Zum einen gibt es Hinweise auf eine ungleichmäßige Verteilung des phosphorylierten Alpha-Synucleins im peripheren Nervensystem, sodass ein Nachweis trotz der Untersuchung mehrerer Hautproben nicht gesichert ist.¹⁴ Zum anderen wurde die Diagnose eines Morbus Parkinson bei den untersuchten Patienten anhand klinischer Befunde gestellt, sodass die Diagnosesicherheit bei nur 70 bis 90 % liegt.^{32,87,101,102}

Letztlich kann man sagen, dass der Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in den Nervenfasern der Haut einen sehr spezifischen Marker für den Morbus Parkinson und die MSA darstellt, der zur Abgrenzung von gesunden Kontrollpersonen sowie von Patienten mit einer Tauopathie dienen kann. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang auch die Tatsache, dass Phospho-Alpha-Synuclein in allen Krankheitsstadien nachgewiesen werden kann, wodurch es möglich wird, schon in frühen Stadien eine histopathologische Diagnose zu stellen. Die Sensitivität der Methode, das heißt die Wahrscheinlichkeit, bei

einem erkrankten Patienten tatsächlich ein positives Ergebnis zu erzielen, liegt hingegen nach der Analyse mehrerer Schnittebenen bei nur gut 50 %. Für eine zuverlässige diagnostische Nutzung ist daher wohl die Auswertung mehrerer Biopsieentnahmestellen mit einigen Schnitten notwendig. In einer kürzlich von unserer Arbeitsgruppe publizierten Studie mit einer zusätzlichen Biopsieentnahmestelle im Nacken und einer Aufarbeitung der Biopsate durch Stufenschnitte bei ansonsten identischem Protokoll konnte für Patienten im Hoehn-und-Yahr-Stadium 1 oder 2 eine Sensitivität von 80 % erreicht werden.¹⁰³

4.2.2 Verteilung von Alpha-Synuclein im peripheren Nervensystem

Während die Suche nach einem möglichen Biomarker für den Morbus Parkinson und die MSA bereits viele Forschungsgruppen beschäftigte,^{11,12,14-17,31,33} wurde die genaue Lokalisation und Spezifikation der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Nervenfasern bisher kaum analysiert.^{13-15,32,33} Darüber hinaus beinhaltet die vorliegende Studie die erste größere Kohorte an Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen.^{16,17,31,33}

Als Erstes wurde geprüft, innerhalb welcher Strukturen der Haut Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachweisbar waren. Bei den Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson konnten dabei die Ergebnisse anderer Studiengruppen bestätigt werden, wonach neben dermalen Nervenfaserbündeln insbesondere autonome Strukturen, wie Gefäße, Schweißdrüsen und Musculi arrectores pilorum, betroffen waren.^{13,14,32} Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten idiopathischen Parkinson-Patienten ließen sich zudem Hinweise darauf finden, dass somatosensible Nervenfasern erst später als autonome Nervenfasern von einer Akkumulation des phosphorylierten Alpha-Synucleins betroffen waren. Im Gegensatz dazu fanden sich Ablagerungen bei den Patienten mit MSA jedoch außer in dermalen Nervenfaserbündeln überwiegend innerhalb somatosensibler sub- und intraepidermaler Fasern.³³ Dies erklärt auch, weshalb Zange et al. 2015 bei ihren MSA-Patienten keine Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen nachweisen konnten.^{17,104} Auf Grundlage früherer Ergebnisse, wonach eine Akkumulation an phosphoryliertem Alpha-Synuclein bei Parkinson-Patienten bevorzugt in Gefäßen, Arrector pili-Muskeln und Schweißdrüsen vorkam, beschlossen sie, sich auf die Untersuchung der autonomen

Strukturen zu beschränken.¹⁷ Da jedoch zumindest bei den Patienten mit MSA der vorliegenden Studie eine Vielzahl der Phospho-Alpha-Synuclein-positiven Fasern innerhalb dermalen Nervenfaserbündel bzw. sub- oder intraepidermal gelegen war, würde ein Großteil der positiven Fasern durch das vereinfachte Auswertungsprotokoll von Zange et al. zwangsläufig unberücksichtigt bleiben.¹⁰⁴

Zusätzlich wurden die kleinen Nervenfasern der Haut mit Antikörpern gegen CGRP, SP, TH und VIP markiert und nach Kollokationen mit phosphoryliertem Alpha-Synuclein gesucht. Dabei konnten Ablagerungen in allen untersuchten Nervenfasersubtypen nachgewiesen werden. Die in dem ersten Patientenkollektiv entdeckte Bevorzugung der TH-haltigen Nervenfasern ließ sich in den aktuellen Untersuchungen jedoch nicht bestätigen.^{32,33} Stattdessen waren bei den idiopathischen Parkinson-Patienten vor allem CGRP- und VIP-positive Fasern betroffen, während bei den atypischen Parkinson-Patienten vorzugsweise TH-, SP- und CGRP-haltige Fasern Akkumulationen aufwiesen. Insgesamt fügen sich die Ergebnisse jedoch gut in die Befunde in anderen Regionen des Nervensystems ein, da auch dort Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen bereits in allen in der vorliegenden Studie untersuchten Nervenfasersubtypen zu finden waren.³⁴⁻³⁷ Den von Braak et al. beschriebenen, pathologisch-anatomischen Stadien zu Folge sind parasympathische Kerngebiete in der Medulla oblongata sogar vor der Substantia nigra von einer Lewy-Körper-Pathologie betroffen.^{3,58} Und auch Degenerationen peptiderger Kerne im Hirnstamm wurden bereits beschrieben.¹⁰⁵ Somit unterstützen die aktuellen Ergebnisse die Hypothese einer umfassenden Beteiligung verschiedenster Bereiche des Nervensystems in der Pathophysiologie des Morbus Parkinson.

4.2.3 Periphere Nervenschädigungen bei Parkinson-Syndromen

Ziel dieser Studie war es jedoch nicht nur nach Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut zu suchen und deren Lokalisation näher zu definieren, sondern es sollten auch mögliche Verknüpfungen zu Störungen der Nervenfunktion bei Parkinson-Syndromen untersucht werden.

Trotz mehrfacher Hinweise in der Literatur auf das Vorliegen einer Polyneuropathie bei Patienten mit Morbus Parkinson,^{42,46-49} konnte in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis bei den untersuchten idiopathischen Parkinson-Patienten keine Beeinträchtigung der Nervenfunktion festgestellt werden. Ebenso war eine Korrelation von verminderten Werten zur kumulativen L-Dopa-Dosis entgegen den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen nicht erkennbar.^{42,46-49}

Allerdings waren auch bei einigen Patienten der vorliegenden Studie Veränderungen in Vitaminspiegeln nachweisbar, die gegebenenfalls auf die Entstehung einer Polyneuropathie hindeuten könnten.^{3,42,46-50} Insbesondere waren erniedrigte Vitamin B6-Spiegel sowie, auf einen latenten Vitamin B12-Mangel hindeutende, erhöhte Homocystein-Spiegel nachweisbar. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung an Homocystein mit einer Erniedrigung der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotenzials in der Suralis-Neurographie und einer Erhöhung einiger Schwellenwerte in der QST verbunden war. Da zudem eine signifikante negative Korrelation von Vitamin B6 sowie eine positive Korrelation von Homocystein mit der kumulativen L-Dopa-Dosis bestand, kann eine Schädigung von Nervenfasern durch L-Dopa, entsprechend den Veröffentlichungen in der Literatur, weiterhin als möglich gelten.^{42,46-49} Allerdings war die bisher verabreichte L-Dopa-Menge auch abhängig von der Erkrankungsdauer, sodass der kausale Zusammenhang zwischen L-Dopa-Gabe und Änderung der Vitaminspiegel nicht endgültig geklärt werden konnte.

Analog zu den Ergebnissen von Nolano et al. zeigten auch die idiopathischen Parkinson-Patienten dieses Kollektivs eine verminderte taktile Wahrnehmung über die A β -Fasern.⁴³ Erkennbar war dies an erhöhten Schwellenwerten für die Wahrnehmung von Berührung und Vibration. Im Gegensatz zu der Publikation von Nolano et al. waren sie jedoch über die nozizeptiven A δ - und C-Fasern empfindlicher gegenüber mechanischen Schmerzen durch Nadelreizstimulatoren und auch Druck empfanden sie schneller als unangenehm.⁴³ Ähnlich wie bei den Patienten mit Morbus Parkinson konnte auch bei den Patienten mit MSA eine verminderte Vibrationswahrnehmung bei gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber Nadelreizen und Druck nachgewiesen werden. Anders als die anderen Patientengruppen wiesen

die untersuchten Patienten mit einer Tauopathie gegenüber den Kontrollpersonen hingegen eine verminderte Kälte- und Wärmewahrnehmung über A δ - und C-Fasern auf. Bei der Untersuchung, welchen Einfluss der Nachweis von phosphoryliertem Alpha Synuclein in den kleinen Nervenfasern der Haut auf die Werte in der QST hat, konnten eine erhöhte taktile Wahrnehmungsschwelle am Fuß sowie eine erniedrigte Wärmewahrnehmungsschwelle an der Wange festgestellt werden.

Wie von anderen Arbeitsgruppen zuvor veröffentlicht, konnte auch in dieser Studie bei den Parkinson-Patienten teilweise eine signifikante Verminderung der intraepidermalen Nervenfaserdichte gefunden werden, welche auf das Vorliegen einer Small-Fiber-Neuropathie hinweisen könnte.^{3,13,42,43} Die Hypothese einer längenabhängigen Abnahme der Nervenfaserdichte, im Sinne einer Dying-back-Neuropathie, ließ sich jedoch nicht bestätigen.³² Zwar war eine deutliche Abnahme der intraepidermalen Nervenfasern von proximal nach distal sichtbar, allerdings war dieser Trend bei Kontrollpersonen wie Patienten gleichermaßen vorhanden. Eine gegenüber den Kontrollpersonen signifikant verminderte Innervation war hingegen lediglich am Rücken der Patienten mit Morbus Parkinson aber auch der Patienten mit einer Tauopathie erkennbar. Diese Reduktion war mit zunehmendem Hoehn-und-Yahr-Stadium der Patienten verstärkt. Zudem konnte eine Korrelation einer verminderten intraepidermalen Nervenfaserdichte mit einer geringeren Nervenleitgeschwindigkeit und einer niedrigeren Amplitude in der Suralis-Neurographie sowie mit einer verminderten Temperatur- und Schmerzwahrnehmung in der QST nachgewiesen werden. Anders als bei Donadio et al. fand sich jedoch kein Bezug zu dem Vorhandensein an Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen.^{14,42}

Insgesamt kann eine Schädigung peripherer, sensibler Nerven bei Morbus Parkinson weiterhin als möglich gelten, wobei jedoch eher die kleinen Nervenfasern der Haut als die größeren Nerven betroffen zu sein scheinen. Dabei ist die Ätiologie dieser Nervenschädigungen weiterhin unklar. Die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen scheinen jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da lediglich einige Veränderungen in der QST mit ihnen in Verbindung gebracht werden konnten. Stattdessen konnten, analog zu den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen, auch in der vorliegenden Studie Hinweise auf

Veränderungen von Vitaminspiegeln gefunden werden, die mit einer L-Dopa-Therapie in Verbindung stehen könnten.^{42,46-49}

4.2.4 Störungen des autonomen Nervensystems bei Parkinson-Syndromen

Neben einer Beeinträchtigung der sensiblen Nerven, konnten verschiedene Arbeitsgruppen auch bereits eine Beteiligung des autonomen Nervensystems bei Morbus Parkinson feststellen.⁵²⁻⁵⁴ Während Dabby et al. jedoch in der Haut von Parkinson-Patienten eine schlechtere Innervation von Schweißdrüsen und Haarbalgmuskeln feststellen konnten,⁵⁴ konnte in der vorliegenden Studie nur für die Schweißdrüsen am Ober- und Unterschenkel, nicht jedoch für die Arrector pili-Muskeln, eine verminderte Innervation gegenüber den Kontrollpersonen gezeigt werden. Der von Wang et al. gefundene Zusammenhang zwischen verstärkter Alpha-Synuclein-Akkumulation und verminderter Innervation autonomer Strukturen,¹³ konnte in der vorliegenden Studie hingegen nur für die Musculus arrector pili-Innervation am Ober- und Unterschenkel bestätigt werden. Zudem konnte für die Innervation der Haarbalgmuskeln ein Bezug zu den, über den NMS-Fragebogen erhobenen, klinischen Einschränkungen der Patienten aufgezeigt werden.

Auch wenn das Vorhandensein autonomer Störungen gerade bei Patienten mit MSA vorherrschend ist³ und einige Studien bereits Hinweise auf Veränderungen peripherer autonomer Nerven zeigen konnten,⁵⁵⁻⁵⁷ waren in der vorliegenden Studie keine signifikanten Unterschiede in der Innervation der Schweißdrüsen und der Musculi arrectores pilorum zwischen den MSA-Patienten und den Kontrollpersonen feststellbar.

Ein direkter Vergleich der aktuellen Ergebnisse mit denen anderer Studiengruppen war an dieser Stelle insgesamt nur eingeschränkt möglich, da sich die Methodik meist stark unterschied. Dennoch ergaben sich, wie bei anderen Autoren zuvor, Hinweise auf eine autonome Denervierung bei Patienten mit Morbus Parkinson^{53,54} und auch ein Zusammenhang mit einer Akkumulation an phosphoryliertem Alpha-Synuclein kann weiterhin als möglich gelten.^{13,14,106}

4.2.5 Pathogenese des Morbus Parkinson

4.2.5.1 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

Zahlreiche Studien waren bereits mittels verschiedenster Techniken damit beschäftigt, die pathogenetische Relevanz des Alpha-Synucleins bei Morbus Parkinson zu ergründen.^{23,26,28,41,59-61,63,64,74,76,78,79,81,83-85,107}

Mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie von Hautbiopsien konnten dazu durch die vorliegende Studie wichtige in vivo erhobene Befunde beigesteuert werden. Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen konnten dabei in allen Krankheitsstadien, unabhängig von der Krankheitsdauer und dem Schweregrad der Erkrankung sowie dem Alter der Patienten, gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass die Ablagerung von phosphoryliertem Alpha-Synuclein bereits frühzeitig in der Haut von Parkinson-Patienten stattfindet und im Verlauf der Erkrankung konstant bleibt. Die frühe Ablagerung von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in der Haut wird durch die kürzlich erschienene Studie unserer Arbeitsgruppe unterstützt, die phosphoryliertes Alpha-Synuclein auch bei Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörung in Hautnerven nachweisen konnte.¹⁰³ Diese Schlafstörung stellt in einem Großteil der Fälle eine prämotorische Vorstufe einer Synucleinopathie dar.^{103,108,109} Eine negative Korrelation zeigte die Menge an Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen zur kumulativen L-Dopa-Dosis. Die Relevanz dieses Zusammenhangs ist jedoch fraglich.

Ein Zusammenhang mit Nervenschädigungen ließ sich nur bei der Innervation der Musculi arrectores pilorum nachweisen, während die Suralis-Neurographie, die intraepidermale Nervenfaserdichte sowie die Innervation der Schweißdrüsen unbeeinflusst blieben. Auch in der QST waren lediglich Hinweise auf eine verminderte Berührungsempfindlichkeit am Fuß sowie eine verstärkte Wärmewahrnehmung an der Wange zu finden.

Hinweise auf Verluste kleiner Nervenfasern oder Funktionseinschränkungen größerer Nerven durch Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen konnten durch die vorliegende Studie somit nicht erhärtet werden. Stattdessen besteht die Möglichkeit, dass doch andere Faktoren zu einem Untergang an Nervenfasern führen. Auch im zentralen Nervensystem ist

noch immer nicht endgültig geklärt, ob Alpha-Synuclein tatsächlich die entscheidende pathogenetische Relevanz hat, von der aktuell ausgegangen wird.^{22,23,26,28,59-61,64,74,76,78,79,81,83-85,107} Bei der vorliegenden Studie gilt es jedoch auch zu beachten, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv insgesamt nur teilweise periphere Nervenschädigungen nachweisbar waren. Dadurch ist fraglich, inwiefern überhaupt ein Zusammenhang zu Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen geprüft werden kann.

4.2.5.2 Beeinträchtigung des axonalen Transports und Veränderungen der Mitochondrien

Zur näheren Betrachtung der pathophysiologischen Hintergründe wurde, anknüpfend an Ergebnisse anderer Forschungsgruppen, eine mögliche Beeinträchtigung des Transports entlang neuronaler Axone durch phosphoryliertes Alpha-Synuclein untersucht.^{27,37,60,66-68}

Während Chu et al. eine Alpha-Synuclein-abhängige Reduktion der Dynein- und Kinesin-Level im Gehirn von Parkinson-Patienten sowie im Tiermodell mit Ratten, die eine A30P Mutation im Alpha-Synuclein-Gen aufwiesen, zeigen konnten,³⁷ gelang es in der vorliegenden Studie nicht, diese Ergebnisse auf das periphere Nervensystem zu übertragen. Stattdessen waren in den Nervenfasern der Haut keine Intensitätsunterschiede der Fluoreszenzfärbung zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Fasern erkennbar.

Weiterhin waren in der Färbung der posttranslational modifizierten Mikrotubuli, trotz in der Literatur vermehrt auftretender Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Mikrotubuli-Struktur,⁶⁶⁻⁶⁸ keine qualitativen Unterschiede zwischen Nervenfasern mit oder ohne Phospho-Alpha-Synuclein erkennbar.

Auch für einen möglichen pathophysiologischen Zusammenhang zwischen Alpha-Synuclein und der Struktur bzw. der Funktion der Mitochondrien konnten andere Forschungsgruppen bereits Hinweise in verschiedenen Tiermodellen und Experimenten finden.^{26,74,77-85} In der Fluoreszenzmikroskopie mit einem Antikörper gegen eine mitochondriale Cytochrom-c-Oxidase ließen sich jedoch wiederum keine Intensitäts-

unterschiede zwischen Phospho-Alpha-Synuclein-positiven und -negativen Nervenfasern erkennen, die auf eine mitochondriale Schädigung hinweisen könnten.

Durch den Vergleich der Färbung zwischen Nervenfasern, die Phospho-Alpha-Synuclein enthielten, und denen ohne solche Ablagerungen konnte ein indirekter Vergleich der enthaltenen Menge des untersuchten Proteins erfolgen. Allerdings wurden dadurch immer nur Veränderungen in Untereinheiten der untersuchten Strukturen erfasst, sodass nur eine Aussage über diese Subgruppen möglich war. Möglicherweise sind die untersuchten Marker nicht optimal geeignet, um die untersuchten pathophysiologischen Veränderungen anzuzeigen, oder aber der degenerative Effekt ist nicht ausreichend, um immunhistochemisch nachweisbare Intensitätsunterschiede hervorzurufen. Die vorliegende Studie spricht somit gegen eine schwerwiegende Beeinträchtigung der untersuchten Proteine, andere Veränderungen axonaler Transportproteine, Mikrotubuli oder Mitochondrien konnten anhand der vorliegenden Ergebnisse jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch funktionelle Störungen wurden durch die angewandte Methode nicht erfasst.

4.3 Limitationen der vorliegenden Studie und Ausblick

4.3.1 Begrenzte Fallzahl

Die Aussagekraft einer Studie wird nicht zuletzt von der Zahl der untersuchten Fälle bestimmt. Die rekrutierte Kohorte umfasste mit 92 Patienten ein Vielfaches der Teilnehmerzahl vergleichbarer Studien.^{12,14} Da in der vorliegenden Studie jedoch lebende Personen untersucht wurden, fiel die Patientenzahl deutlich geringer aus, als zum Beispiel bei der Autopsiestudie von Ikemura et al. mit Fallzahlen um die 300 Patienten.³¹ So gibt es weiterhin Fragen, zu denen verschiedene Studien inkonsistente Ergebnisse zeigten. Um zum Beispiel auch im Hinblick auf mögliche periphere Nervenfaserschädigungen sowie Störungen des autonomen Nervensystems bei Parkinson-Syndromen eine valide Aussage treffen zu können, ist eine Weiterführung der Forschung mit größeren Fallzahlen in diesem Bereich erstrebenswert.^{42,50,53}

4.3.2 Limitiertes Untersuchungsareal

Auch die untersuchte Hautfläche war aus ethischen Gründen zwangsläufig limitiert. Durch die Biopsieentnahme an drei verschiedenen Hautarealen, an denen jeweils 11 konsekutive Schnitte untersucht wurden, gelang es jedoch eine grundlegende Analyse zu gewährleisten. Um die Sensitivität der Methode von um die 50 % noch weiter zu steigern, ist es nahe liegend, das untersuchte Areal zu vergrößern. In der vor Kurzem veröffentlichten Studie unserer Arbeitsgruppe gelang es bei sonst gleichem Vorgehen mit einer zusätzlichen Biopsieentnahmestelle im Nacken und einer Aufarbeitung der Biopsate durch Stufenschnitte für Patienten in den Hoehn-und-Yahr-Stadien 1 oder 2 eine Sensitivität von 80 % zu erreichen.¹⁰³

4.3.3 Vorselektierte Studienpopulation

Für die vorliegende Studie wurden fast ausschließlich Parkinson-Patienten rekrutiert, die stationär in der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg waren. Dadurch wurden viele Patienten mit mittleren Hoehn-und-Yahr-Stadien erfasst, während die leichten und schweren Fälle unterrepräsentiert blieben. Dabei wären gerade die niedrigen Hoehn-und-Yahr-Stadien oder sogar die prämotorischen Stadien interessant, da in diesen Fällen ein Nachweis von phosphoryliertem Alpha-Synuclein nicht nur einen Weg zur Diagnose-sicherung darstellt, sondern sich auch als ein Mittel zur Früherkennung eignen könnte. Hinweise auf eine frühe Ablagerung und eine prämotorische Beteiligung ergeben sich aus dem Nachweis von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in Hautnerven von Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörung und Patienten mit Morbus Parkinson in den Hoehn-und-Yahr-Stadien 1 und 2 in der vor Kurzem durch unsere Arbeitsgruppe publizierten Studie.¹⁰³

In der vorliegenden Studie ist zudem der deutliche Männerüberschuss bei den idiopathischen Parkinson-Patienten auffällig, der den Vergleich mit den Kontrollpersonen in den Nervendichtemessungen erschwert.

Zu berücksichtigen ist außerdem, dass auch die Kontrollpersonen aus organisatorischen Gründen meist Patienten der Neurologischen Klinik waren. Durch die Beachtung strenger

Ein- und Ausschlusskriterien war es dennoch möglich ein geeignetes Kontrollkollektiv für die Studie zu gewinnen.

4.3.4 Eingeschränkte Aussagekraft der Methoden

Schließlich ist die Aussagekraft der dargestellten Ergebnisse grundlegend abhängig von der Wahl der angewandten Methoden. Im Hinblick auf ein Kernziel dieser Studie, nämlich die Etablierung eines Biomarkers der Parkinson-Krankheit, war die Auswahl eines vergleichsweise leicht durchführbaren Verfahrens wie der Fluoreszenzmikroskopie sinnvoll. Auch die Ausbreitungswege der Alpha-Synuclein-Pathologie in den Nerven der Haut konnte untersucht werden. Nichtsdestotrotz können bei der Auswertung Schwierigkeiten auftreten, die durch die Qualität der Färbung bzw. das Auftreten unspezifischer Färbungen begründet sein können. Auch die Wahl der verwendeten Antikörper kann deutliche Unterschiede verursachen, zumal diese nur an bestimmte Untereinheiten der untersuchten Strukturen binden, sodass die Aussagekraft der Ergebnisse auf diese Subgruppen beschränkt blieb. So bleibt es wichtig die pathophysiologische Rolle des Phospho-Alpha-Synucleins bei der Entstehung des Morbus Parkinson anhand immer neuer Methoden weiter zu ergründen.^{26-28,64,74}

5 Zusammenfassung

Zielsetzung der Studie war es, Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins in der Haut von Patienten mit Morbus Parkinson und atypischen Parkinson-Syndromen zu untersuchen und deren Auswirkungen auf das periphere Nervensystem zu erforschen.

Dazu wurden Hautbiopsien von 92 Patienten mit Morbus Parkinson, 12 Patienten mit MSA und 13 Patienten mit einer Tauopathie sowie 83 gesunden Kontrollpersonen immunhistochemisch gefärbt und unter dem Mikroskop untersucht.

Mit einer Sensitivität von 52 % für den Morbus Parkinson und 67 % für die MSA bei hoher Spezifität stellt der Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein in den kleinen Nervenfasern der Haut einen geeigneten Biomarker dar. Während die Ablagerungen des phosphorylierten Alpha-Synucleins bei Patienten mit Morbus Parkinson eher in autonomen Strukturen nachweisbar waren, fanden sie sich bei Patienten mit MSA eher in sub- und intraepidermal gelegenen Nervenfasern. Phospho-Alpha-Synuclein konnte in allen untersuchten Nervenfasersubtypen nachgewiesen werden, also in CGRP-, SP-, TH- und VIP-positiven Fasern. Bei den in der vorliegenden Studie untersuchten Parkinson-Patienten waren keine Veränderungen in der sensiblen Neurographie des Nervus suralis erkennbar. Die intraepidermale Nervenfaserdichte sowie die Innervation der Schweißdrüsen waren jedoch teilweise vermindert und auch in der QST zeigten sich Auffälligkeiten. Ein Zusammenhang zu dem Vorhandensein von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen konnte jedoch nur für die Innervation der Musculi arrectores pilorum hergestellt werden. Bei der Untersuchung der pathophysiologischen Hintergründe, durch die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen zu Nervenfaserschädigungen führen, konnten die Hinweise auf eine Beteiligung von axonalen Transportproteinen, Mikrotubuli oder Mitochondrien nicht erhärtet werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Studie einen wichtigen Beitrag zur Erforschung von Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut lebender Patienten mit idiopathischem Morbus Parkinson und Patienten mit atypischen Parkinson-Syndromen lieferte. Dank des großen Studienkollektivs war eine valide Aussage über die

Möglichkeit der Verwendung von Phospho-Alpha-Synuclein als Biomarker möglich. Außerdem gelang es anhand der Bestimmung von sensiblen und autonomen Nervenfaserdichten sowie der Durchführung von Nervenfunktionstests, wie der sensiblen Neurographie des Nervus suralis und der QST, im Zusammenspiel mit Vitaminbestimmungen, Fragebögen und klinischen Daten, ein umfassendes Bild der Beteiligung des peripheren Nervensystems bei Parkinson-Syndromen zu erheben.

6 Literaturverzeichnis

- 1 de Lau, L. M. L. & Breteler, M. M. B. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* **5**, 525-535 (2006).
- 2 Eggert, K. M., Oertel, W. H. & Reichmann, H. Konsensbasierte (S2k) Leitlinie - Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften* (2012).
- 3 Mattle, H. & Mumenthaler, M. *Neurologie*. (Georg Thieme Verlag, 2012).
- 4 Aumüller, G., Aust, G., Engele, J., Kirsch, J., Maio, G., Mayerhofer, A., Mense, S., Reißig, D., Salvetter, J., Schmidt, W., Schmitz, F., Schulte, E., Spanel-Borowski, K., Wennemuth, G., Wolff, W., Wurziinger, L. J. & Zilch, H.-G. *Duale Reihe* (Georg Thieme Verlag, 2014).
- 5 Hoehn, M. M. & Yahr, M. D. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* **17**, 427-442 (1967).
- 6 Goetz, C. G., Tilley, B. C., Shaftman, S. R., Stebbins, G. T., Fahn, S., Martinez-Martin, P., Poewe, W., Sampaio, C., Stern, M. B., Dodel, R., Dubois, B., Holloway, R., Jankovic, J., Kulisevsky, J., Lang, A. E., Lees, A., Leurgans, S., LeWitt, P. A., Nyenhuis, D., Olanow, C. W., Rascol, O., Schrag, A., Teresi, J. A., van Hilten, J. J. & LaPelle, N. Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **23**, 2129-2170 (2008).
- 7 Storch, A., Odin, P., Trender-Gerhard, I., Fuchs, G., Reifschneider, G., Ray Chaudhuri, K., Jost, W. H. & Ebersbach, G. Non-motor Symptoms Questionnaire and Scale for Parkinson's disease. Cross-cultural adaptation into the German language. *Der Nervenarzt* **81**, 980-985 (2010).
- 8 Chaudhuri, K. R., Martinez-Martin, P., Brown, R. G., Sethi, K., Stocchi, F., Odin, P., Ondo, W., Abe, K., MacPhee, G., MacMahon, D., Barone, P., Rabey, M., Forbes, A., Breen, K., Tluk, S., Naidu, Y., Olanow, W., Williams, A. J., Thomas, S., Rye, D., Tsuboi, Y., Hand, A. & Schapira, A. H. V. The metric properties of a novel non-motor symptoms scale for Parkinson's disease: Results from an international pilot study. *Movement Disorders* **22**, 1901-1911 (2007).
- 9 Daroff, R. B. & Aminoff, M. J. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. (Elsevier Science, 2014).
- 10 Goedert, M., Spillantini, M. G., Del Tredici, K. & Braak, H. 100 years of Lewy pathology. *Nature Reviews Neurology* **9**, 13-24 (2013).
- 11 Michell, A. W., Luheshi, L. M. & Barker, R. A. Skin and platelet α -synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* **381**, 294-298 (2005).

- 12 Miki, Y., Tomiyama, M., Ueno, T., Haga, R., Nishijima, H., Suzuki, C., Mori, F., Kaimori, M., Baba, M. & Wakabayashi, K. Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neuroscience Letters* **469**, 357-359 (2010).
- 13 Wang, N., Gibbons, C. H., Lafo, J. & Freeman, R. α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* **81**, 1604-1610 (2013).
- 14 Donadio, V., Incensi, A., Leta, V., Giannoccaro, M. P., Scaglione, C., Martinelli, P., Capellari, S., Avoni, P., Baruzzi, A. & Liguori, R. Skin nerve α -synuclein deposits: A biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology* **82**, 1362-1369 (2014).
- 15 Rodriguez-Leyva, I., Calderon-Garciduenas, A. L., Jimenez-Capdeville, M. E., Renteria-Palomo, A. A., Hernandez-Rodriguez, H. G., Valdes-Rodriguez, R., Fuentes-Ahumada, C., Torres-Alvarez, B., Sepulveda-Saavedra, J., Soto-Dominguez, A., Santoyo, M. E., Rodriguez-Moreno, J. I. & Castanedo-Cazares, J. P. α -Synuclein inclusions in the skin of Parkinson's disease and parkinsonism. *Annals of clinical and translational neurology* **1**, 471-478 (2014).
- 16 Haga, R., Sugimoto, K., Nishijima, H., Miki, Y., Suzuki, C., Wakabayashi, K., Baba, M., Yagihashi, S. & Tomiyama, M. Clinical Utility of Skin Biopsy in Differentiating between Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. *Parkinson's Disease* **2015**, 7 (2015).
- 17 Zange, L., Noack, C., Hahn, K., Stenzel, W. & Lipp, A. Phosphorylated α -synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. *Brain* **138**, 2310-2321 (2015).
- 18 Maroteaux, L., Campanelli, J. T. & Scheller, R. H. Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **8**, 2804-2815 (1988).
- 19 Jakes, R., Spillantini, M. G. & Goedert, M. Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Letters* **345**, 27-32 (1994).
- 20 Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., Pike, B., Root, H., Rubenstein, J., Boyer, R., Stenroos, E. S., Chandrasekharappa, S., Athanassiadou, A., Papapetropoulos, T., Johnson, W. G., Lazzarini, A. M., Duvoisin, R. C., Di Iorio, G., Golbe, L. I. & Nussbaum, R. L. Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. *Science* **276**, 2045-2047 (1997).
- 21 Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M. Y., Trojanowski, J. Q., Jakes, R. & Goedert, M. α -Synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840 (1997).
- 22 Snead, D. & Eliezer, D. Alpha-Synuclein Function and Dysfunction on Cellular Membranes. *Experimental Neurobiology* **23**, 292-313 (2014).
- 23 Watson, J. B., Hatami, A., David, H., Masliah, E., Roberts, K., Evans, C. E. & Levine, M. S. Alterations in Corticostriatal Synaptic Plasticity in Mice Over-Expressing Human α -Synuclein. *Neuroscience* **159**, 501-513 (2009).

- 24 Burré, J., Sharma, M., Tsetsenis, T., Buchman, V., Etherton, M. & Südhof, T. C. α -Synuclein Promotes SNARE-Complex Assembly in vivo and in vitro. *Science* **329**, 1663-1667 (2010).
- 25 Murphy, D. D., Rueter, S. M., Trojanowski, J. Q. & Lee, V. M. Synucleins are developmentally expressed, and α -synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**, 3214-3220 (2000).
- 26 Gallegos, S., Pacheco, C., Peters, C., Opazo, C. M. & Aguayo, L. G. Features of alpha-synuclein that could explain the progression and irreversibility of Parkinson's disease. *Frontiers in neuroscience* **9**, 59 (2015).
- 27 Hunn, B. H., Cragg, S. J., Bolam, J. P., Spillantini, M. G. & Wade-Martins, R. Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends in neurosciences* **38**, 178-188 (2015).
- 28 Villar-Pique, A., da Fonseca, T. L. & Outeiro, T. F. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. *Journal of neurochemistry* (2015).
- 29 Fujiwara, H., Hasegawa, M., Dohmae, N., Kawashima, A., Masliah, E., Goldberg, M. S., Shen, J., Takio, K. & Iwatsubo, T. α -Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nature cell biology* **4**, 160-164 (2002).
- 30 Dickson, D. W., Lin, W., Liu, W. K. & Yen, S. H. Multiple system atrophy: a sporadic synucleinopathy. *Brain Pathology* **9**, 721-732 (1999).
- 31 Ikemura, M., Saito, Y., Sengoku, R., Sakiyama, Y., Hatsuta, H., Kanemaru, K., Sawabe, M., Arai, T., Ito, G., Iwatsubo, T., Fukayama, M. & Murayama, S. Lewy body pathology involves cutaneous nerves. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **67**, 945-953 (2008).
- 32 Doppler, K., Ebert, S., Uceyler, N., Trenkwalder, C., Ebentheuer, J., Volkmann, J. & Sommer, C. Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. *Acta neuropathologica* **128**, 99-109 (2014).
- 33 Doppler, K., Weis, J., Karl, K., Ebert, S., Ebentheuer, J., Trenkwalder, C., Klebe, S., Volkmann, J. & Sommer, C. Distinctive Distribution of Phospho-Alpha-Synuclein in Dermal Nerves in Multiple System Atrophy. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* (2015).
- 34 Kuljis, R. O., Martin-Vasallo, P. & Peress, N. S. Lewy bodies in tyrosine hydroxylase-synthesizing neurons of the human cerebral cortex. *Neuroscience Letters* **106**, 49-54 (1989).
- 35 Wakabayashi, K., Takahashi, H., Ohama, E. & Ikuta, F. Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta neuropathologica* **79**, 581-583 (1990).
- 36 Gai, W. P., Halliday, G. M., Blumbergs, P. C., Geffen, L. B. & Blessing, W. W. Substance P-containing neurons in the mesopontine tegmentum are severely affected in Parkinson's disease. *Brain* **114 (Pt 5)**, 2253-2267 (1991).

- 37 Chu, Y., Morfini, G. A., Langhamer, L. B., He, Y., Brady, S. T. & Kordower, J. H. Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain* **135**, 2058-2073 (2012).
- 38 Feve, A. P. Current status of tyrosine hydroxylase in management of Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **11**, 450-455 (2012).
- 39 Tabrez, S., Jabir, N. R., Shakil, S., Greig, N. H., Alam, Q., Abuzenadah, A. M., Damanhour, G. A. & Kamal, M. A. A synopsis on the role of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **11**, 395-409 (2012).
- 40 Zhu, Y., Zhang, J. & Zeng, Y. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **11**, 350-358 (2012).
- 41 Li, Y. H., Gao, N., Ye, Y. W., Li, X., Yu, S., Yang, H., Ueda, K. & Chan, P. Alpha-synuclein functions as a negative regulator for expression of tyrosine hydroxylase. *Acta neurologica Belgica* **111**, 130-135 (2011).
- 42 Comi, C., Magistrelli, L., Oggioni, G. D., Carecchio, M., Fleetwood, T., Cantello, R., Mancini, F. & Antonini, A. Peripheral nervous system involvement in Parkinson's disease: evidence and controversies. *Parkinsonism & related disorders* **20**, 1329-1334 (2014).
- 43 Nolano, M., Provitera, V., Estraneo, A., Selim, M. M., Caporaso, G., Stancanelli, A., Saltalamacchia, A. M., Lanzillo, B. & Santoro, L. Sensory deficit in Parkinson's disease: evidence of a cutaneous denervation. *Brain* **131**, 1903-1911 (2008).
- 44 Kass-Iliyya, L., Javed, S., Gosal, D., Kobylecki, C., Marshall, A., Petropoulos, I. N., Ponirakis, G., Tavakoli, M., Ferdousi, M., Chaudhuri, K. R., Jeziorska, M., Malik, R. A. & Silverdale, M. A. Small fiber neuropathy in Parkinson's disease: A clinical, pathological and corneal confocal microscopy study. *Parkinsonism & related disorders* **21**, 1454-1460 (2015).
- 45 Chovancova, Z., Kanovsky, P., Dufek, J., Nevrlý, M. & Otruba, P. Peripheral nerve involvement and severity of motor disorder in Parkinson's disease: a correlational study. *Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacky, Olomouc, Czechoslovakia* **153**, 59-62 (2009).
- 46 Toth, C., Breithaupt, K., Ge, S., Duan, Y., Terris, J. M., Thiessen, A., Wiebe, S., Zochodne, D. W. & Suchowersky, O. Levodopa, methylmalonic acid, and neuropathy in idiopathic Parkinson disease. *Annals of neurology* **68**, 28-36 (2010).
- 47 Rajabally, Y. A. & Martey, J. Neuropathy in Parkinson disease: prevalence and determinants. *Neurology* **77**, 1947-1950 (2011).
- 48 Ceravolo, R., Cossu, G., Bandettini di Poggio, M., Santoro, L., Barone, P., Zibetti, M., Frosini, D., Nicoletti, V., Manganelli, F., Iodice, R., Picillo, M., Merola, A., Lopiano, L., Paribello, A., Manca, D., Melis, M., Marchese, R., Borelli, P., Mereu, A., Contu, P., Abbruzzese, G. & Bonuccelli, U. Neuropathy and levodopa in Parkinson's disease: evidence from a multicenter study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **28**, 1391-1397 (2013).

- 49 Merola, A., Zibetti, M., Rizzone, M. G., Troiano, M., Artusi, C. A., Angrisano, S., Cocito, D. & Lopiano, L. Prospective assessment of peripheral neuropathy in Duodopa-treated parkinsonian patients. *Acta neurologica Scandinavica* **129**, e1-5 (2014).
- 50 Uncini, A., Eleopra, R. & Onofri, M. Polyneuropathy associated with duodenal infusion of levodopa in Parkinson's disease: features, pathogenesis and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* **86**, 490-495 (2015).
- 51 Rolke, R., Baron, R., Maier, C., Tolle, T. R., Treede, R. D., Beyer, A., Binder, A., Birbaumer, N., Birklein, F., Botefur, I. C., Braune, S., Flor, H., Huge, V., Klug, R., Landwehrmeyer, G. B., Magerl, W., Maihofner, C., Rolko, C., Schaub, C., Scherens, A., Sprenger, T., Valet, M. & Wasserka, B. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* **123**, 231-243 (2006).
- 52 Chaudhuri, K. R., Yates, L. & Martinez-Martin, P. The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Current neurology and neuroscience reports* **5**, 275-283 (2005).
- 53 Jain, S. Multi-organ autonomic dysfunction in Parkinson disease. *Parkinsonism & related disorders* **17**, 77-83 (2011).
- 54 Dabby, R., Djaldetti, R., Shahmurov, M., Treves, T. A., Gabai, B., Melamed, E., Sadeh, M. & Avinoach, I. Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* **113**, 1169-1176 (2006).
- 55 Jellinger, K. A. Neuropathology of multiple system atrophy: new thoughts about pathogenesis. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* **29**, 1720-1741 (2014).
- 56 Provitera, V., Nolano, M., Caporaso, G., Stancanelli, A., Manganelli, F., Iodice, R., Selim, M. M., De Rosa, A., Lanzillo, B., Pellecchia, M. T., De Michele, G. & Santoro, L. Postganglionic sudomotor denervation in patients with multiple system atrophy. *Neurology* **82**, 2223-2229 (2014).
- 57 Donadio, V., Cortelli, P., Elam, M., Di Stasi, V., Montagna, P., Holmberg, B., Giannoccaro, M. P., Bugiardini, E., Avoni, P., Baruzzi, A. & Liguori, R. Autonomic innervation in multiple system atrophy and pure autonomic failure. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **81**, 1327-1335 (2010).
- 58 Braak, H., Tredici, K. D., Rüb, U., de Vos, R. A. I., Jansen Steur, E. N. H. & Braak, E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of Aging* **24**, 197-211 (2003).
- 59 Milber, J. M., Noorigian, J. V., Morley, J. F., Petrovitch, H., White, L., Ross, G. W. & Duda, J. E. Lewy pathology is not the first sign of degeneration in vulnerable neurons in Parkinson disease. *Neurology* **79**, 2307-2314 (2012).
- 60 Lundblad, M., Decressac, M., Mattsson, B. & Bjorklund, A. Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 3213-3219 (2012).

- 61 Nemani, V. M., Lu, W., Berge, V., Nakamura, K., Onoa, B., Lee, M. K., Chaudhry, F. A., Nicoll, R. A. & Edwards, R. H. Increased Expression of α -Synuclein Reduces Neurotransmitter Release by Inhibiting Synaptic Vesicle Reclustering after Endocytosis. *Neuron* **65**, 66-79 (2010).
- 62 Scott, D. & Roy, S. α -Synuclein Inhibits Intersynaptic Vesicle Mobility and Maintains Recycling-Pool Homeostasis. *The Journal of Neuroscience* **32**, 10129-10135 (2012).
- 63 DeWitt, D. C. & Rhoades, E. α -Synuclein Can Inhibit SNARE-Mediated Vesicle Fusion through Direct Interactions with Lipid Bilayers. *Biochemistry* **52**, 2385-2387 (2013).
- 64 Chua, C. E. & Tang, B. L. Rabs, SNAREs and α -synuclein - membrane trafficking defects in synucleinopathies. *Brain research reviews* **67**, 268-281 (2011).
- 65 Braak, H. & Del Tredici, K. Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology* **201**, 1-119 (2009).
- 66 Qureshi, H. Y. & Paudel, H. K. Parkinsonian Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and α -Synuclein Mutations Promote Tau Protein Phosphorylation at Ser(262) and Destabilize Microtubule Cytoskeleton in Vitro. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 5055-5068 (2011).
- 67 Cartelli, D., Casagrande, F., Busceti, C. L., Bucci, D., Molinaro, G., Traficante, A., Passarella, D., Giavini, E., Pezzoli, G., Battaglia, G. & Cappelletti, G. Microtubule alterations occur early in experimental parkinsonism and the microtubule stabilizer epothilone D is neuroprotective. *Scientific reports* **3**, 1837 (2013).
- 68 Cartelli, D., Ronchi, C., Maggioni, M. G., Rodighiero, S., Giavini, E. & Cappelletti, G. Microtubule dysfunction precedes transport impairment and mitochondria damage in MPP+ -induced neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* **115**, 247-258 (2010).
- 69 Janke, C. & Kneussel, M. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in neurosciences* **33**, 362-372 (2010).
- 70 Westermann, S. & Weber, K. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 938-948 (2003).
- 71 Valente, E. M., Abou-Sleiman, P. M., Caputo, V., Muqit, M. M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A. R., Healy, D. G., Albanese, A., Nussbaum, R., Gonzalez-Maldonado, R., Deller, T., Salvi, S., Cortelli, P., Gilks, W. P., Latchman, D. S., Harvey, R. J., Dallapiccola, B., Auburger, G. & Wood, N. W. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158-1160 (2004).
- 72 Clark, I. E., Dodson, M. W., Jiang, C., Cao, J. H., Huh, J. R., Seol, J. H., Yoo, S. J., Hay, B. A. & Guo, M. Drosophila pink1 is required for mitochondrial function and interacts genetically with parkin. *Nature* **441**, 1162-1166 (2006).

- 73 Park, J., Lee, S. B., Lee, S., Kim, Y., Song, S., Kim, S., Bae, E., Kim, J., Shong, M., Kim, J.-M. & Chung, J. Mitochondrial dysfunction in *Drosophila* PINK1 mutants is complemented by parkin. *Nature* **441**, 1157-1161 (2006).
- 74 Nakamura, K. α -Synuclein and Mitochondria: Partners in Crime? *Neurotherapeutics* **10**, 391-399 (2013).
- 75 Ryan, B. J., Hoek, S., Fon, E. A. & Wade-Martins, R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends in biochemical sciences* **40**, 200-210 (2015).
- 76 Li, W. W., Yang, R., Guo, J. C., Ren, H. M., Zha, X. L., Cheng, J. S. & Cai, D. F. Localization of α -synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport* **18**, 1543-1546 (2007).
- 77 Kamp, F., Exner, N., Lutz, A. K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., Eimer, S., Winklhofer, K. F. & Haass, C. Inhibition of mitochondrial fusion by α -synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *The EMBO Journal* **29**, 3571-3589 (2010).
- 78 Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B. M., Avadhani, N. G. & Anandatheerthavarada, H. K. Mitochondrial import and accumulation of α -synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *The Journal of biological chemistry* **283**, 9089-9100 (2008).
- 79 Liu, G., Zhang, C., Yin, J., Li, X., Cheng, F., Li, Y., Yang, H., Uéda, K., Chan, P. & Yu, S. α -Synuclein is differentially expressed in mitochondria from different rat brain regions and dose-dependently down-regulates complex I activity. *Neuroscience Letters* **454**, 187-192 (2009).
- 80 Nakamura, K., Nemani, V. M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J. M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., Sesaki, H., Cheng, Y., Finkbeiner, S., Nussbaum, R. L., Masliah, E. & Edwards, R. H. Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein α -synuclein. *The Journal of biological chemistry* **286**, 20710-20726 (2011).
- 81 Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuum, M., Zharkovsky, A. & Kaasik, A. Mutant A53T α -synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10814-10824 (2011).
- 82 Gui, Y.-X., Wang, X.-Y., Kang, W.-Y., Zhang, Y.-J., Zhang, Y., Zhou, Y., Quinn, T. J., Liu, J. & Chen, S.-D. Extracellular signal-regulated kinase is involved in α -synuclein-induced mitochondrial dynamic disorders by regulating dynamin-like protein 1. *Neurobiology of Aging* **33**, 2841-2854 (2012).
- 83 Martin, L. J., Pan, Y., Price, A. C., Sterling, W., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Price, D. L. & Lee, M. K. Parkinson's disease α -synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 41-50 (2006).

- 84 Xie, W. & Chung, K. K. Alpha-synuclein impairs normal dynamics of mitochondria in cell and animal models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **122**, 404-414 (2012).
- 85 Chinta, S. J., Mallajosyula, J. K., Rane, A. & Andersen, J. K. Mitochondrial alpha-synuclein accumulation impairs complex I function in dopaminergic neurons and results in increased mitophagy in vivo. *Neuroscience letters* **486**, 235-239 (2010).
- 86 Reimers, C. D. & Ratzka, P. Diagnostik der Polyneuropathien: eine tabellarische Übersicht. *Aktuelle Rheumatologie* **31**, 312-321 (2006).
- 87 Hughes, A. J., Daniel, S. E., Kilford, L. & Lees, A. J. Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **55**, 181-184 (1992).
- 88 Gilman, S., Wenning, G. K., Low, P. A., Brooks, D. J., Mathias, C. J., Trojanowski, J. Q., Wood, N. W., Colosimo, C., Durr, A., Fowler, C. J., Kaufmann, H., Klockgether, T., Lees, A., Poewe, W., Quinn, N., Revesz, T., Robertson, D., Sandroni, P., Seppi, K. & Vidailhet, M. Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* **71**, 670-676 (2008).
- 89 Armstrong, M. J., Litvan, I., Lang, A. E., Bak, T. H., Bhatia, K. P., Borroni, B., Boxer, A. L., Dickson, D. W., Grossman, M., Hallett, M., Josephs, K. A., Kertesz, A., Lee, S. E., Miller, B. L., Reich, S. G., Riley, D. E., Tolosa, E., Troster, A. I., Vidailhet, M. & Weiner, W. J. Criteria for the diagnosis of corticobasal degeneration. *Neurology* **80**, 496-503 (2013).
- 90 Kimura, J. *Electrodiagnosis in diseases of nerve and muscle: principles and practice*. (Oxford University Press, 2001).
- 91 Bischoff, C., Dengler, R. & Hopf, H. C. *EMG und NLG - Elektromyographie und Nervenleitungsuntersuchungen*. (Georg Thieme Verlag, 2008).
- 92 Lauria, G., Cornblath, D. R., Johansson, O., McArthur, J. C., Mellgren, S. I., Nolano, M., Rosenberg, N. & Sommer, C. EFNS guidelines on the use of skin biopsy in the diagnosis of peripheral neuropathy. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **12**, 747-758 (2005).
- 93 Nolano, M., Provitera, V., Caporaso, G., Stancanelli, A., Vitale, D. F. & Santoro, L. Quantification of pilomotor nerves: a new tool to evaluate autonomic involvement in diabetes. *Neurology* **75**, 1089-1097 (2010).
- 94 Lo, K. W., Kogoy, J. M., Rasoul, B. A., King, S. M. & Pfister, K. K. Interaction of the DYNLT (TCTEX1/RP3) light chains and the intermediate chains reveals novel intersubunit regulation during assembly of the dynein complex. *The Journal of biological chemistry* **282**, 36871-36878 (2007).
- 95 Karle, K. N., Mockel, D., Reid, E. & Schols, L. Axonal transport deficit in a KIF5A(-/-) mouse model. *Neurogenetics* **13**, 169-179 (2012).
- 96 Herrero-Martin, M. D., Pineda, M., Briones, P., Lopez-Gallardo, E., Carreras, M., Benac, M., Angel Idoate, M., Vilaseca, M. A., Artuch, R., Lopez-Perez, M. J., Ruiz-Pesini, E. & Montoya, J. A new

- pathologic mitochondrial DNA mutation in the cytochrome oxidase subunit I (MT-CO1). *Human mutation* **29**, E112-122 (2008).
- 97 Magerl, W., Krumova, E. K., Baron, R., Tolle, T., Treede, R. D. & Maier, C. Reference data for quantitative sensory testing (QST): refined stratification for age and a novel method for statistical comparison of group data. *Pain* **151**, 598-605 (2010).
- 98 Lauria, G., Hsieh, S. T., Johansson, O., Kennedy, W. R., Leger, J. M., Mellgren, S. I., Nolano, M., Merkies, I. S., Polydefkis, M., Smith, A. G., Sommer, C. & Valls-Sole, J. European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* **17**, 903-912, e944-909 (2010).
- 99 McArthur, J. C., Stocks, E. A., Hauer, P., Cornblath, D. R. & Griffin, J. W. Epidermal nerve fiber density: normative reference range and diagnostic efficiency. *Archives of neurology* **55**, 1513-1520 (1998).
- 100 Lauria, G., Holland, N., Hauer, P., Cornblath, D. R., Griffin, J. W. & McArthur, J. C. Epidermal innervation: changes with aging, topographic location, and in sensory neuropathy. *Journal of the neurological sciences* **164**, 172-178 (1999).
- 101 Hughes, A. J., Daniel, S. E., Ben-Shlomo, Y. & Lees, A. J. The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain : a journal of neurology* **125**, 861-870 (2002).
- 102 Schrag, A., Ben-Shlomo, Y. & Quinn, N. How valid is the clinical diagnosis of Parkinson's disease in the community? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **73**, 529-534 (2002).
- 103 Doppler, K., Jentschke, H. M., Schulmeyer, L., Vadasz, D., Janzen, A., Luster, M., Hoffken, H., Mayer, G., Brumberg, J., Booij, J., Musacchio, T., Klebe, S., Sittig-Wiegand, E., Volkmann, J., Sommer, C. & Oertel, W. H. Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* **133**, 535-545 (2017).
- 104 Doppler, K., Volkmann, J. & Sommer, C. Skin biopsies in the differential diagnosis of parkinsonism: are we ready for simplified protocols? *Brain* (2015).
- 105 Jellinger, K. A. Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. *Molecular and chemical neuropathology* **14**, 153-197 (1991).
- 106 Navarro-Otano, J., Casanova-Mollà, J., Morales, M., Valls-Solé, J. & Tolosa, E. Cutaneous autonomic denervation in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* **122**, 1149-1155 (2015).
- 107 Parihar, M. S., Parihar, A., Fujita, M., Hashimoto, M. & Ghafourifar, P. Alpha-synuclein overexpression and aggregation exacerbates impairment of mitochondrial functions by augmenting

- oxidative stress in human neuroblastoma cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **41**, 2015-2024 (2009).
- 108 Iranzo, A., Tolosa, E., Gelpi, E., Molinuevo, J. L., Valldeoriola, F., Serradell, M., Sanchez-Valle, R., Vilaseca, I., Lomena, F., Vilas, D., Llado, A., Gaig, C. & Santamaria, J. Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. *The Lancet. Neurology* **12**, 443-453 (2013).
- 109 Iranzo, A., Fernandez-Arcos, A., Tolosa, E., Serradell, M., Molinuevo, J. L., Valldeoriola, F., Gelpi, E., Vilaseca, I., Sanchez-Valle, R., Llado, A., Gaig, C. & Santamaria, J. Neurodegenerative disorder risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: study in 174 patients. *PloS one* **9**, e89741 (2014).

7 Abkürzungsverzeichnis

ANCOVA	Kovarianzanalyse, analysis of covariance
BSA	Bovine serum albumin
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CBD	Kortikobasale Degeneration, corticobasal degeneration
CDT	Cold detection threshold
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CPT	Cold pain threshold
DFNS	Deutscher Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz
DLK	Demenz vom Lewy-Körper-Typ
DYNLT	Dynein-Leichtkette
HPT	Heat pain threshold
KIF5A	Kinesin-Schwerkette Isoform 5A
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MDT	Mechanical detection threshold
MSA-C	Multisystematrophie vom zerebellären Typ
MSA-P	Multisystematrophie vom Parkinson-Typ
MPS	Mechanical pain sensitivity
MPT	Mechanical pain threshold
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MTCO1	Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I
NMS	Non-Motor Symptoms Assessment Scale
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
p	Signifikanzwert
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PGP	Protein gene product
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PPT	Pressure pain threshold
PSP	Progressive supranukleäre Blickparese, progressive supranuclear palsy
QST	Quantitative Sensorische Testung
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SP	Substanz P
TH	Tyrosinhydroxylase
THS	Tiefe Hirnstimulation

TSL	Thermal sensory limen
UPDRS	Unified Parkinson's disease Rating Scale
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VDT	Vibration detection threshold
WDT	Warm detection threshold
ρ	Korrelationskoeffizient nach Spearman

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die Vergabe des Promotionsthemas und die weiterführenden Ideen insbesondere während der Arbeitsgruppenseminare danken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. med. Kathrin Doppler für die unermüdliche Betreuung während der klinischen und experimentellen Arbeit, die Beantwortung meiner Fragen sowie das Korrekturlesen der Dissertationsschrift.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des histologischen Labors und der AG Sommer für die freundliche Anleitung und geduldige Hilfe. Hervorzuheben sind dabei Barbara Broll, Hiltrud Klüpfel und Barbara Dekant.

Zudem gilt mein Dank meinen Kommilitonen, die mit mir Teil der AG Sommer waren und zu denen ich mit jeder Frage kommen konnte. Ganz besonders gilt mein Dank meinen Wegbereitern für diese Studie Jessica Weis und Sönke Ebert.

Abschließend gilt mein größter Dank meiner Familie und meinem Mann, ohne die ich nie so weit gekommen wäre.

