

Aus der neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**Nachweis von phosphoryliertem und trunkiertem
Alpha-Synuclein in Hautbiopsien von Patienten in
frühen Stadien des idiopathischen M. Parkinson**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Lena Schulmeyer

aus Kleinostheim

Würzburg, Dezember 2019

Referentin: Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler

Korreferent: Prof. Dr. med. Henning Hamm

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2020

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	M. Parkinson	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Definition und Klassifikation	1
1.1.3	Pathophysiologie.....	2
1.1.4	Klinische Symptomatik.....	4
1.1.5	Diagnostik	6
1.1.6	Einteilung in Schweregrade anhand der Hoehn-Yahr-Skala.....	8
1.1.7	Therapeutische Möglichkeiten zur Symptomkontrolle	9
1.1.8	Krankheitsmodifizierende Therapeutika	10
1.2	Alpha-Synuclein	11
1.2.1	Struktur	11
1.2.2	Physiologische Funktion	12
1.2.3	Posttranslationale Modifikationen	13
1.2.4	Fehlgefaltetes Alpha-Synuclein und Aggregation	17
1.2.5	Pathologische Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut.....	17
1.3	Zielsetzung und Arbeitsplan der Studie.....	23
1.3.1	Zielsetzung.....	23
1.3.2	Arbeitsplan.....	23
2	Patientenkollektiv, Material und Methoden	25
2.1	Studienteilnehmer	25
2.1.1	Probanden mit M. Parkinson.....	25
2.1.2	Gesunde Probanden.....	27
2.2	Hautbiopsien	28

2.2.1	Biopsieorte	28
2.2.2	Aufklärung.....	28
2.2.3	Hautentnahme	29
2.2.4	Fixation und Aufbereitung der Hautbiopsien	29
2.2.5	Stufenschnitte	30
2.3	Immunhistochemie	31
2.3.1	Ablauf der Fluoreszenz-Färbungen.....	31
2.3.2	Antikörper	32
2.4	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	35
2.5	Patientenfragebögen.....	35
2.5.1	Teil I: Erfahrungen des täglichen Lebens – nicht-motorische Aspekte (nM-EDL) des MDS-UPDRS	36
2.5.2	Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome bei der Parkinson-Erkrankung.....	36
2.5.3	Statistische Analyse.....	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Klinische Daten und Auswertung der Fragebögen.....	38
3.1.1	Überblick über die klinischen Daten.....	38
3.1.2	Auswertung der Patientenfragebögen.....	39
3.2	Auswertung der Hautbiopsien	39
3.2.1	Phospho-Alpha-Synuclein.....	39
3.2.2	Truncated Alpha-Synuclein	47
3.3	Bedeutung der Stufenschnitte	51
3.3.1	Phospho-Alpha-Synuclein.....	51
3.3.2	Truncated Alpha-Synuclein	54

3.4	Phospho-Alpha-Synuclein- und Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Zusammenhang mit klinischen Merkmalen.....	55
3.4.1	Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium.....	55
3.4.2	Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer bei Biopsieentnahme..	58
3.4.3	Abhängigkeit vom Alter der Patienten.....	59
3.4.4	Abhängigkeit von Teil I des MDS-UPDRS-Fragebogens.....	59
3.4.5	Abhängigkeit von der NMS-Skala.....	60
3.5	Zeitlicher Abstand zwischen dem Schneiden der Gewebeproben und der Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen.....	60
4	Diskussion.....	64
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	64
4.2	Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung ...	65
4.2.1	Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut.....	65
4.2.2	Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut.....	67
4.3	Bewertung der Biopsieentnahmestelle.....	68
4.4	Bewertung der betroffenen Hautstruktur.....	69
4.5	Bewertung der Stufenschnitte.....	70
4.6	Klinische Bedeutung.....	71
4.7	Kritikpunkte der vorliegenden Studie und Ausblick.....	72
5	Zusammenfassung.....	75
6	Abkürzungsverzeichnis.....	77
7	Literatur.....	78
8	Anhang.....	98
8.1	Patienteninformation.....	98
8.2	Einwilligungserklärung.....	100

1 Einleitung

1.1 M. Parkinson

1.1.1 Epidemiologie

Der M. Parkinson ist nach dem M. Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Antony et al., 2013; Ascherio & Schwarzschild, 2016; de Lau & Breteler, 2006). Die Prävalenz in Europa liegt bei 108 bis 257/100 000 Einwohner, die Inzidenz bei 11 bis 19/100 000 Einwohner und Jahr (von Campenhausen et al., 2005). Die Inzidenz ist vor dem 50. Lebensjahr niedrig, in höherem Alter steigt sie altersabhängig an, wobei der Inzidenzgipfel bei 80 Jahren liegt (Ascherio & Schwarzschild, 2016). In den Industrieländern ist ein Prozent der Bevölkerung über 60 Jahren an einem M. Parkinson erkrankt (Antony et al., 2013; de Lau & Breteler, 2006). Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Ascherio & Schwarzschild, 2016; Wirdefeldt et al., 2011). Das mediane Alter bei Krankheitsbeginn liegt bei 60 Jahren (Lees et al., 2009).

1.1.2 Definition und Klassifikation

Ein Parkinson-Syndrom wird klinisch durch das Vorhandensein von Bradykinese und das Auftreten mindestens eines der weiteren Leitsymptome Ruhetremor, Rigor oder posturale Instabilität definiert (Antony et al., 2013; Jankovic, 2008; Kalia & Lang, 2015; Thenganatt & Jankovic, 2014; Tolosa et al., 2006).

Parkinson-Syndrome können in vier Gruppen unterteilt werden: der idiopathische M. Parkinson, genetische Erkrankungen mit Parkinson-Syndrom, Parkinson-Syndrome im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen (atypische Parkinson-Syndrome) und sekundäre (symptomatische) Parkinson-Syndrome (Jankovic, 2008; Levin et al., 2016; Tolosa et al., 2006). Der idiopathische M. Parkinson, welcher über 90% der Parkinson-Syndrome ausmacht (Goedert et al., 2017), wird hierbei noch weiter in die Verlaufsformen akinetisch-rigider Typ, Tremordominanz-Typ und Äquivalenztyp eingeteilt (Burn et al., 2012; Kalia & Lang, 2015; van Rooden, 2010; Thenganatt & Jankovic, 2014).

1.1.3 Pathophysiologie

Ursächlich für die motorischen Symptome des M. Parkinson ist der Verlust von melaninhaltigen, dopaminergen Neuronen in der Pars compacta der Substantia nigra (Dickson et al., 2009; Hornykiewicz, 2008; Kalia & Lang, 2015; Lees et al., 2009). Die am stärksten betroffene Region der Substantia nigra Pars compacta ist die ventrolaterale Schicht, welche Neurone enthält, die zum dorsalen Putamen des Striatums ziehen (Kalia & Lang, 2015).

Neben der Degeneration des dopaminergen nigrostriatalen Signalwegs kommt es auch in anderen Hirnregionen, beispielsweise im noradrenergen Locus caeruleus, im cholinergen Nucleus basalis Meynert, im pedunkulopontinen Kern, in den serotonergen Raphe-Kernen, im dorsalen Vagus Kern, in der Amygdala und im Hypothalamus, zu einem Verlust von Nervenzellen (Dickson, 2012; Jellinger, 1991; Kalia & Lang, 2015; Lees et al., 2009). Das komplexe Muster funktioneller Defizite erklärt sich aus der Vielzahl von verschiedenen beteiligten neuronalen Systemen (Jellinger, 1991).

Ein weiteres Kennzeichen des M. Parkinson ist die Lewy-Körperchen-Pathologie, der neuronale Verlust wird von intraneuronalen Einschlüssen, den Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten, begleitet (Baba et al., 1991; Jellinger, 2012; Kalia & Lang, 2015; Lees et al., 2009; Spillantini et al., 1997). Lewy-Körperchen bestehen aus Aggregaten von Alpha-Synuclein (Dickson et al., 2009; Dickson, 2018; Spillantini et al., 1997; Spillantini et al., 1998). Lewy-Körperchen können anhand ihrer Morphologie in den klassischen (Hirnstamm) und den kortikalen Typ unterteilt werden (Jellinger, 2012; Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007). Die klassischen Lewy-Körperchen sind sphärische zytoplasmatische intraneuronale Einschlüsse mit einem Durchmesser von 8-30 µm und einem hyalinen eosinophilen Kern, der von einem schmalen blassgefärbten Hof umgeben ist (Jellinger, 2012; Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007). Die kortikalen Lewy-Körperchen sind eosinophile runde, eckige oder nierenförmige Strukturen, die von keinem Hof umgeben sind (Jellinger, 2012; Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007).

Hauptkomponente der Lewy-Körperchen ist post-translational modifiziertes und aggregiertes Alpha-Synuclein (Lees et al., 2009; Spillantini et al., 1997; Wakabayashi et al., 2007). Lewy-Körperchen finden sich beim M. Parkinson im zentralen Nervensystem, unter anderem im Hypothalamus, im Nucleus basalis Meynert, in der Substantia nigra, im Locus caeruleus, im dorsalen Raphe-Kern, im dorsalen Vagus Kern, im intermediolateralen Kern des Rückenmarks und im sakralen autonomen Kern (Wakabayashi et al., 2007). Darüber hinaus treten Lewy-Körperchen auch in Neuronen der Amygdala und des zerebralen Kortex, insbesondere der tiefen Schichten (V und VI) des limbischen Systems, auf (Wakabayashi et al., 2007).

Die Lewy-Pathologie ist jedoch nicht nur auf das zentrale Nervensystem beschränkt, sondern betrifft auch das periphere Nervensystem, beispielsweise sympathische Ganglien, den Plexus cardiacus, das enterische Nervensystem, Speicheldrüsen, das Nebennierenmark und die Haut (Goedert et al., 2013; Wakabayashi et al., 2007).

In subklinischem M. Parkinson bleibt die Lewy-Pathologie auf die Medulla oblongata und den Bulbus olfactorius beschränkt (Braak et al., 2003; Wakabayashi et al., 2007). Nach aktuellem Forschungsstand folgt die Ausbreitung der Erkrankung einem bestimmten Muster (Antony et al., 2013; Braak et al., 2003; Goedert et al., 2013). Braak et al. konzipierten ein Modell mit sechs verschiedenen Stadien (Antony et al., 2013; Braak et al., 2003; Goedert et al., 2013; Kalia & Lang, 2015; Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007). Nach dieser Hypothese beginnt der M. Parkinson im enterischen Nervensystem, im Bulbus olfactorius und im dorsalen motorischen Kern des Nervus vagus, und breitet sich über die Medulla oblongata und das Tegmentum pontis ins Mesencephalon und danach ins basale Prosencephalon und in den Mesocortex aus, bis es schließlich den Neocortex erreicht (Braak et al., 2003; Kalia & Lang, 2015; Lees et al., 2009; Wakabayashi et al., 2007).

1.1.4 Klinische Symptomatik

Der M. Parkinson wird zum einen durch motorische Symptome, zum anderen durch nicht-motorische Symptome charakterisiert (Pfeiffer, 2016; Poewe, 2008).

1.1.4.1 Motorische Symptome

Die motorischen Leitsymptome des M. Parkinson sind Hypo-/Bradykinese, Rigor, Ruhetremor und posturale Instabilität (Jankovic, 2008; Kalia & Lang, 2015; Postuma et al., 2015; Rao et al., 2003; Rao et al., 2006; Samii et al., 2004). Motorische Symptome treten erst auf, wenn 80% der dopaminergen Zellen des nigrostriatalen Systems fehlen (Sveinbjornsdottir, 2016). In überwiegender Anzahl der Fälle beginnen die Symptome einseitig, die kontralaterale Seite des Körpers ist erst innerhalb einiger Jahre zusätzlich betroffen (Sveinbjornsdottir, 2016). Eine Seitenbetonung bleibt jedoch erhalten (Djaldetti et al., 2006; Marinus & van Hilten, 2015).

Das charakteristischste Merkmal ist die Bradykinese, welche Schwierigkeiten bei der Planung, Initiierung und Ausführung von Bewegungen umfasst (Jankovic, 2008). Initial äußert sich die Bradykinese vor allem in Problemen mit feinmotorischen Tätigkeiten wie dem Öffnen von Knöpfen (Jankovic, 2008; Samii et al., 2004). Im späteren Verlauf der Erkrankung kann die Bradykinese zu Hypomimie und Hypophonie führen (Hess & Hallett, 2017; Jankovic, 2008; Sveinbjornsdottir, 2016).

Ein Tremor der Extremitäten tritt bei 80% der Patienten auf (Hughes et al., 1993; Jankovic, 2008; Sveinbjornsdottir, 2016). Dieser präsentiert sich meist als Ruhetremor der Hände, mit einer Frequenz von 4-6 Hz, und wird als sogenannter Pillendreher-Tremor bezeichnet. (Crawford & Zimmerman, 2011; Deuschl, 2000; Jankovic, 2008; Postuma et al., 2015; Sveinbjornsdottir, 2016). Bei Willkürbewegungen und während des Schlafens nimmt der Ruhetremor typischerweise ab (Bhidayasiri, 2005; Deuschl, 2000; Jankovic, 2008). Die Amplitude des Tremors steigt bei Anspannung und Erregung (Jankovic, 2008; Lee et al., 2016).

Der Begriff Rigor bezeichnet einen Widerstand gegen passive Bewegungen, der aufgrund eines erhöhten Ruhetonus der Muskulatur entsteht (Hess & Hallett, 2017; Jankovic, 2008; Postuma et al., 2015). In der Untersuchung der Gelenke zeigt sich über den gesamten Bewegungsumfang eines Gelenks ein gleichförmiger, wächserner Widerstand (Hess und Hallett, 2017; Jankovic, 2008). Ist der Rigor mit einem Tremor verbunden, so kommt es zum sogenannten Zahnradphänomen, der Widerstand wird während des passiven Bewegungsvorgangs ruckartig unterbrochen (Hess & Hallett, 2017; Jankovic, 2008; Postuma et al., 2015; Sveinbjornsdottir, 2016).

Im späteren Verlauf der Erkrankung manifestiert sich mit der posturalen Instabilität ein weiteres Hauptmerkmal des M. Parkinson (Hess & Hallett, 2017; Jankovic, 2008). Die posturale Instabilität entsteht aufgrund des Verlusts von gleichgewichtserhaltenden Reflexen und ist eine häufige Ursache von Stürzen (Jankovic, 2008; Sveinbjornsdottir, 2016; Williams et al., 2006). Klinisch präsentiert sich die posturale Instabilität, wenn der Patient während des Gehens stehen bleiben möchte oder wenn der Untersucher dem Patienten einen Stoß versetzt. Im ersten Fall geht der Patient einige Schritte weiter als gewünscht, im zweiten Beispiel kann der Patient den Stoß nicht ausgleichen, es besteht die Gefahr zu stürzen (Jankovic, 2008; Sveinbjornsdottir, 2016; Williams et al., 2006).

1.1.4.2 Nicht-motorische Symptome

Bereits der Namensgeber der Erkrankung, James Parkinson, beschrieb 1817 einige nicht-motorische Symptome des M. Parkinson wie Schlafstörungen, Funktionsstörungen im Gastrointestinaltrakt, Blasendysfunktion und Fatigue (Parkinson, 2002; Pfeiffer 2016). Nicht-motorische Symptome können in über 20% der Fälle das Hauptmerkmal der Parkinson-Erkrankung sein (O'Sullivan et al., 2008; Pfeiffer, 2016). Dies führt zu einer verzögerten Diagnosestellung (O'Sullivan et al., 2008; Pfeiffer 2016). Manche nicht-motorischen Symptome können Jahre oder sogar Jahrzehnte, bevor die klassischen motorischen Symptome einsetzen, auftreten (Pfeiffer 2016). Zwischen dem Auftreten von

nicht-motorischen Symptomen und der Lebensqualität besteht eine negative Korrelation (Antonini et al., 2012). Die nicht-motorischen Symptome haben sogar einen größeren Effekt auf die gesundheitsbezogene Lebensqualität als die motorischen Beeinträchtigungen (Pfeiffer, 2016; Weerkamp et al., 2013). Fast 100 % aller Parkinson-Patienten zeigen zumindest ein nicht-motorisches Symptom (Pfeiffer, 2016; Shulman et al., 2001; Storch et al., 2013). In Tabelle 1 sind die nicht-motorischen Symptome dargestellt (Poewe, 2008; Antonini et al., 2012).

Neuro- psychiatrische Dysfunktionen	Schlafstörungen	Autonome Dysfunktio- nen	Sensorische Beschwerden und Schmerz	Hautverän- derungen
Stimmungsverän- derungen	REM-Schlaf- Verhaltens- störungen	Orthostatische Hypotonie	Hyposmie	Hyperhidrose
Apathie und Anhedonie	Periodic-Limb- Movement- Disorder/ Restless-Legs- Syndrom	Urogenitale Dysfunktion	Missempfindungen	Seborrhoe
Frontal exekutive Störung	Ausgeprägte Tagesmüdigkeit	Obstipation	Schmerz	
Demenz und Psychose	Insomnie	Sexuelle Dysfunktion		

Tabelle 1: Nicht-motorische Symptome des M. Parkinson nach Poewe, 2008 und Antonini et al., 2012

1.1.5 Diagnostik

Ein zuverlässiger und leicht anwendbarer diagnostischer Test oder Marker ist derzeit für den M. Parkinson noch nicht verfügbar (de Lau & Breteler, 2006; Litvan et al., 2003; Rajput et al., 1991). Eine sichere Diagnosestellung ist nur post

mortem, durch den Nachweis einer Degeneration der Substantia nigra Pars compacta, in Verbindung mit dem Vorhandensein einer Lewy-Körperchen-Pathologie, möglich (Kalia & Lang, 2015).

Die Diagnostik des M. Parkinson zu Lebzeiten des Patienten erfolgt klinisch anhand der MDS-Diagnosekriterien (de Lau & Breteler, 2006; Litvan et al., 2003; Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017). Voraussetzung ist das Vorliegen eines Parkinsonismus, der durch Bradykinesie in Kombination mit einem Ruhetremor und/oder Rigor definiert ist (Postuma et al., 2015).

Die MDS-Kriterien umfassen zwei verschiedene Diagnosesicherheiten, unterteilt wird in „klinisch-definitives“ und „klinisch-wahrscheinliches“ idiopathisches Parkinson-Syndrom (Postuma et al., 2015). Die Diagnose eines klinisch-definitiven M. Parkinson kann gestellt werden, wenn keine absoluten Ausschlusskriterien und keine Red Flags vorliegen und mindestens zwei unterstützende Kriterien zutreffen (Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017). Das idiopathische Parkinson-Syndrom gilt als klinisch wahrscheinlich, falls keine absoluten Ausschlusskriterien und maximal zwei Red Flags vorliegen (Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017). Zudem müssen die Red Flags jeweils durch ein unterstützendes Kriterium ausgeglichen werden (Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017).

Typische Ausschlusskriterien sind beispielsweise zerebelläre Anomalien, eine vertikale, nach unten gerichtete Blickparese, ein normaler Befund im DAT-Scan oder eine Medikation mit Dopamin-Rezeptor-Antagonisten (Postuma et al., 2015).

Unterstützende Kriterien sind unter anderem ein deutliches Ansprechen auf eine dopaminerge Therapie, Levodopa-induzierte Dyskinesien, Anosmie oder eine kardiale sympathische Denervierung in der MIBG-Szintigraphie (Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017).

Zu den Red Flags zählen zum Beispiel eine fehlende Progression der motorischen Symptome, eine rapide Verschlechterung des Gangbilds oder eine frühe bulbäre Symptomatik (Postuma et al., 2015; Zach et al., 2017).

Die Genauigkeit einer klinischen Diagnosestellung im Vergleich zu einer post-mortem neuropathologischen Diagnostik ist jedoch gering, sie variiert in verschiedenen Studien zwischen 70 und 90% (Adler et al., 2014; Hughes et al., 1992; Hughes et al., 2002; Litvan et al., 1998; Schrag et al., 2002). In einem frühen Stadium der Erkrankung liegt sie sogar nur um 50% (Adler et al., 2014).

1.1.6 Einteilung in Schweregrade anhand der Hoehn-Yahr-Skala

Der Schweregrad der Parkinson-Erkrankung kann im Rahmen der Hoehn und Yahr-Skala in 5 Schweregrade eingeteilt werden (Hoehn & Yahr, 1967). Diese richten sich nach dem Grad der durch den M. Parkinson verursachten Einschränkung (Hoehn & Yahr, 1967). Tabelle 2 präsentiert die Hoehn-Yahr-Skala.

Stadien nach Hoehn und Yahr	Symptome
I	<ul style="list-style-type: none"> - einseitige Beteiligung - Keine oder lediglich minimale Einschränkungen
II	<ul style="list-style-type: none"> - beidseitige Beteiligung - keine Haltungsinstabilität
III	<ul style="list-style-type: none"> - leichte Haltungsinstabilität - leichte bis moderate Beeinträchtigung - Arbeitsfähigkeit z. T. beeinträchtigt - Patient ist in der Lage, ein unabhängiges Leben zu führen
IV	<ul style="list-style-type: none"> - deutliche Beeinträchtigung - noch ohne Hilfe geh- und stehfähig
V	<ul style="list-style-type: none"> - bettlägerig/auf Rollstuhl angewiesen

Tabelle 2: Einteilung des M. Parkinson in Schweregrade nach Hoehn und Yahr, 1967

1.1.7 Therapeutische Möglichkeiten zur Symptomkontrolle

Der M. Parkinson ist eine bis heute nicht heilbare Erkrankung (Kalia & Lang, 2015; Lew, 2007; Park & Stacy, 2015). Die pharmakologische Therapie kann jedoch viele der Symptome behandeln (Kalia & Lang, 2015; Lew, 2007). Daneben stehen die Physiotherapie, zur Behandlung der motorischen Symptome, und die tiefe Hirnstimulation des Nucleus subthalamicus als operative Eskalationstherapie zur Verfügung (Baumann & Waldvogel, 2013; Kalia & Lang, 2015).

Levodopa (L-Dopa) ist der pharmakologische Goldstandard (Baumann & Waldvogel, 2013; Kalia & Lang, 2015; Lew, 2007; Olanow, 2004). Im Gegensatz zu Dopamin kann L-Dopa die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Baumann & Waldvogel, 2013; Connolly & Lang, 2014). Um einen Abbau von L-Dopa in der Peripherie zu verhindern, wird dieses in Kombination mit einem peripher wirksamen Decarboxylasehemmer verabreicht (Baumann & Waldvogel, 2013; Connolly & Lang, 2014). Im Rahmen einer Dreifach-Kombination kann zusätzlich noch ein Catechol-O-Methyltransferase-Hemmer verabreicht werden, was zu einer weiteren Hemmung des peripheren Abbaus von L-Dopa führt (Baumann & Waldvogel, 2013). Hieraus resultiert eine höhere und verlängerte Bioverfügbarkeit von L-Dopa (Baumann & Waldvogel, 2013; Olanow et al., 2006).

Nach einigen Jahren verringert sich jedoch die Zeit, in der die motorischen Symptome der Erkrankung durch eine L-Dopa-Gabe unterdrückt werden können (Baumann & Waldvogel, 2013; Lew, 2007). Diese abnehmende Medikamentenwirkung nennt man Wearing-off (Lew, 2007; Olanow, 2004). Im weiteren Verlauf kommt es beim Vorliegen von Spitzenspiegeln zu unwillkürlichen Bewegungen, den „peak-dose“-Dyskinesien (Baumann & Waldvogel, 2013; Lew, 2007; Olanow, 2004).

Infolgedessen wird bei jüngeren Patienten zu Beginn eine Therapie mit Dopamin-Agonisten, statt L-Dopa, bevorzugt (Baumann & Waldvogel, 2013). Diese wirken länger, motorische Komplikationen treten seltener auf (Baumann & Waldvogel, 2013). Die Dopamin-Agonisten sind jedoch häufiger mit Nebenwirkungen,

beispielsweise Impuls-Kontroll-Störungen, verbunden (Baumann & Waldvogel, 2013; Kalia & Lang, 2015; Voon et al., 2011).

Eine weitere wichtige Säule der Therapie sind die Hemmer der Monoaminoxidase B (MAO-B), welche den Abbau von Dopamin hemmen (Baumann & Waldvogel, 2013; Kalia & Lang, 2015).

1.1.8 Krankheitsmodifizierende Therapeutika

Nach aktuellem Forschungsstand sind bisher alle Versuche, eine krankheitsmodifizierende Therapie zu entwickeln, darin gescheitert, den erhofften Benefit zu demonstrieren oder sie haben widersprüchliche Ergebnisse hervorgebracht (Lang & Espay, 2018).

In aktuell laufenden Studien werden jedoch zahlreiche potenzielle krankheitsmodifizierende therapeutische Ansätze untersucht (Lang & Espay, 2018). Diese werden von Lang und Espay (2018) in vier Kategorien eingeteilt:

1. Alpha-Synuclein-basierte Ansätze
2. Andere pathophysiologische Aspekte als Ansatzpunkte (abgesehen von Alpha-Synuclein)
3. LRRK2-Subtypen als therapeutisches Ziel (Nicht-SNCA)
4. Krankheitsmodifizierende Interventionen, die keinen direkten Einfluss auf die zugrundeliegende Pathophysiologie ausüben

Um die Toxizität des Alpha-Synucleins zu reduzieren stehen theoretisch zahlreiche Prozesse als Ziel zur Verfügung (Lang & Espay, 2018). Aktuell wird zum Beispiel die Möglichkeit einer aktiven oder passiven Immunisierung in verschiedenen Studien untersucht (Bergström et al., 2016; Brundin et al., 2017; Kingwell, 2017; Lang & Espay, 2018; Mandler et al., 2014). Andere Ansätze verfolgen die Inhibierung der Fehlfaltung und Aggregation des Alpha-Synucleins (Lang & Espay, 2018). Darüber hinaus werden c-Abl-Inhibitoren getestet (Lang & Espay, 2018; Karuppagounder et al., 2014; Mahul-Mellier et al., 2014). C-Abl ist eine Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase, die möglicherweise die pathologische

Phosphorylierung des Alpha-Synucleins verhindert und somit vor einem Verlust von Nervenzellen schützt (siehe 1.2.3.1) (Brahmachari et al., 2017; Lang & Espay, 2018). Des Weiteren ist auch die Glucocerebrosidase für die Forschung von großem Interesse. Mutationen im Glucocerebrosidase-Gen sind der häufigste genetische Risikofaktor für die Entwicklung eines M. Parkinson und auch Patienten ohne diese Mutation entwickeln niedrigere Enzym-Spiegel, möglicherweise aufgrund des toxischen Alpha-Synucleins (Lang & Espay, 2018; Sidransky et al., 2009).

Auch zu anderen pathophysiologischen Ansätzen als therapeutisches Ziel gibt es inzwischen Studien in fortgeschrittenen Stadien, unter anderem zu vier Medikamenten mit völlig unterschiedlichen molekularen Mechanismen, Isradipin, Inosin, Deferipron und Exenatid (Lang & Espay, 2018).

Weiterhin werden auch Medikamente, die an spezifische genetische Subtypen des M. Parkinson gerichtet sind, untersucht (Lang & Espay, 2018). Gegenstand aktueller Forschungen sind gegen LRRK2, den häufigsten autosomal-dominanten genetischen Subtyp, gerichtete Therapiestrategien (Lang & Espay, 2018). Derzeit laufen verschiedene Studien, um wirksame und sichere LRRK2-Kinase-Inhibitoren zu entwickeln (Chan & Tan, 2017; Lang & Espay, 2018; West, 2017).

Neben denen auf die zugrundeliegende Pathophysiologie abzielenden therapeutischen Modellen, gibt es eine Reihe weiterer möglicher Ansätze. Beispielsweise könnte ein möglicher Angriffspunkt die Wiederherstellung oder Stärkung von kompensatorischen Mechanismen sein (Lang & Espay, 2018).

1.2 Alpha-Synuclein

1.2.1 Struktur

Alpha-Synuclein ist ein kleines, lösliches, intrazelluläres Protein, das 1988 durch Maroteaux identifiziert werden konnte (George, 2001; Maroteaux et al., 1988; Villar-Piqué et al., 2016). Der Name beruht auf der zellulären Lokalisation, „Syn“ von Synapse und „Nuclein“ von Nucleus (Villar-Piqué et al., 2016). Im Jahr 1997

wurde Alpha-Synuclein als Hauptkomponente von Lewy-Körperchen und Lewy-Neuriten identifiziert (Lang & Espay, 2018; Olanow & Brundin, Spillantini et al., 1997; 2013; Villar-Piqué et al., 2016). Alpha-Synuclein spielt eine zentrale Rolle in einer Gruppe von neurodegenerativen Erkrankungen, den sogenannten Synucleinopathien, zu denen neben dem M. Parkinson auch die Lewy-Body-Demenz, die Multisystematrophie und die idiopathische orthostatische Hypotonie („pure autonomic failure“) zählen (Villar-Piqué et al., 2016).

Alpha-Synuclein ist das Produkt des Gens SNCA, welches sich an Position 21 des langen Arms von Chromosom 4 befindet (Goedert et al., 2017; Polymeropoulos et al., 1997; Villar-Piqué et al., 2016). Alpha-Synuclein besteht aus 140 Aminosäuren und die Aminosäuresequenz lässt sich in drei Bereiche unterteilen (Breydo et al., 2012; Villar-Piqué et al., 2016). Die N-terminale Domäne besteht aus 60 Aminosäuren (Villar-Piqué et al., 2016). Sie enthält die sich wiederholende Konsensussequenz KTKEGV und ist für die Membranbindungskapazität verantwortlich (Breydo et al., 2012; Goedert et al., 2017; Villar-Piqué et al., 2016). Die zentrale Domäne besteht aus 35 Aminosäuren, ist stark hydrophob und trägt zur Aggregation des Alpha-Synucleins bei (Breydo et al., 2012; Villar-Piqué et al., 2016). Die C-terminale Domäne besteht aus 45 Aminosäuren, ist reich an negativen Ladungen und Prolin-Resten und verhilft dem Protein Alpha-Synuclein zu seiner Flexibilität (Breydo et al., 2012; Villar-Piqué et al., 2016).

1.2.2 Physiologische Funktion

Die physiologische Funktion von Alpha-Synuclein ist bis heute nur unvollständig geklärt (Goedert et al., 2017; Villar-Piqué et al., 2016). Es wird angenommen, Alpha-Synuclein sei am Remodelling von Membranen (Goedert et al., 2017), am Transport synaptischer Vesikel, der Freisetzung von Neurotransmittern an Synapsen, der Bindung von Fettsäuren und an der Regulation von Enzymen, Transportern und synaptischen Vesikeln beteiligt (Breydo et al., 2012). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Alpha-Synuclein eine Rolle bei der Apoptose

von Nervenzellen spielt und Nervenzellen vor verschiedenen apoptotischen Stimuli schützt (Breydo et al., 2012; da Costa et al., 2000).

1.2.3 Posttranslationale Modifikationen

Zahlreiche posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Sekundärstruktur und die Konformation des Alpha-Synucleins (Breydo et al., 2012). Dies hat sowohl eine Wirkung auf die physiologische Funktion, als auch auf die Pathologie des Proteins (Villar-Piqué et al., 2016). Die Aggregation von Proteinen ist ein hoch kooperativer Prozess, in dem schon die Modifikation einer kleinen Alpha-Synuclein-Subpopulation einen bedeutenden Effekt auf Kinetik und Distribution haben kann (Breydo et al., 2012).

Posttranslationale Modifikationen des Alpha-Synucleins sind beispielsweise Phosphorylierung, Trunkierung, Proteolyse, Oxidation, Lipidierung, Nitrierung, Glycosylierung, ADP-Ribosylierung, Methylierung, Acylierung und Sulfatierung (Breydo et al., 2012).

1.2.3.1 *Phosphoryliertes Alpha-Synuclein*

Die am besten erforschte posttranslationale Modifikation ist die Phosphorylierung (Villar-Piqué et al., 2016). An Serin 129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein konnte in Alpha-Synuclein-Ablagerungen in verschiedenen Synucleinopathien gefunden werden (Fujiwara et al., 2002; Villar-Piqué et al., 2016). Diese posttranslationale Phosphorylierung beeinflusst die Aggregation des Alpha-Synucleins (Fujiwara et al., 2002; Villar-Piqué et al., 2016), über 90% des aggregierten Alpha-Synucleins ist an Serin 129 phosphoryliert (Goedert et al., 2017). Im Gegensatz dazu weisen lediglich 4 % des Alpha-Synucleins eines gesunden Gehirns eine posttranslationale Phosphorylierung auf (Goedert et al., 2017).

1.2.3.2 Trunkiertes Alpha-Synuclein

Neben der Phosphorylierung sind die N- oder C-terminale Trunkierung eine häufige posttranslationale Modifikation des Alpha-Synucleins, die mit Lewy-Körperchen assoziiert wird (Breydo et al., 2012). Am häufigsten sind die C-terminalen Trunkierungen, bei denen die Spaltstelle zwischen den Resten 115 und 135 lokalisiert ist (Breydo et al., 2012). Im Vergleich zum vollständigen Protein bilden die verkürzten Alpha-Synuclein-Fragmente leichter Fibrillen, welche möglicherweise eine Aggregation initiieren (Breydo et al., 2012). Die Entfernung der C-terminalen Domäne destabilisiert den monomeren Zustand und die Aggregation des Proteins wird beschleunigt (Breydo et al., 2012). Darüber hinaus korreliert die erhöhte Neigung zur Aggregation mit einer erhöhten Toxizität *in vivo* (Breydo et al., 2012). Experimente in transgenen Tieren, die verkürzte Alpha-Synuclein-Fragmente exprimierten, zeigten einen Verlust von Nervenzellen, niedrige Dopamin-Level, motorische Verhaltens- und Gedächtnisdefizite (Breydo et al., 2012; Hall et al., 2015; Periquet et al., 2007; Tofaris et al., 2006; Ulusoy et al., 2010; siehe 1.2.3.3).

1.2.3.3 Trunkiertes Alpha-Synuclein in Mausmodellen

Eine Forschungsgruppe um Tofaris beschrieb 2006 die Produktion eines neuen transgenen Mausmodells (Tofaris et al., 2006). Die Expression des menschlichen trunkierten Alpha-Synucleins-120 (=Alpha-Synuclein (1-120)), bei dem die letzten 20 Aminosäuren fehlen, führte zur Formation pathologischer Einschlüsse in der Substantia nigra und dem Bulbus olfactorius (Tofaris et al., 2006). Weiterhin wurde dies von einem reduzierten Dopaminspiegel im Striatum, einer fortschreitenden Verringerung der spontanen Bewegungsaktivität und einer erhöhten Antwort auf Amphetamine begleitet (Tofaris et al., 2006). Tofaris et al. stellten die Hypothese auf, dass die C-terminale Region des Alpha-Synucleins ein wichtiger Regulator der Aggregation des Proteins ist (Tofaris et al., 2006). Im Gegensatz zu an M. Parkinson erkrankten Patienten zeigte sich im Mausmodell von Tofaris et al. jedoch kein signifikanter Nervenzellverlust (Tofaris et al., 2006).

Eine Forschungsgruppe um Games untersuchte den Effekt einer passiven Immunisierung gegen C-terminal verkürztes (trunkiertes) Alpha-Synuclein in einem mThy1-Alpha-Synuclein-Mausmodell (Games et al., 2014). Unter dem mThy1-Promotor überexprimieren Mäuse menschliches Alpha-Synuclein, entwickeln motorische Verhaltensdefizite, axonale Pathologien und akkumulieren C-terminal trunkiertes Alpha-Synuclein in kortikalen und subkortikalen Hirnregionen (Games et al., 2014). Folglich wird ein M. Parkinson imitiert (Games et al., 2014).

Die Mäuse wurden 6 Monate lang wöchentlich mit den neuen monoklonalen Antikörpern 1H7, 5C1 oder 5D12, die alle gegen den C-Terminus von Alpha-Synuclein gerichtet sind, immunisiert (Games et al., 2014). Das Verhalten der Mäuse wurde nach abgeschlossener Immunisierung getestet, anschließend wurde das Gehirn entfernt und untersucht (Games et al., 2014). In den Mäusen, die mit den Antikörpern 1H7 und 5C1 immunisiert wurden, zeigten immunohistochemische Analysen mit einem Antikörper, der gegen C-terminal trunkiertes Alpha-Synuclein gerichtet ist, eine signifikante Reduktion pathologischerer Alpha-Synuclein-Aggregation im temporalen Kortex und im Striatum (Games et al., 2014). Eine Immunisierung mit dem Antikörper 5D12 ergab eine signifikante Reduktion von C-terminal trunkiertem Alpha-Synuclein im Neokortex, jedoch nicht im Striatum (Games et al., 2014).

Zusammengefasst schwächten die C-Terminus-Antikörper die Pathologie an der Synapse und am Axon ab, reduzierten den Verlust von Nervenfasern im Striatum und verbesserten sowohl die motorischen Fähigkeiten als auch die Gedächtnisleistung (Games et al., 2014). Ursächlich hierfür könnte sein, dass die Antikörper die C-terminale Domäne des Alpha-Synucleins stabilisieren und es somit weniger anfällig für proteolytische Trunkierungen ist, was in einer verminderten Bildung und Verbreitung von toxischen Aggregaten resultiert (Games et al., 2014).

Auch Hall et al. beschrieben Verhaltensdefizite in homozygoten, transgenen Mäusen, die menschliches trunkiertes Alpha-Synuclein (Aminosäure 1-120) exprimieren (Hall et al., 2015). Die transgenen Mäuse zeigten eine Akkumulation

des transgenen Proteins im temporalen Kortex, im perirhinaler Kortex und im Hippocampus (Hall et al., 2015). Dies entspricht den Hirnregionen, die bei der Lewy-Körperchen-Demenz beim Menschen betroffen sind (Hall et al., 2015).

Hall et al. führten verschiedene Verhaltenstests, unter anderem den NOR (novel object recognition) Test und den Barnes Maze Test, durch (Hall et al., 2015).

Der NOR Test prüft die Gedächtnisbildung und -speicherung im Zusammenhang mit dem perirhinalen Kortex (Hall et al., 2015; Winters et al., 2004). Im Alter von 3 Monaten zeigten die transgenen Mäuse Schwierigkeiten bei der Diskrimination zwischen fremden und vertrauten Objekten, dieser Unterschied war im Alter von 6 Monaten sogar noch ausgeprägter (Hall et al., 2015). Im Gegensatz dazu konnten die Kontrollmäuse während des gesamten Zeitraums zwischen fremden und vertrauten Objekten unterscheiden (Hall et al., 2015).

Zur weiteren Untersuchung des Gedächtnisdefizits in den transgenen Mäusen führte die Forschungsgruppe um Hall den Barnes Maze Test durch (Hall et al., 2015). Der Barnes Maze Test prüft Defizite in Gedächtnis- und Erinnerungsleistungen in Bezug auf den Hippocampus (Hall et al., 2015). Die Mäuse wurden im Alter von 9 Monaten untersucht (Hall et al., 2015). In den 5 Tagen der Testung konnte kein Unterschied zwischen den Kontrollen und den transgenen Mäusen im Hinblick auf die Latenzzeit, in der sie das Ziel fanden, festgestellt werden (Hall et al., 2015). Hall et al. beschrieben bei den transgenen Mäusen jedoch an Tag 3 und 4 der Untersuchung erhöhte Fehlerraten (Hall et al., 2015). Hall et al. stellten die Hypothese auf, dass die transgenen Mäuse möglicherweise eine Beeinträchtigung im räumlichen Lernen haben (Hall et al., 2015).

Zusammengefasst zeigte das Mausmodell von Hall et al., dass die Expression von niedrigeren als endogenen Leveln von trunkiertem Alpha-Synuclein ausreichend ist, um morphologische Zeichen der Proteinaggregation und Gedächtnisdefizite zu induzieren, die vergleichbar mit der hippokampalen und kortikalen Pathologie in der Lewy-Körperchen-Demenz sind (Hall et al., 2015). Dies suggeriert, dass die Akkumulation und Aggregation von sogar kleinen Mengen von menschlichem trunkiertem Alpha-Synuclein den Prozess der

Erinnerungsbildung und -erhaltung schädigen könnte und darüber hinaus stützt dies die Hypothese, dass eine frühe Aggregation von Alpha-Synuclein ein entscheidender Faktor in der Pathogenese der Synucleinopathien ist (Hall et al., 2015).

1.2.4 Fehlgefaltetes Alpha-Synuclein und Aggregation

Liegt Alpha-Synuclein fehlgefaltet vor, wird es unlöslich und aggregiert zu intrazellulären Einschlüssen, den Lewy-Körperchen und den Lewy-Neuriten (Kalia & Lang, 2015). Eine Hypothese ist, dass die Lewy-Körperchen ursächlich am Verlust von Nervenzellen beteiligt sind (Kalia & Lang, 2015). In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass die Pathologie des M. Parkinson deutlich komplexer ist und die Neurodegeneration nicht nur der Lewy-Körperchen-Pathologie zugeschrieben werden kann (Kalia & Lang, 2015). Alpha-Synuclein bildet eine Vielzahl verschiedener Aggregate aus, unter anderem kleine, punktförmige Strukturen, dünne fadenartige Strukturen, sehr feine präsynaptische Ablagerungen und lösliche Oligomere, die aus zwei bis 100 Alpha-Synuclein-Monomeren bestehen (Kalia & Lang, 2015). In der Neurodegeneration der Parkinson-Erkrankung scheinen diese verschiedenen Aggregats-Formen eine entscheidende Rolle zu spielen, mit möglicherweise toxischen Effekten auf die Nervenzellen (Kalia & Lang, 2015). Des Weiteren liegen auch andere Proteine, beispielsweise β -Amyloid-Plaques und Tau-Fibrillen, häufig in Gehirnen von an M. Parkinson erkrankten Personen vor (Kalia & Lang, 2015). Folglich scheinen auch Einschlüsse dieser Proteine in der Pathologie synergistisch zu wirken (Kalia & Lang, 2015).

1.2.5 Pathologische Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut

Erste Forschungsergebnisse zu Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Parkinson-Patienten wurden bereits im Jahr 2005 von Michell et al. veröffentlicht. Die Idee, Alpha-Synuclein als potenziellen prä-mortalen Biomarker der Parkinson-Erkrankung zu verwenden, entstand aufgrund der Tatsache, dass Alpha-Synuclein bereits in anderen Geweben als dem Hirngewebe nachgewiesen

werden konnte, unter anderem im Liquor cerebrospinalis, in Thrombozyten und im Blutplasma (Michell et al., 2005). Michell et al. fanden zwar Alpha-Synuclein in einigen Hautbiopsien, jedoch bestand keine Korrelation zwischen Alpha-Synuclein und der Diagnose M. Parkinson (Michell et al., 2005).

1.2.5.1 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Patienten mit idiopathischem M. Parkinson

Im Jahr 2008 konnte durch Ikemura et al. erstmals an postmortalem Gewebe gezeigt werden, dass der Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein in der Haut hochspezifisch ist und zur Diagnostik des M. Parkinson genutzt werden könnte. Von 142 Probanden, bei denen durch Autopsie post mortem eine Lewy-Körperchen-Pathologie nachgewiesen wurde, wurde Hautgewebe entnommen (Ikemura et al., 2008). Der Nachweis von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in der Haut zeigte eine Sensitivität von 70% und eine Spezifität von 100% (Ikemura et al., 2008).

Eine Forschungsgruppe um Miki beschrieb 2010 erstmals prä mortal Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Parkinson-Patienten (Miki et al., 2010). Jedoch wiesen nur 10% der Patienten in der Dermis der Thoraxwand pathologische Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen auf, die Biopsien des Unterschenkels zeigten keine Ablagerungen (Miki et al., 2010).

Eine Forschungsgruppe um Donadio konnte 2014 schließlich eine wesentlich höhere Sensitivität nachweisen. Alle Biopsien des Nackens, 52% des Oberschenkels und 24 % des Unterschenkels zeigten Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (Donadio et al., 2014). Bei allen Patienten mit idiopathischem M. Parkinson wurde an allen drei Biopsieorten, 3-4 cm von der ersten Probeentnahme entfernt, eine zusätzliche Hautbiopsie entnommen, um das Verteilungsmuster (regelmäßig oder ungleichmäßig) zu evaluieren (Donadio et al., 2014). Betrachtet man jeweils lediglich die erste Biopsie, so präsentierten sich zervikal nur in 75%, am Oberschenkel nur in 42% und am Unterschenkel nur in 14% der Fälle Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (Donadio et al., 2014). Dieses Resultat macht eine ungleichmäßige Verteilung des Phospho-Alpha-

Synucleins in der Haut wahrscheinlich (Donadio et al., 2014). Die abnehmende Häufigkeit von proximal nach distal erklärten Donadio et al. durch eine mögliche Ausbreitung des Phospho-Alpha-Synucleins ausgehend von den Spinalganglien entlang des peripheren Nervensystems (Donadio et al., 2014). Auch in weiteren Forschungsarbeiten von Donadio et al. wurde ein Verteilungsgradient von proximal nach distal beschrieben, die Sensitivität lag weiterhin bei bis zu 100% zervikal und auch das ungleichmäßige Verteilungsmuster konnte bestätigt werden (Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Donadio et al., 2018a).

Dieses Ergebnis konnte in einem Vorläuferprojekt unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, auch hier konnte eine Abnahme positiver Fälle von proximal nach distal verzeichnet werden (Doppler et al., 2014). Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in zumindest einer Nervenfasern konnten bei 16 von 31 Parkinson-Patienten beschrieben werden (Doppler et al., 2014). Zunächst wurde je Biopsie (Unterschenkel, Oberschenkel, Th12 und Finger) ein Schnitt auf Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen untersucht. Im weiteren Verlauf wurden von allen initial negativen Hautbiopsien des Rückens Stufenschnitte angefertigt, wodurch die Anzahl positiver Fälle von 7 auf 11 erhöht werden konnte (Doppler et al., 2014). In diesem Vorläuferprojekt unserer Arbeitsgruppe aus dem Jahr 2014 wurden erstmals Stufenschnitte eingesetzt, wodurch die Sensitivität gesteigert werden konnte (Doppler et al., 2014).

Nach aktuellem Forschungsstand wurden bisher bei keinem Patienten mit Tauopathie und keiner gesunden Kontrollperson Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen gefunden (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a; Donadio, 2018b; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015; Ikemura et al., 2008; Miki et al., 2010; Zange et al., 2015).

1.2.5.2 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Patienten mit Multisystematrophie

In einer Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe konnten 2015 auch erstmals Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Patienten mit Multisystematrophie nachgewiesen werden (Doppler et al., 2015). Die erzielte Sensitivität lag bei 67% und die Spezifität, gegenüber Patienten mit einer Tauopathie und gesunden Kontrollen, bei 100%. Die höchste Detektionsrate wurde am Oberschenkel beschrieben (Doppler et al., 2015). Interessanterweise lagen die Ablagerungen, im Gegensatz zum M. Parkinson, bei dem v.a. autonome Fasern betroffen sind (siehe 1.2.5.5), überwiegend in somatosensiblen Fasern des subepidermalen Plexus vor (Doppler et al., 2015). Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut stützen folglich die Diagnose „Synucleinopathie“ und grenzen gegen eine Tauopathie ab (Doppler et al., 2015).

In einer Studie einer Forschungsgruppe um Zange konnten diese Ergebnisse jedoch nicht reproduziert werden, es zeigten sich alle Patienten mit Multisystematrophie negativ für Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein (Zange et al., 2015). In der Studie von Zange et al. wurden jedoch lediglich autonome Nervenfasern untersucht, wodurch dieses Ergebnis erklärt werden könnte (Zange et al., 2015; siehe 1.2.5.5).

Donadio et al. konnten jedoch ähnliche Ergebnisse wie unsere Arbeitsgruppe erzielen und Phospho-Alpha-Synuclein in der Haut von 67% der Patienten mit Multisystematrophie nachweisen (Donadio et al., 2018a). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe beschrieben auch Donadio et al. ausschließlich Ablagerungen in somatosensiblen Nervenfasern (Donadio et al., 2018a).

1.2.5.3 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Patienten mit anderen Synucleinopathien

Auch bei den anderen Synucleinopathien, der idiopathischen orthostatischen Hypotonie und der Lewy-Körperchen-Demenz, konnte inzwischen phosphoryliertes Alpha-Synuclein in Hautbiopsien nachgewiesen werden, es wurden jeweils Detektionsraten von bis zu 100% erreicht (Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a).

1.2.5.4 Verteilung des Phospho-Alpha-Synucleins hinsichtlich der motorisch betroffenen Seiten

Bezüglich der Seitenverteilung der phosphorylierten Alpha-Synuclein-Ablagerungen beschrieben Donadio et al. bei Parkinson-Patienten mit einseitigen motorischen Symptomen in 20% der Fälle Ablagerungen auf der motorisch betroffenen Seite, in 60% Ablagerungen auf beiden Seiten und in 20% Ablagerungen auf der nicht motorisch betroffenen Seite (Donadio et al., 2017a). Hieraus lässt sich schließen, dass die Verteilung des Phospho-Alpha-Synucleins unabhängig der von den Motorsymptomen betroffenen Seite ist (Donadio et al., 2017a).

1.2.5.5 Periphere Verteilung von Alpha-Synuclein hinsichtlich der betroffenen Hautstruktur

Auch die Frage nach der Verteilung von Alpha-Synuclein hinsichtlich der betroffenen Hautstruktur gestaltet sich interessant.

Wang et al. beschrieben 2013 eine erhöhte Ablagerung von nativem, also nicht phosphoryliertem, Alpha-Synuclein in autonomen Nervenfasern, die Schweißdrüsen umgeben und Arrector-pili-Muskeln innervieren, jedoch nicht in der Epidermis (Wang et al., 2013).

Im Gegensatz dazu beschrieben Donadio et al. Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen bei Patienten mit M. Parkinson hauptsächlich in dermalen Nervenbündeln und in Arteriolen, zu einem geringeren Teil auch in

Schweißdrüsen und Arrector-pili-Muskeln und sehr selten auch in subepidermalen Plexus und um Haarfollikel (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016). In der Epidermis wurden keine Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen beschrieben (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016).

In einem Vorläuferprojekt unserer Arbeitsgruppe konnten phosphorylierte Alpha-Synuclein-Ablagerungen bei Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom überwiegend in kleinen autonomen Nervenfasern gefunden werden, die Blutgefäße und Arrector-Pili-Muskeln innervieren, weniger häufig konnten jedoch auch Ablagerungen in dermalen Nervenbündeln und in somatosensorischen Fasern des subepidermalen Plexus und der dermalen Papillen gefunden werden, selten auch in intraepidermalen Nervenfasern (Doppler et al., 2014).

In einem folgenden Forschungsprojekt unserer Arbeitsgruppe waren bei Patienten mit idiopathischem M. Parkinson erneut fast alle Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in autonomen Nervenfasern zu finden, wohingegen lediglich in einem Patienten Ablagerungen in somatosensorischen Fasern des subepidermalen Plexus gefunden werden konnten (Doppler et al., 2015).

Bei der idiopathischen orthostatischen Hypotonie präsentieren sich Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen überwiegend in autonomen Fasern um Schweißdrüsen, um Blutgefäße, in Arrector-Pili-Muskeln und innerhalb von dermalen Nervenbündeln (Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a). Auch bei der Lewy-Körperchen-Demenz lagern sich die Alpha-Synuclein-Aggregate in autonomen Nervenfasern ab (Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a).

Im Gegensatz dazu wurden in einer Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe und von Donadio et al. bei Patienten mit MSA fast ausschließlich Ablagerungen in somatosensorischen Nervenfasern des subepidermalen Plexus gefunden (Doppler et al., 2015; Donadio et al., 2018a).

Zusammengefasst findet sich Phospho-Alpha-Synuclein beim idiopathischen M. Parkinson, der idiopathischen orthostatischen Hypotonie und der Lewy-Körperchen-Demenz also überwiegend in autonomen Nervenfasern und bei der

Multisystematrophie fast ausschließlich in somatosensorischen Nervenfasern (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015)

1.2.5.6 Vorteile einer möglichen Diagnostik mittels Hautbiopsien

Eine mögliche in vivo Diagnostik mittels Hautbiopsien bietet eine Reihe von Vorteilen. Hautbiopsien sind leicht durchzuführen, bereitem dem Patienten lediglich geringe Unannehmlichkeiten und sind kostengünstig (Donadio et al., 2017a; Donadio, 2018b).

1.3 Zielsetzung und Arbeitsplan der Studie

1.3.1 Zielsetzung

Das Ziel der Studie war, pathologisches Alpha-Synuclein in der Haut als potenziellen Biomarker zur Diagnostik des M. Parkinson zu evaluieren und die Detektionsrate bei Verwendung verschiedener Antikörper zu vergleichen. Durch die Anwendung von Stufenschnitten sollte die Sensitivität erhöht werden. In die Studie sollten nur frühe Erkrankungsstadien eingeschlossen werden, um den Biomarker hinsichtlich seines frühdiagnostischen Potenzials zu testen.

1.3.2 Arbeitsplan

Zu Beginn der Studie wurde folgender Arbeitsplan festgelegt:

- Prospektive Rekrutierung von Patienten mit idiopathischem M. Parkinson in den Stadien I und II nach Hoehn und Yahr
- Entnahme von Hautbiopsien an vier Körperstellen:
 - rechter Unterschenkel (10 cm oberhalb des Malleolus lateralis)
 - rechter Oberschenkel (10 cm unterhalb des Trochanter majors)
 - paravertebral rechts (auf Höhe des 10. Brustwirbelkörpers)

- paravertebral rechts (auf Höhe des siebten Halswirbelkörpers)
- Erhebung zweier Fragebögen zur Erfassung der nicht-motorischen Symptome:
 - Teil I: Erfahrungen des täglichen Lebens – nicht-motorische Aspekte (nM-EDL) des MDS-UPDRS
 - Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome bei der Parkinson-Erkrankung (NMSS)
- Anfertigung von Stufenschnitten der Dicke 20µm
- Anfärben von pathologischem, phosphoryliertem Alpha-Synuclein und Evaluation zweier verschiedener Antikörper
- Anfärben von trunkiertem Alpha-Synuclein

2 Patientenkollektiv, Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg befürwortet (Nr. 127/14).

2.1 Studienteilnehmer

2.1.1 Probanden mit M. Parkinson

Das Patientenkollektiv umfasst 28 Personen mit idiopathischem Morbus Parkinson. Die Diagnose wurde nach den Kriterien der United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank gestellt (Hughes et al., 1992).

Vor Beginn der Studie wurden verschiedene Ein- und Ausschlusskriterien definiert. In die Studie sollten nur Patienten, die an einem idiopathischem Parkinson-Syndrom erkrankt sind, aufgenommen werden. Darüber hinaus sollten sie sich in einem frühen Stadium der Erkrankung, nach der Hoehn und Yahr-Skala in den Stadien I und II, befinden. Ein Ausschlusskriterium war das Vorliegen eines atypischen Parkinson-Syndroms. Darüber hinaus wurde aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos auch die Einnahme von oralen Antikoagulantien als Ausschlusskriterium festgelegt.

Die Rekrutierung des gesamten Patientenkollektivs erfolgte zwischen November 2014 und Juni 2016 an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg. 26 Patienten befanden sich in ambulanter Behandlung, zwei der Probanden wurden während eines stationären Aufenthalts rekrutiert.

Nach Hoehn und Yahr befanden sich 12 Patienten in Stadium I und 16 Probanden in Stadium II. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei 63 Jahren (44 bis 77 Jahre), 16 Patienten waren männlich, 12 weiblich. Tabelle 3 gibt einen Überblick über Geschlecht, Alter und Erkrankungsstadien der Probanden.

Studienteilnehmer	Geschlecht	Alter	Hoehn-und-Yahr-Stadium
1	w	63	I
2	m	69	I
3	w	70	II
4	w	62	I
5	m	55	II
6	w	65	II
7	m	62	I
8	w	72	II
9	w	50	II
10	m	44	I
11	m	67	II
12	w	68	II
13	m	51	II
14	w	61	I
15	m	73	II
16	m	73	II
17	w	54	I
18	m	76	II

19	m	61	II
20	m	55	II
21	w	63	II
22	m	66	I
23	m	59	I
24	m	63	I
25	w	67	I
26	w	77	II
27	m	63	II
28	m	58	I

Tabelle 3: Alter, Geschlecht und Krankheitsstadium der Patienten; m=männlich, w=weiblich

2.1.2 Gesunde Probanden

Als Kontrollpersonen wurden 5 Personen in die Studie eingeschlossen, die für eine Studie an Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörung an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert worden waren (Doppler et al., 2017). Es handelte sich dabei um klinisch asymptomatische Angehörige von Patienten.

Auch für die gesunden Kontrollen wurden Ein- und Ausschlusskriterien definiert. Die Kontrollpersonen durften nicht an einem Parkinson-Syndrom erkrankt sein. Des Weiteren durfte ebenfalls keine Einnahme von oralen Antikoagulantien vorliegen.

Das durchschnittliche Alter der gesunden Probanden betrug 64,4 Jahre (47 bis 80 Jahre), 4 Kontrollpersonen waren männlich, eine weiblich. Tabelle 4 gibt einen Überblick über Geschlecht und Alter der Kontrollpersonen.

Studienteilnehmer	Geschlecht	Alter
1	w	47
2	m	51
3	m	69
4	m	75
5	m	80

Tabelle 4: Alter und Geschlecht der Kontrollpersonen; m=männlich, w=weiblich

2.2 Hautbiopsien

2.2.1 Biopsieorte

Bei den Studienteilnehmern und den Kontrollpersonen wurden jeweils vier Hautbiopsien entnommen. Die Entnahme erfolgte am rechten Unterschenkel 10 cm oberhalb des Malleolus lateralis, am rechten Oberschenkel 10 cm unterhalb des Trochanter majors, paravertebral rechts auf Höhe des 10. Brustwirbelkörpers und paravertebral rechts auf Höhe des siebten Halswirbelkörpers.

2.2.2 Aufklärung

Die Entnahme der Hautbiopsien erfolgte nach einer ausführlichen Aufklärung über den Ablauf und mögliche Komplikationen. Die Patienten wurden über mögliche allergische Reaktionen gegen das Lokalanästhetikum, Wundheilungsstörungen, Infektionen der Wunde und Nachblutungen informiert. Den Patienten wurde zudem eine schriftliche Teilnahmeinformation ausgehändigt und die Patienten wurden nur nach Unterzeichnen einer schriftlichen Einwilligungserklärung in die Studie aufgenommen. Die Patienteninformation und die Einwilligungserklärung sind im Anhang zu finden.

2.2.3 Hautentnahme

Bei der Durchführung der Biopsien wurde auf eine sterile Vorgehensweise geachtet. Zunächst wurden die Entnahmestellen drei Mal gründlich mit Cutasept F Hautdesinfizienz (BODE Chemie GmbH, Hamburg) und sterilen Mullkompressen (Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Regensburg, Deutschland) gereinigt. Zur Lokalanästhesie wurde anschließend eine einprozentige Scandicain-Lösung (AstraZeneca, London, Großbritannien) in die entsprechenden Hautareale injiziert. Die Hautbiopsie erfolgte schließlich mit einer sterilen Stanze (Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach am Main, Deutschland) mit einem Durchmesser von 5 mm. Hierbei wurden eine chirurgische Pinzette und eine Skalpellklinge (B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) zur Hilfe genommen, um die ausgestanzten Gewebeproben vom umgebenden Bindegewebe zu trennen. Es wurden zur Entnahme sterile Handschuhe (Protexis Latex, Cardinal Health, Waukegan, USA) getragen. Die Wunden wurden sofort und so lange komprimiert, bis die Blutung gestillt war. Daraufhin wurden die Wundränder mit Hilfe von Steristrips (Smith & Nephew Medical Limited, Wound Management, Hull, England) adaptiert und mit einem großen Pflaster (Leukomed hospital, 5 x 7,2 cm, Hamburg, Deutschland) abgedeckt, um mögliche Verschmutzungen zu vermeiden.

2.2.4 Fixation und Aufbereitung der Hautbiopsien

Zur Fixierung wurden die entnommenen Gewebeproben für 30 Minuten zusammen mit 4% Paraformaldehyd (laboreigene Herstellung) in kleine Probengefäße gegeben. Daraufhin wurden die Hautzylinder drei Mal jeweils 10 Minuten mit 0,1 molarem-Phosphatpuffer gewaschen, um überschüssiges Fixativ zu entfernen. Anschließend wurden die Proben in einer 10% Saccharose-Lösung (laboreigene Herstellung) bei 4°C über Nacht aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag wurden die Proben in kleine Formen gelegt, welche anschließend mit Tissue Tek aufgefüllt wurden. Im nächsten Arbeitsschritt wurden die Behälter für ein bis zwei Minuten in einen mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Becher mit 2-Methylbutan (laboreigene Herstellung) gegeben und auf diese Weise

eingefroren. Die gefrorenen Hautbiopsien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.5 Stufenschnitte

Im nächsten Arbeitsschritt wurden von den Gewebeproben mit Hilfe des Kryostats (CM 3050S, Leica) 20 µm Schnitte angefertigt. Je Gewebeprobe wurden 20 Super Frost Objektträger mit jeweils 5 Schnitten versehen. Die Stufenschnitte wurden nach folgendem Schema angefertigt: Der erste Schnitt wurde auf dem ersten Objektträger, der zweite auf dem zweiten und der dritte auf dem dritten Objektträger platziert. Dieses Schema wurde bis zum zehnten Objektträger fortgeführt. Anschließend wurde der 11. Schnitt wieder auf dem ersten Objektträger positioniert. Gemäß dieser Methode wurden zunächst die ersten 10 Objektträger und anschließend weitere 10 Objektträger fertiggestellt. Schließlich erhielt man durch dieses Prinzip Objektträger, welche jeweils jeden 10. Schnitt enthalten. Abbildung 1 veranschaulicht die Vorgehensweise der Stufenschnitte.

OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10
S 1	S 2	S 3	S 4	S 5	S 6	S 7	S 8	S 9	S 10
S 11	S 12	S 13	S 14	S 15	S 16	S 17	S 18	S 19	S 20
S 21	S 22	S 23	S 24	S 25	S 26	S 27	S 28	S 29	S 30
S 31	S 32	S 33	S 34	S 35	S 36	S 37	S 38	S 39	S 40
S 41	S 42	S 43	S 44	S 45	S 46	S 47	S 48	S 49	S 50

Abbildung 1: Prinzip der Stufenschnitte; OT=Objektträger, S=Schnitt

Die Schnitte wurden luftgetrocknet und anschließend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Ablauf der Fluoreszenz-Färbungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden im Zeitraum zwischen Mai 2015 und Oktober 2016 drei unterschiedliche Färbungen durchgeführt.

Die Hautschnitte wurden zunächst für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Für alle weiteren Arbeitsschritte wurden die Schnitte in eine feuchte Kammer gegeben, um ein mögliches Austrocknen während des Färbens zu verhindern. Die Schnitte wurden für 30 Minuten mit einer 10% BSA in PBS-Lösung bedeckt, um unspezifische Bindungen zu blocken. Die Lösung wurde dann durch vorsichtiges Abklopfen von den Objektträgern entfernt. Nun wurden die Primärantikörper in 1% BSA in PBS und 0,3% Triton aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden die Objektträger zuerst in drei Arbeitsschritten in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Sekundärantikörper in 1% BSA in PBS aufgebracht und die Schnitte für zwei Stunden bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger drei Mal in PBS gewaschen. Die Objektträger wurden mit Vectashield Mounting Medium mit DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA) eingedeckt, mit einem Deckglas versehen und mit einem Deckglaslack umrandet. Die gefärbten Objektträger wurden bis zur weiteren Verwendung gekühlt und lichtgeschützt gelagert.

2.3.2 Antikörper

2.3.2.1 Färbung 1: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein und Anti-PGP9.5

Als Primärantikörper wurde zum einen ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen an Serin 129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein (*BioLegend®*, San Diego, USA) und zum anderen ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen PGP9.5 (Protein Gene Product) als axonaler Marker verwendet. Zunächst wurde der Anti-PGP9.5-Antikörper von *UltraClone Limited (Wellow Isle of Wight, England)* verwendet, aufgrund von Lieferschwierigkeiten wurde der Antikörper im Verlauf der Studie jedoch durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen PGP9.5 des Herstellers *Abcam (USA)* ersetzt. Da dieser Antikörper jedoch nicht zufriedenstellend als axonaler Marker fungierte (schwache Anfärbung), wurde dieser im weiteren Verlauf durch einen Kaninchen-Antikörper gegen PGP9.5 von *ZYTOMED SYSTEMS (Berlin)* ersetzt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper der ersten Färbung.

Antikörper	Art	Verdünnung	Zielstruktur	Hersteller
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 1	Monoklonaler Maus-Ak	1:500	an Serin129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein	BioLegend®, San Diego, USA
Anti-PGP 9.5 Nr. 1	Polyklonaler Kaninchen-Ak	1:800	Protein Gene Product, axonaler Marker	UltraClone Limited, Wellow Isle of Wight, England
Anti-PGP 9.5 Nr. 2	Polyklonaler Kaninchen-Ak	1:500	Protein Gene Product, axonaler Marker	Abcam®, USA
Anti-PGP 9.5 Nr. 3	Kaninchen-Ak	1:200	Protein Gene Product, axonaler Marker	ZYTOMED SYSTEMS, Berlin

Tabelle 5: Primärantikörper Immunfluoreszenzdoppelfärbung 1; Ak=Antikörper

2.3.2.2 Färbung 2: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Truncated-Alpha-Synuclein und Anti-Phospho-Alpha-Synuclein

Für die zweite Färbung wurde erneut der monoklonale Maus-Antikörper gegen an Serin 129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein (*BioLegend®*, San Diego, USA) und zudem ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen Truncated Alpha-Synuclein von *Prothena Biosciences Inc* (San Francisco, USA) verwendet. Tabelle 6 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper der zweiten Färbung.

Antikörper	Art	Verdünnung	Zielstruktur	Hersteller
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 1	Monoklonaler Maus-Ak	1:500	An Serin129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein	BioLegend®, San Diego, USA
Anti-Synuclein 105	Kaninchen-Ak	1:500	Truncated Alpha-Synuclein	Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA

Tabelle 6: Primärantikörper Immunfluoreszenzdoppelfärbung 2; Ak=Antikörper

2.3.2.3 Färbung 3: Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein und Anti-PGP9.5

Die verwendeten Primärantikörper für die dritte Färbung waren ein Maus-Antikörper gegen an Serin 129 phosphoryliertes Alpha-Synuclein von *Prothena Biosciences Inc* (San Francisco, USA) und der Kaninchen-Antikörper gegen PGP9.5 von *ZYTOMED SYSTEMS* (Berlin). Tabelle 7 gibt einen Überblick über die verwendeten Primärantikörper der dritten Färbung.

Antikörper	Art	Verdünnung	Zielstruktur	Hersteller
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 2	Maus-Ak	1:500	An Serin129 phosphoryliertes Alpha – Synuclein	Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA
Anti-PGP 9.5 Nr. 3	Kaninchen-Ak	1:200	Protein Gene Product, axonaler Marker	ZYTOMED SYSTEMS, Berlin

Tabelle 7: Primärantikörper Immunfluoreszenzdoppelfärbung 3; Ak=Antikörper

Für alle drei Färbungen wurden die gleichen Sekundärantikörper verwendet, der rot fluoreszierende Alexa Fluor Esel-IgG-Ak gegen Kaninchen-IgG von *Jackson ImmunoResearch Laboratories (USA)* und der grün fluoreszierende CyTM3 Esel-IgG -Ak gegen Maus-IgG von *Jackson ImmunoResearch Laboratories (USA)*. Tabelle 8 gibt einen Überblick über die verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Art	Verdünnung	Farbe	Hersteller
Alexa Fluor	Esel-IgG-Ak gegen Kaninchen-Ag	1:400	rot	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA
Cy TM 3	Esel-IgG -Ak gegen Maus-Ag	1:100	grün	Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA

Tabelle 8: Primärantikörper Immunfluoreszenzdoppelfärbung 3; Ak=Antikörper, Ag=Antigen

2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop (Ax10, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einem CARVII – System und einer Visiview Software (Visitron GmbH, Puchheim, Deutschland).

Die Hautschnitte wurden nach immunfluoreszenzpositiven Alpha-Synuclein-Ablagerungen untersucht. In den Doppelimmunfluoreszenzfärbungen 1 und 3 (Antikörper Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 1 von BioLegend®, San Diego, USA und Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 2 von Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) wurden diejenigen Hautschnitte als positiv gewertet, die sowohl für Phospho-Alpha-Synuclein, als auch für PGP9.5 (Protein Gene Product) positiv waren.

Doppelimmunfluoreszenzfärbung 2 (Antikörper Anti-Phospho-Alpha-Synuclein Nr. 1 von BioLegend®, San Diego, USA und Anti-Synuclein 105 Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) wurde zum einen hinsichtlich Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen untersucht, zum anderen auch hinsichtlich Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein. Darüber hinaus wurde eine mögliche Kollokalisierung von phosphoryliertem und trunkiertem Alpha-Synuclein geprüft.

Bei allen Färbungen wurde analysiert, welche Strukturen die positiven Nervenfasern innervieren.

2.5 Patientenfragebögen

Zur Erfassung der nicht-motorischen Symptome wurden zwei Fragebögen erhoben, Teil I: Erfahrungen des täglichen Lebens – nicht-motorische Aspekte (nM-EDL) des MDS-UPDRS und die Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome bei der Parkinson-Erkrankung (Non-Motor Symptoms assessment scale for Parkinson's disease). 23 Probanden nahmen an der Befragung im Rahmen der Patientenfragebögen teil, 5 Patienten standen hierfür nicht zur Verfügung.

2.5.1 Teil I: Erfahrungen des täglichen Lebens – nicht-motorische Aspekte (nM-EDL) des MDS-UPDRS

Teil eins des MDS-UPDRS erfasst die nicht-motorischen Aspekte des täglichen Lebens. Er beinhaltet 13 Fragen nach kognitiver Beeinträchtigung, Halluzinationen und Psychose, depressiver Verstimmung, ängstlicher Verstimmung, Apathie, Merkmalen eines Dopamin-Dysregulationssyndroms, Schlafstörungen, Tagesschläfrigkeit, Schmerz und anderen Empfindungen, Miktionsproblemen, Verstopfung, Schwindelgefühl und Fatigue (Goetz et al., 2008). Die mögliche erreichbare Punktzahl liegt zwischen 0 und 52 (Goetz et al., 2008).

2.5.2 Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome bei der Parkinson-Erkrankung

Der NMSS (Non-Motor Symptoms assessment scale for Parkinson's disease) ist ein Fragebogen, in dem in 30 Fragen in 9 Bereichen die nicht-motorischen Symptome erfasst werden. Bereich 1 testet das kardiovaskuläre Risiko und Synkopen, Bereich 2 Schlafstörungen und Müdigkeit, Bereich 3 Stimmung und Kognition, Bereich 4 Wahrnehmungsprobleme und Halluzinationen, Bereich 5 Aufmerksamkeit und Gedächtnis, Bereich 6 den Gastrointestinaltrakt, Bereich 7 die Miktion, Bereich 8 die Sexualfunktion und Bereich 9 verschiedene weitere Symptome (Storch et al., 2010). Die mögliche erreichbare Punktzahl liegt zwischen 0 und 360 (Storch et al., 2010).

2.5.3 Statistische Analyse

Die Hauptfragestellung der Studie war die Ermittlung der diagnostischen Genauigkeit (Fläche unter der Kurve, Sensitivität/Spezifität) des Nachweises von P-Alpha-Syn in Frühstadien der Parkinsonerkrankung. Als Gold-Standard diente die klinische Diagnose nach den Kriterien der United Kingdom Parkinson's disease Society Brain Bank (Hughes et al., 1992). Da in Vorläuferstudien bereits eine Vielzahl von Kontrollen untersucht worden war, die allesamt keinen

Nachweis von dermalem Phospho-Alpha-Synuclein gezeigt hatten, wurde keine neue Kontrollgruppe für die Hauptfragestellung eingeplant.

Unter der Annahme einer Sensitivität von 70% und einer Spezifität von >90% konnte man das 95%-Konfidenzintervall der Fläche unter der Kurve (AUC) bei einer Fallzahl von 27 Erkrankten mit einer Präzision von 20% bestimmen (David Machin: Sample Size Tables for Clinical Studies, Wiley-Verlag, Tabelle 13.6, S. 177).

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Software SPSS Statistics 21 (IBM Deutschland GmbH) ausgewertet. Für die statistische Analyse von Korrelationen wurde für den Vergleich von ordinalen mit nominalen Variablen aufgrund der Stichprobengröße zwischen 20 und 50 bei einer erwarteten Zellhäufigkeit von mindestens 5 die Korrektur nach Yates (=Kontinuitätskorrektur) und bei einer erwarteten Zellhäufigkeit von kleiner als 5 der exakte Test nach Fisher verwendet. Für den Vergleich von nominalen mit metrischen Variablen wurde der Eta-Koeffizient eingesetzt. Als Signifikanzniveau wurde jeweils ein Wert von $p=0,05$ gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten und Auswertung der Fragebögen

3.1.1 Überblick über die klinischen Daten

Tabelle 9 gibt einen Überblick über die klinischen Daten. Beschrieben werden das Geschlecht, das Durchschnittsalter, das Erkrankungsstadium nach Hoehn und Yahr, die durchschnittliche Erkrankungsdauer nach Erstmanifestation bis zum Zeitpunkt der Hautbiopsie, der durchschnittlich erreichte Wert in den Patientenfragebögen und die verschiedenen Verlaufsformen des M. Parkinson.

Geschlecht	Männlich: 16 Weiblich: 12
mittleres Alter (σ)	63,1 (+/- 8,0) Jahre
Erkrankungsstadium nach Hoehn und Yahr	Stadium I: 12 Stadium II: 16
mittlere Erkrankungsdauer (σ)	4,73 (+/- 4,2) Jahre
Mittelwert UPDRS I (σ)	6,8 (+/- 5,3) Punkte
Mittelwert NMSS (σ)	33,3 (+/- 27,2) Punkte
Verlaufsformen	Akinetisch-rigider Typ: 15 Tremordominanz-Typ: 9 Äquivalenztyp: 4

Tabelle 9: Überblick über die klinischen Daten und die Auswertung der Fragebögen; σ =Standardabweichung

3.1.2 Auswertung der Patientenfragebögen

Bei der Auswertung des 1. Teils des UPDRS Fragebogens ergab sich ein Mittelwert von 6,83 Punkten. Die niedrigste erreichte Punktzahl lag bei 1, der höchste Wert war 23. Bei den Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium I lag der Mittelwert bei 4,11 Punkten, wohingegen sich bei den Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium II ein Mittelwert von 8,57 ergab.

Bei der Befragung mit Hilfe des NMS Fragebogens erreichten die Patienten einen Mittelwert von 33,26 Punkten. Die erreichte Punktzahl reichte von 1 bis 115. Die Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium I erreichten einen Mittelwert von 18,11 Punkten, die Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium II einen Mittelwert von 43 Punkten.

3.2 Auswertung der Hautbiopsien

3.2.1 Phospho-Alpha-Synuclein

3.2.1.1 *Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-PGP9.5*

Bei 22 von 28 Patienten mit idiopathischem M. Parkinson (78,6%) konnten Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen gefunden werden. Betrachtet man nur die 12 Patienten im Stadium I nach Hoehn und Yahr präsentierten sich 7 von 12 (58,3%) positiv, wohingegen bei den Patienten in Stadium II 15 von 16 (93,8%) Ablagerungen aufwiesen. In den Hautbiopsien der gesunden Kontrollen wurden keine Ablagerungen gefunden.

Die Abbildungen 2 und 3 präsentieren die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (siehe linke Seite der Abbildungen) und setzen diese in Projektion auf die Nervenfasern (siehe rechte Seite der Abbildungen).

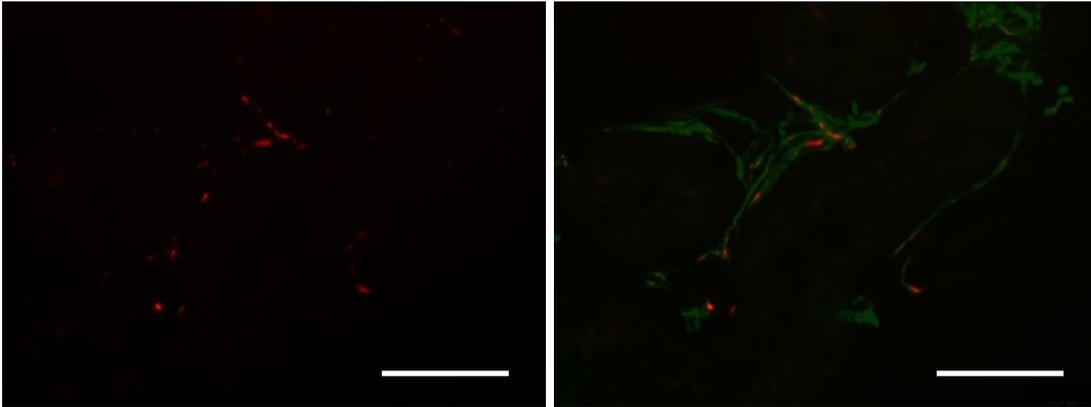


Abbildung 2: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-PGP9.5; Die linke Seite zeigt Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot); Die rechte Seite zeigt die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot) in Projektion auf die mit Anti-PGP9.5 grün angefärbten Nervenfasern; Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50µm

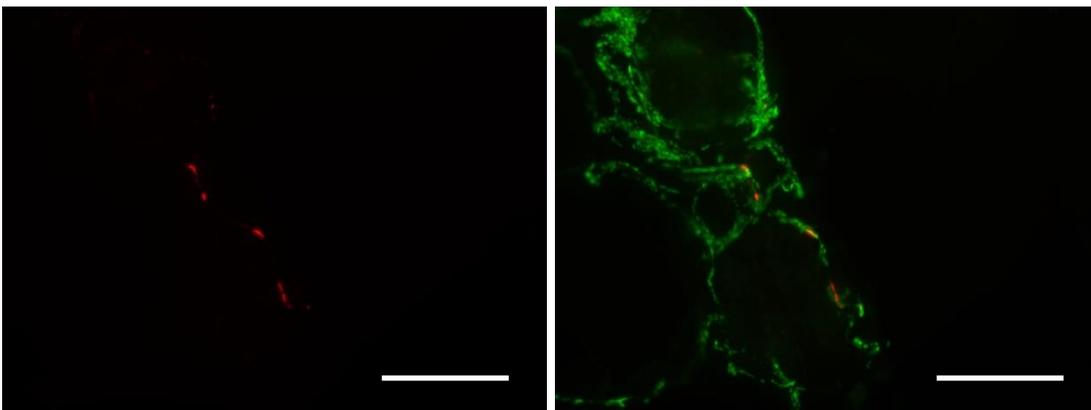


Abbildung 3: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-PGP9.5; Die linke Seite zeigt Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen um Schweißdrüsen (rot); Die rechte Seite zeigt die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot) in Projektion auf die mit Anti-PGP9.5 grün angefärbten Nervenfasern; Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50µm

Die Ablagerungen zeigten sich in autonomen Nervenfasern (vasomotorische, sudomotorische und pilomotorische Fasern), somatosensiblen Fasern (subepidermaler Nervenplexus) und nicht näher spezifizierbaren Fasern (dermale Nervenfaserbündel). Lediglich bei 4 von den 22 (18,2%) für Phospho-Alpha-Synuclein positiven Patienten konnten Ablagerungen in Nervenfasern des subepidermalen Plexus und bei 5 von 22 (22,7%) in Nervenfasern der Arrector-pili-Muskeln detektiert werden. Häufiger präsentierten sich Ablagerungen in

Nervenfasern um Schweißdrüsen, bei 7 von 22 (31,8%). Ablagerungen in dermalen Nervenfaserbündeln zeigten sich sogar in 14 von 22 (63,6%) Fällen. Am häufigsten konnten Ablagerungen in Nervenfasern um Blutgefäße gefunden werden, diese zeigten sich bei 19 von 22 (86,4%) positiven Patienten.

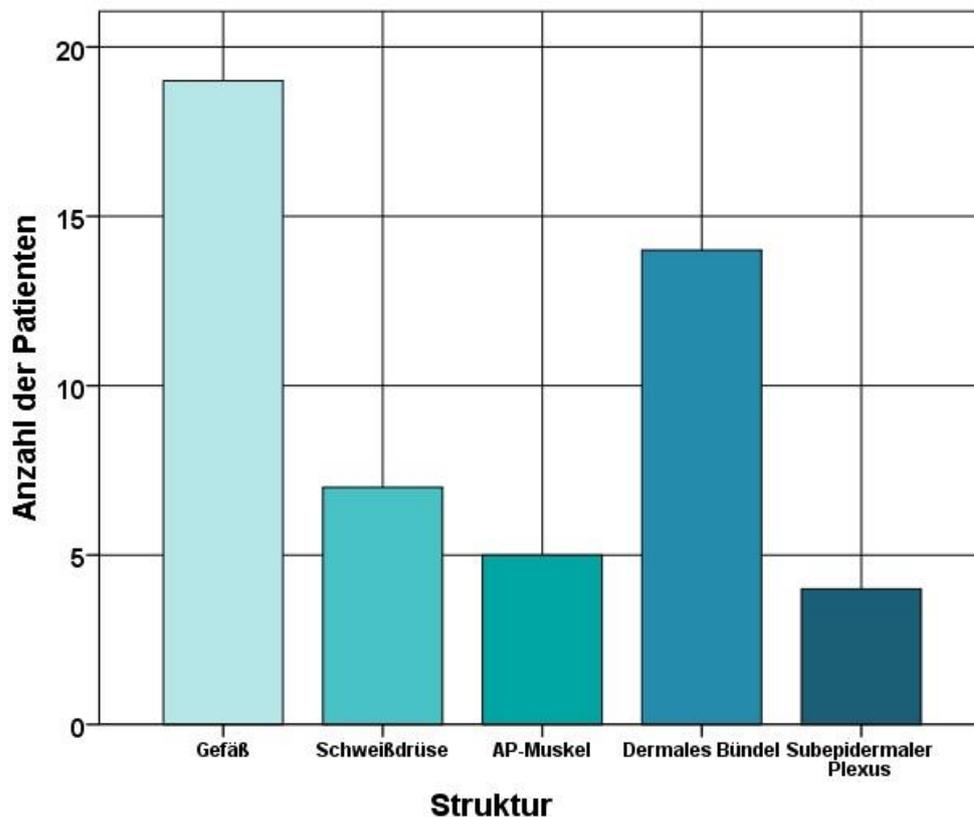


Diagramm 1: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Hautstruktur

Hinsichtlich der Entnahmestelle der Hautbiopsie zeigten von den insgesamt 22 als positiv gewerteten Patienten 13 (59,1%) Ablagerungen in der Biopsie des Unterschenkels, bei 11 (50%) konnten Ablagerungen im Oberschenkel gefunden werden, bei 7 (31,8%) im Rücken (Th10) und bei 8 (36,4%) im Nacken (C7).

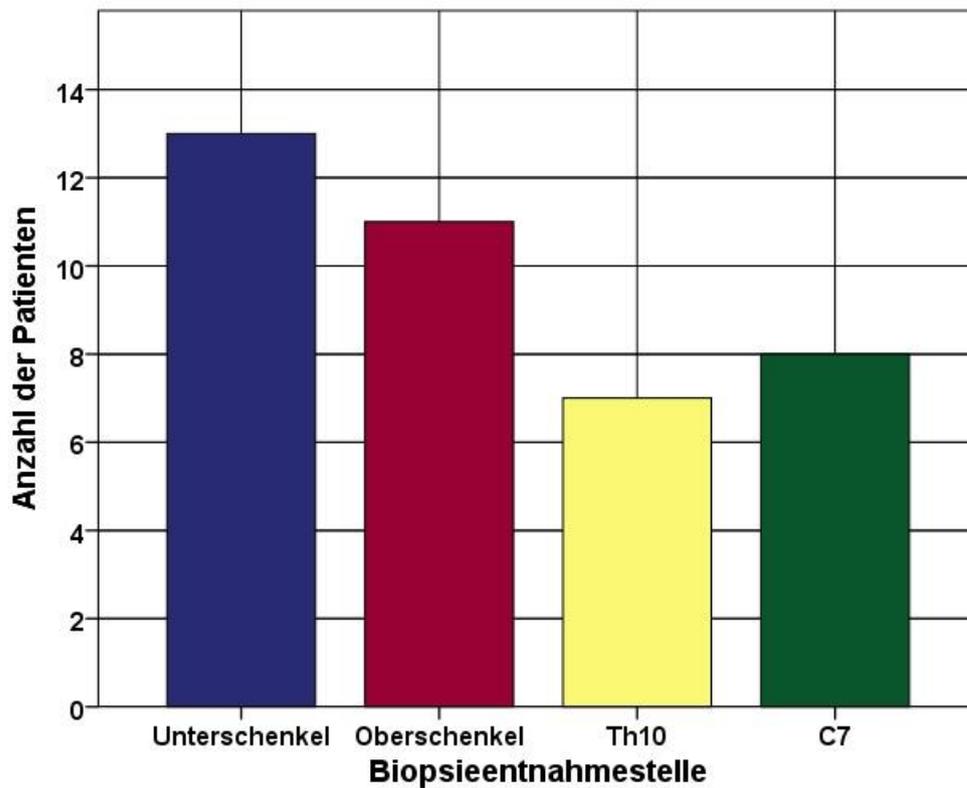


Diagramm 2: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

Tabelle 10 gibt eine Zusammenfassung über die Häufigkeit der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit der verschiedenen Klassifikationsgruppen.

Klassifikationsgruppe	Unterteilung	Positiv für Phospho-Alpha-Synuclein
Gesamtes Patientenkollektiv		22/28 (78,6%)
Hoehn-und-Yahr-Stadium	I	7/12 (58,3%)
	II	15/16 (93,8%)
Verlaufsform	Akinetisch-rigider Typ	11/15 (73,3%)
	Tremordominanz-Typ	7/9 (77,8%)
	Äquivalenztyp	4/4 (100%)

Tabelle 10: Überblick über die Häufigkeit der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

3.2.1.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothema Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-PGP9.5

Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen zeigten sich bei 13 von 28 (46,4%) der Patienten mit idiopathischem M. Parkinson. Bei 5 von 12 Patienten (41,7%) in Hoehn-und-Yahr-Stadium I und 8 von 16 Patienten (50%) in Stadium II konnten Ablagerungen gefunden werden. In den Biopsaten der gesunden Kontrollen wurde keine einzige Ablagerung gefunden.

Alle in dieser Färbung positiven Fälle zeigten auch in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein von BioLegend® (San Diego, USA) Ablagerungen (siehe 3.2.1.1).

Die Abbildungen 4 und 5 präsentieren die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (siehe linke Seite der Abbildungen) und setzen diese in Projektion auf die Nervenfasern (siehe rechte Seite der Abbildungen).

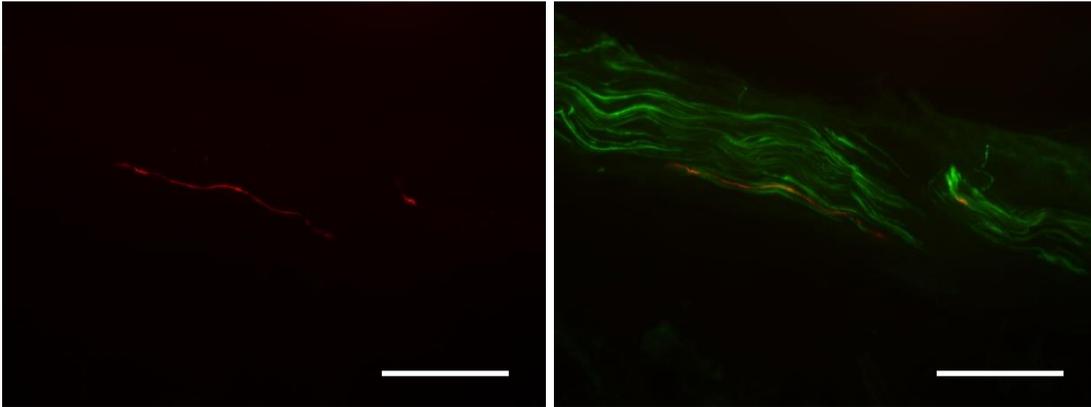


Abbildung 4: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-PGP9.5; Die linke Seite zeigt Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot); Die rechte Seite zeigt die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot) in Projektion auf die mit Anti-PGP9.5 angefärbten Nervenfasern; Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μ m

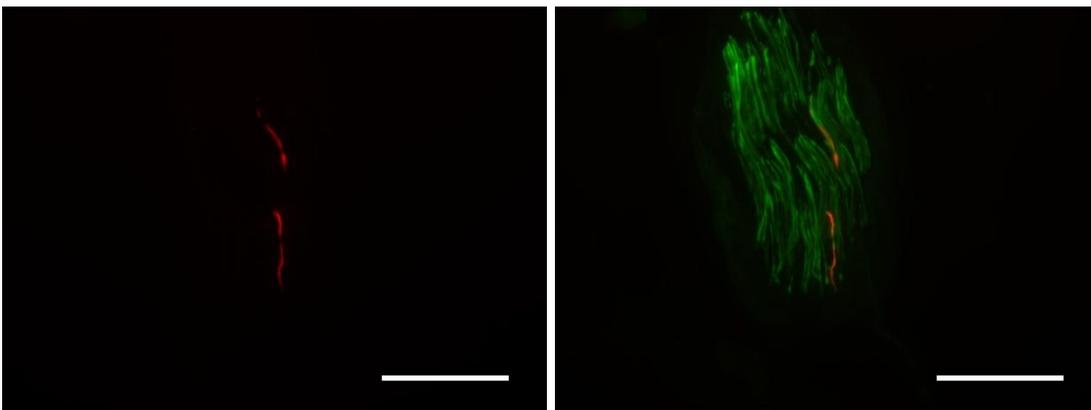


Abbildung 5: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-PGP9.5; Die linke Seite zeigt Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot); Die rechte Seite zeigt die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot) in Projektion auf die mit Anti-PGP9.5 grün angefärbten Nervenfasern; Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50 μ m

Die Ablagerungen zeigten sich erneut in Nervenfasern um Blutgefäße, Schweißdrüsen, in Arrector-pili-Muskeln, in dermalen Nervenfaserbündeln und subepidermalen Plexus. Nur 2 der 13 (15,4%) für Phospho-Alpha-Synuclein positiven Fälle zeigten Ablagerungen in subepidermalen Plexus, auch in nur 2 der 13 (15,4%) konnten Ablagerungen in Arrector-pili-Muskeln nachgewiesen werden. Jeweils 3 von 13 (23,1%) präsentierten sich in dermalen Nervenfaserbündeln und in Nervenfasern um Schweißdrüsen positiv. Jedoch

konnten in 12 von 13 (92,3%) für Phospho-Alpha-Synuclein positiven Patienten Ablagerungen in Blutgefäßen gefunden werden.

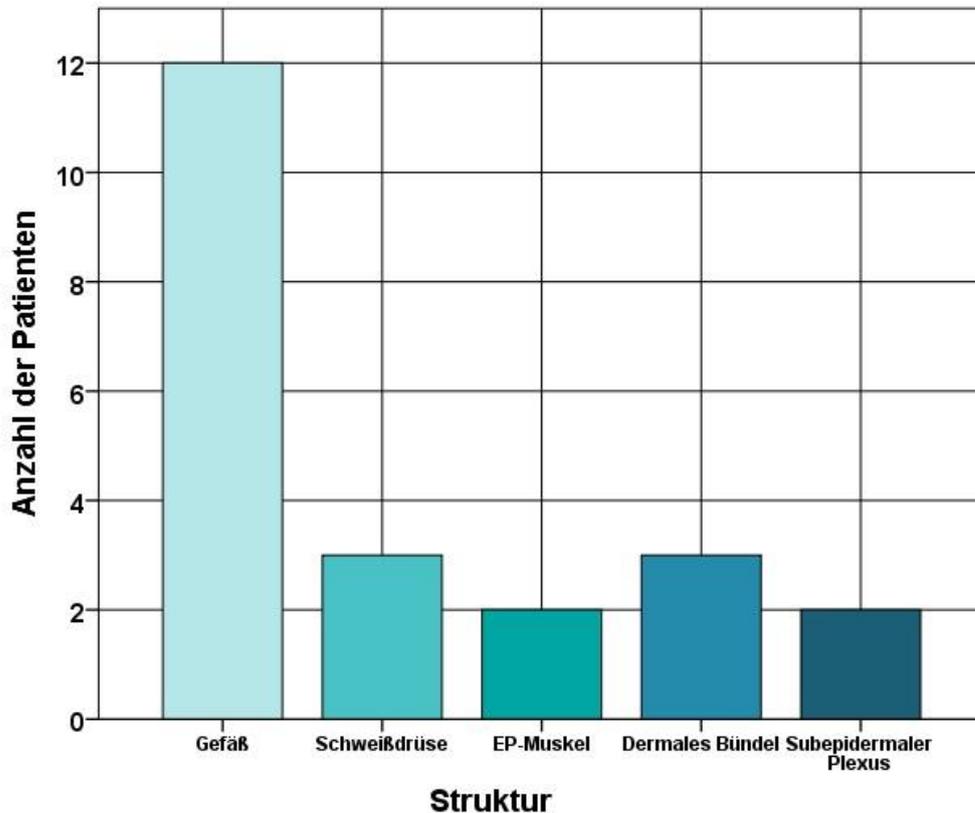


Diagramm 3: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Hautstruktur

Bezüglich der Entnahmestelle der Hautbiopsie zeigten von den insgesamt 13 für Phospho-Alpha-Synuclein positiv gewerteten Patienten 8 (61,5%) Ablagerungen in der Biopsie des Unterschenkels, 6 (46,2%) in der Hautprobe des Oberschenkels, 7 (53,8 %) im Rücken und 5 (38,5%) im Nacken. Erneut präsentierte sich der Unterschenkel also als die am häufigsten positive Entnahmestelle.

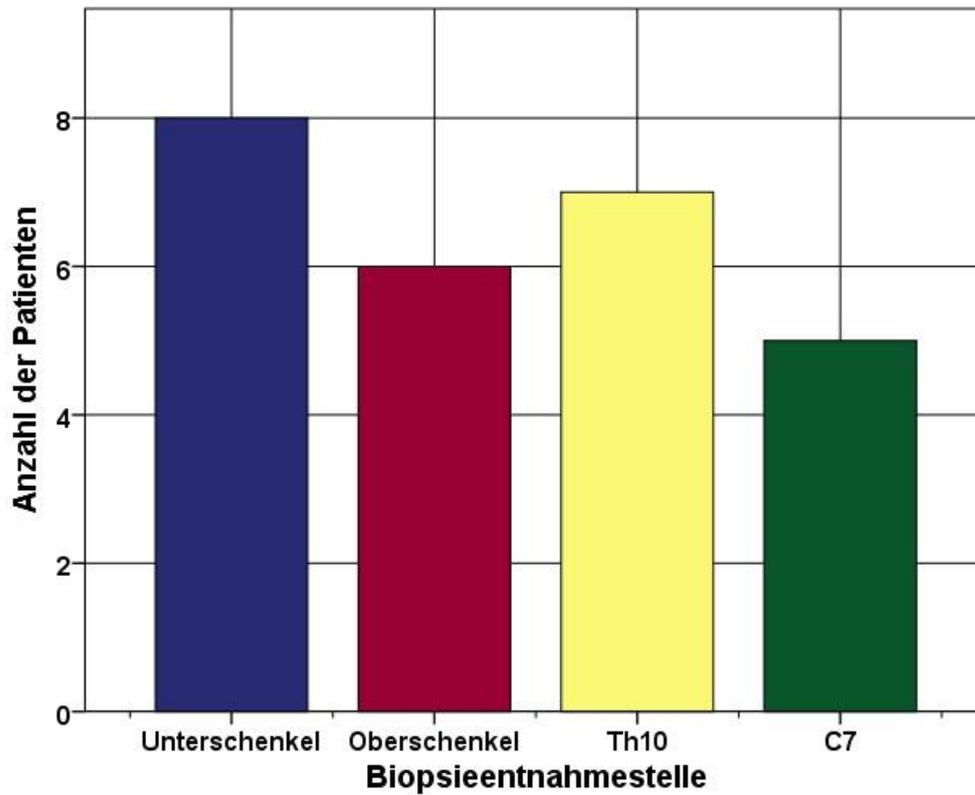


Diagramm 4: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

Tabelle 11 gibt eine Zusammenfassung über die Häufigkeit der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit der verschiedenen Klassifikationsgruppen.

Klassifikationsgruppe	Unterteilung	Positiv für Phospho-Alpha-Synuclein
Gesamtes Patientenkollektiv		13/28 (46,4%)
Hoehn-und-Yahr-Stadium	I	5/12 (41,7%)
	II	8/16 (50%)
Verlaufsform	Akinetisch-rigider Typ	7/15 (46,7%)
	Tremordominanz-Typ	3/9 (33,3%)
	Äquivalenztyp	3/4 (75%)

Tabelle 11: Überblick über die Häufigkeit der Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

3.2.2 Truncated Alpha-Synuclein

3.2.2.1 Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Truncated-Alpha-Synuclein (Anti-Syn 105, Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA)

Bei 17 von 28 Patienten mit idiopathischem Parkinson-Syndrom (60,7%) konnten Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein gefunden werden. Betrachtet man nur die 12 Patienten in Stadium I nach Hoehn und Yahr, zeigten sich 5 von 12 (41,7%) positiv, wohingegen bei den Patienten in Stadium II 12 von 16 (75%) Ablagerungen aufwiesen. In keiner gesunden Kontrolle wurden Ablagerungen gefunden.

Die Abbildung 6 präsentiert die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (siehe linke Seite der Abbildung) und die Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (siehe rechte Seite der Abbildung). Abbildung 7 setzt die Phospho- und Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Projektion zueinander.

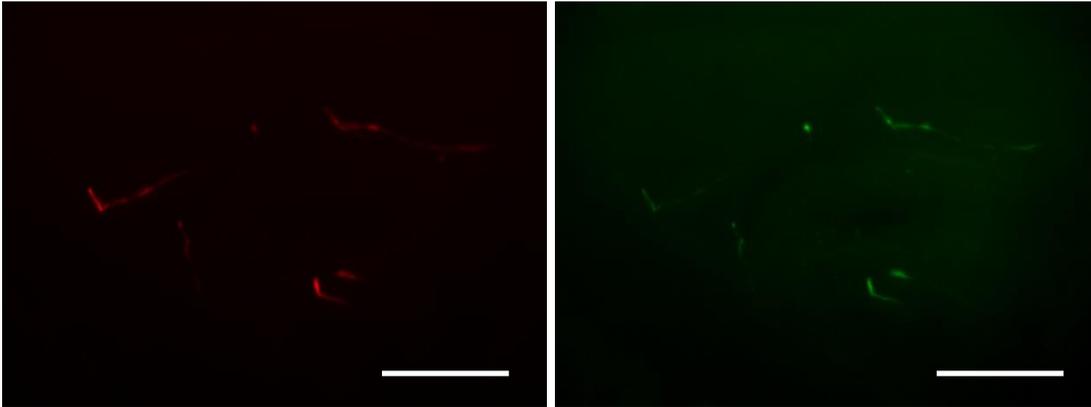


Abbildung 6: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-Truncated-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA); Die linke Seite zeigt Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (rot); Die rechte Seite zeigt Ablagerungen von Truncated-Alpha-Synuclein (grün); Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50µm

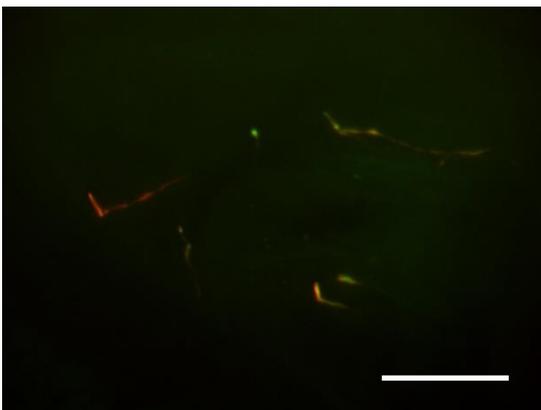


Abbildung 7: Bild einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-Truncated-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA); Die Abbildung zeigt die Ablagerungen in Projektion zueinander; Der weiße Balken entspricht einer Länge von 50µm

Die Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein zeigten sich ebenfalls in Nervenfasern um Blutgefäße, Schweißdrüsen, in Arrector-pili-Muskeln, in dermalen Nervenfaserbündeln und subepidermalen Plexus. Nur bei 1 von 17 (5,9%) für trunkiertes Alpha-Synuclein positiven Patienten konnten Ablagerungen in einem dermalen Nervenfaserbündel gefunden werden, bei lediglich 2 von 17 (11,8%) konnten Ablagerungen in subepidermalen Plexus beschrieben werden. Auch Ablagerungen in Arrector-pili-Muskeln zeigten sich nur bei 3 von 17 (17,6%) für trunkiertes Alpha-Synuclein positiven Patienten. Hingegen präsentierten sich

Ablagerungen in Schweißdrüsen in 5 von 17 Fällen (29,4%) und Ablagerungen in Gefäßen sogar bei 14 von 17 (82,4%) Patienten.

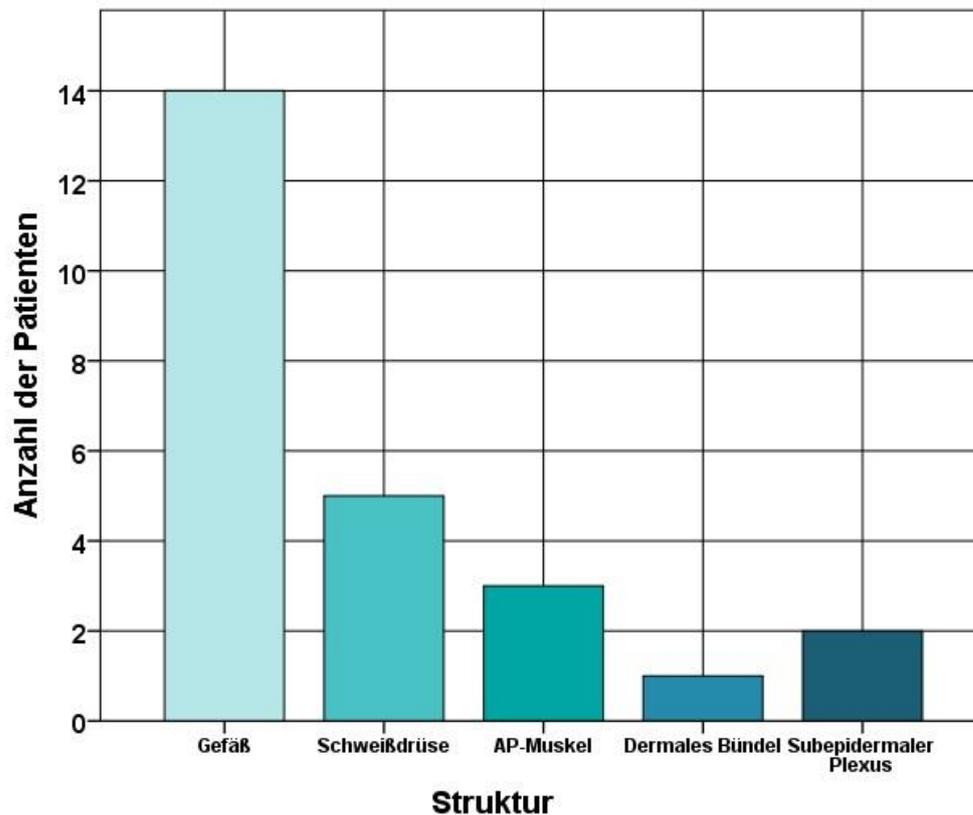


Diagramm 5: Anzahl der Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Hautstruktur

Von den insgesamt 17 Patienten, die für Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein als positiv gewertet wurden, wurden bei 8 (47,1%) Ablagerungen im Unterschenkel und bei 6 (35,3%) im Oberschenkel gefunden. Ablagerungen im Rücken und im Nacken konnten bei jeweils 4 (23,5%) Probanden nachgewiesen werden.

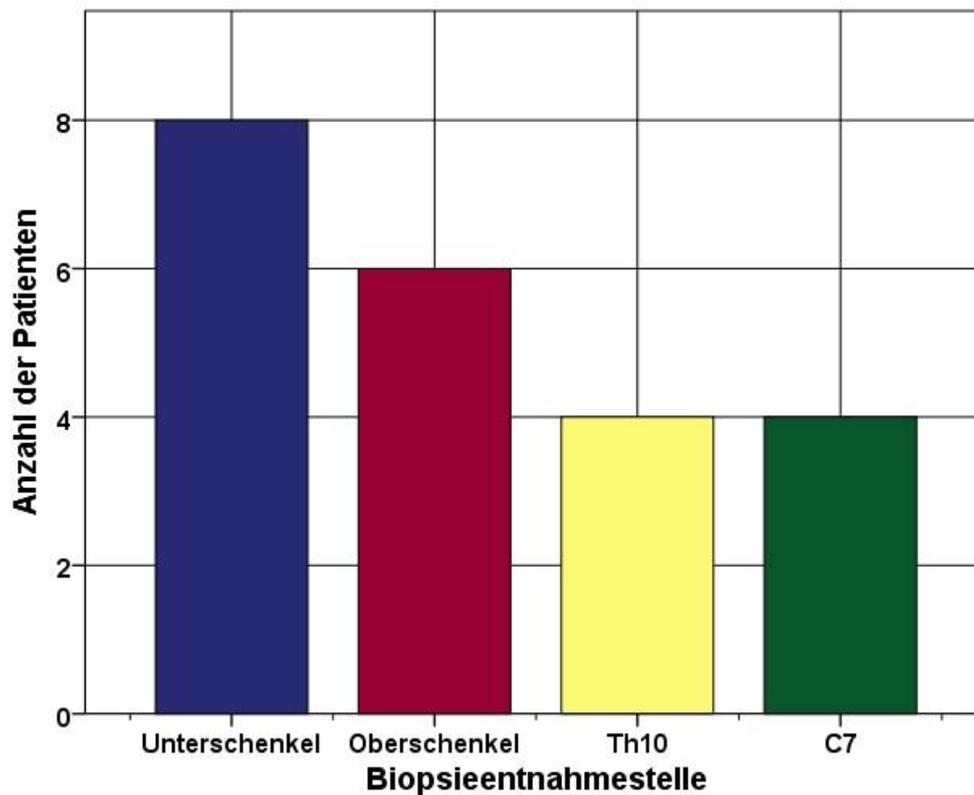


Diagramm 6: Anzahl der Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von der Biopsieentnahmestelle

In dieser Immunfluoreszenzdoppelfärbung gegen Truncated-Alpha-Synuclein und Phospho-Alpha-Synuclein konnten in 18 von 28 Patienten (64,3%) Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein nachgewiesen werden. Von diesen 18 Patienten, die für Phospho-Alpha-Synuclein als positiv gewertet wurden, zeigten 17 Patienten (94,4%) auch Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein. Alle Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen zeigten auch Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen.

Tabelle 12 gibt eine Zusammenfassung über die Häufigkeit der trunkierten Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit der verschiedenen Klassifikationsgruppen.

Klassifikationsgruppe	Unterteilung	Positiv für Truncated-Alpha-Synuclein
Gesamtes Patientenkollektiv		17/28 (60,7%)
Phospho-Alpha-Synuclein-positives Patientenkollektiv		17/18 (94,4%)
Phospho-Alpha-Synuclein-negatives Patientenkollektiv		0/10 (0%)
Hoehn-und-Yahr-Stadium	I	5/12 (41,7%)
	II	12/16 (75%)
Verlaufsform	Akinetisch-rigider Typ	7/15 (46,7%)
	Tremordominanz-Typ	7/9 (33,3%)
	Äquivalenztyp	4/4 (75%)

Tabelle 12: Überblick über die Häufigkeit der Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen

3.3 Bedeutung der Stufenschnitte

3.3.1 Phospho-Alpha-Synuclein

3.3.1.1 Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-PGP9.5

Die Aufarbeitung der Biopsien durch Stufenschnitte zeigte im Rahmen dieser Färbung eine Sensitivität von 78,6% (siehe 1.2.1.1).

Berücksichtigt man jeweils nur den ersten Schnitt auf dem Objektträger, präsentieren sich lediglich in 13 der 28 Patienten (46,43%) Ablagerungen von Phospho-Alpha-Synuclein. Betrachtet man jeweils den ersten und den zweiten Schnitt, finden sich hingegen schon Ablagerungen in 57,14% der Fälle (16 von

28). Bezieht man den ersten bis zum dritten Schnitt in die Wertung mit ein, erhöht sich dies auf 71,43% (20 von 28). Durch die zusätzliche Berücksichtigung des vierten Schnitts bleibt die Sensitivität zunächst unverändert, jedoch steigt sie sogar auf 78,57% (22 von 28), wenn man schließlich alle Schnitte eines Objektträgers betrachtet. Diagramm 7 verdeutlicht diesen Sachverhalt.

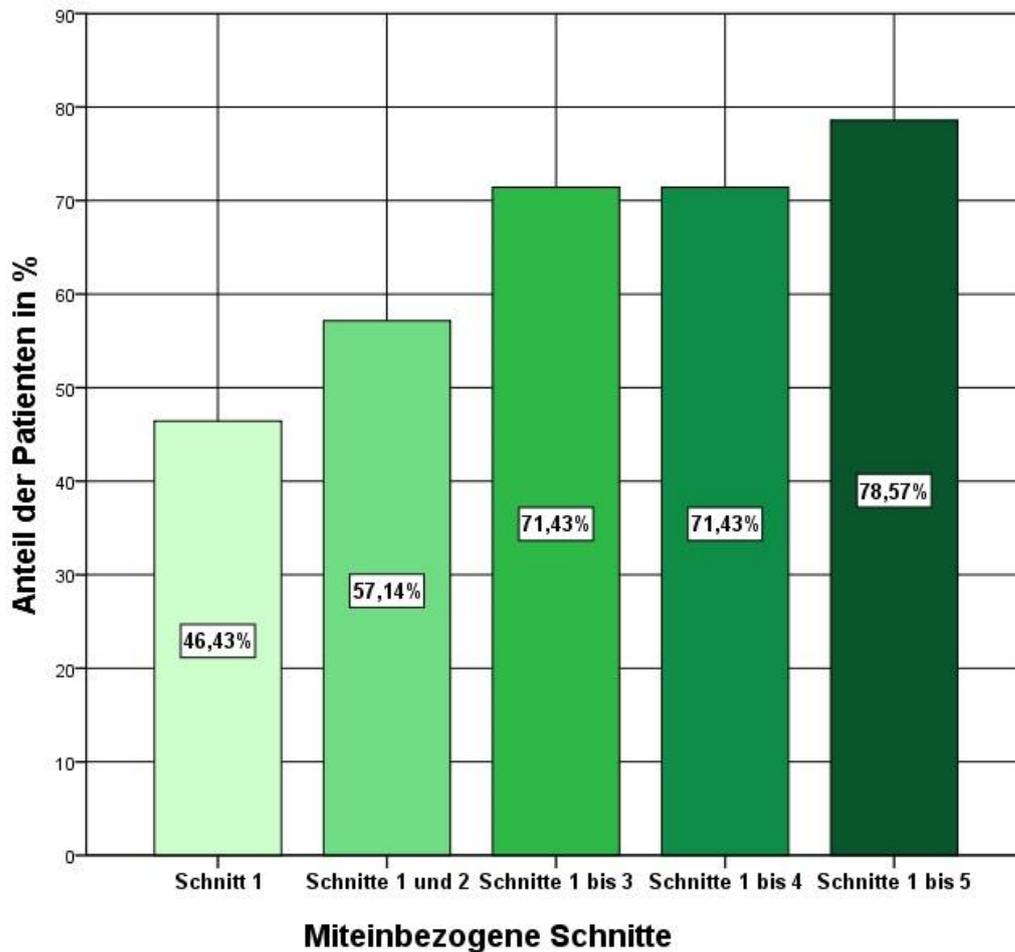


Diagramm 7: Anteil der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von den betrachteten Stufenschnitten

3.3.1.2 Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothema Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-PGP9.5

Auch bei dieser Färbung konnte anhand der Durchführung von Stufenschnitten eine Erhöhung der Sensitivität erzielt werden. Betrachtet man für jeden Patienten nur den ersten Schnitt auf dem Objektträger, so zeigen sich Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in nur 28,57% (8 von 28) der Parkinson-Patienten. Bei Berücksichtigung von Schnitt 1 und Schnitt 2 erhöht sich dies auf 42,86% (12 von 28). Unter Miteinbeziehung des dritten Schnitts lässt sich dies noch auf 46,43% (13/28) steigern. Bei dieser Färbung erhöht sich die Sensitivität jedoch nicht weiter, berücksichtigt man auch Schnitt 4 und Schnitt 5 jedes Objektträgers.

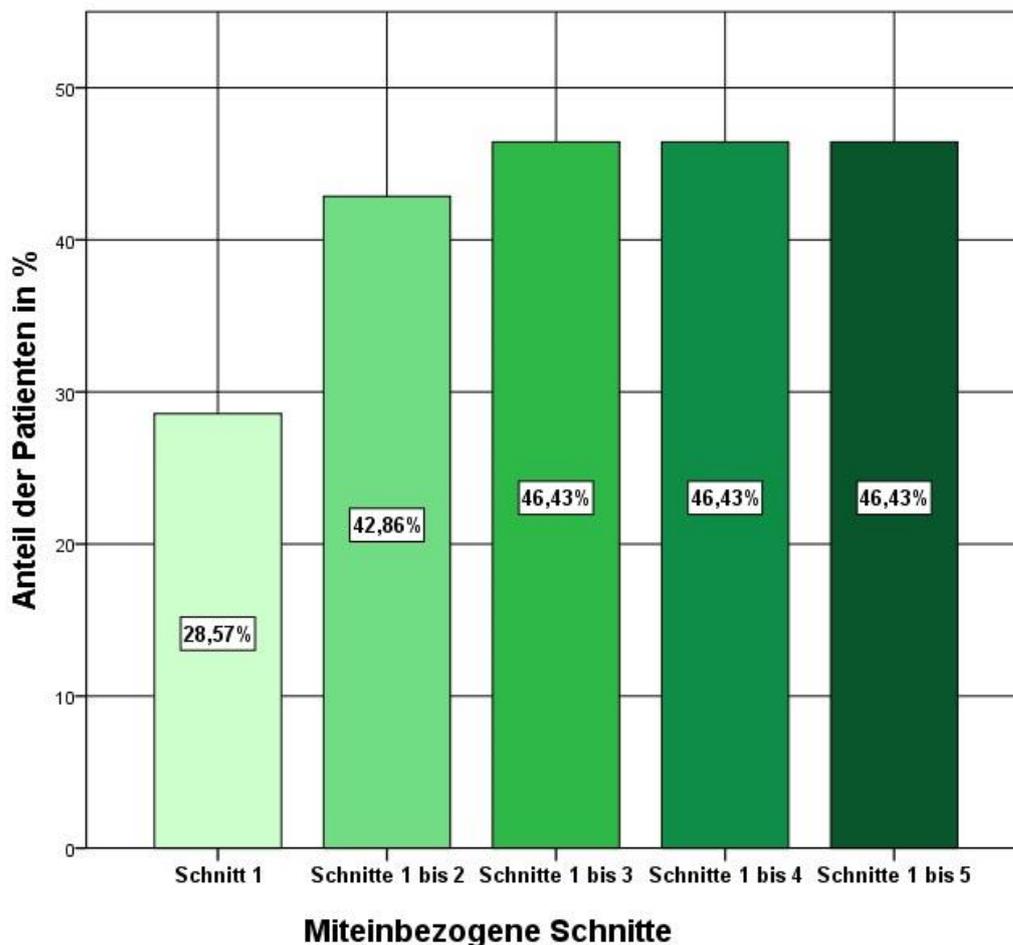


Diagramm 8: Anteil der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von den betrachteten Stufenschnitten

3.3.2 Truncated Alpha-Synuclein

Bei der Anfärbung von trunkiertem Alpha-Synuclein zeigte sich ebenfalls eine deutliche Erhöhung des Anteils positiver Probanden durch die Anwendung von Stufenschnitten.

Berücksichtigt man lediglich den ersten Schnitt jedes Objektträgers, so präsentieren sich in nur 21,43% der Fälle (6 von 28) Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein. Bezieht man zusätzlich den zweiten Schnitt mit ein, erhöht sich dies auf 35,71 % (10 von 28). Betrachtet man Schnitt 1 bis einschließlich Schnitt 3 finden sich Ablagerungen in 46,43% (13 von 28) der Fälle. Bezieht man darüber hinaus noch Schnitt 4 mit ein, zeigen sich 53,57% (15 von 28) positiv für Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein. Schließlich steigert sich dies auf 60,71% (17 von 28), wenn man alle 5 Schnitte eines Objektträgers betrachtet.

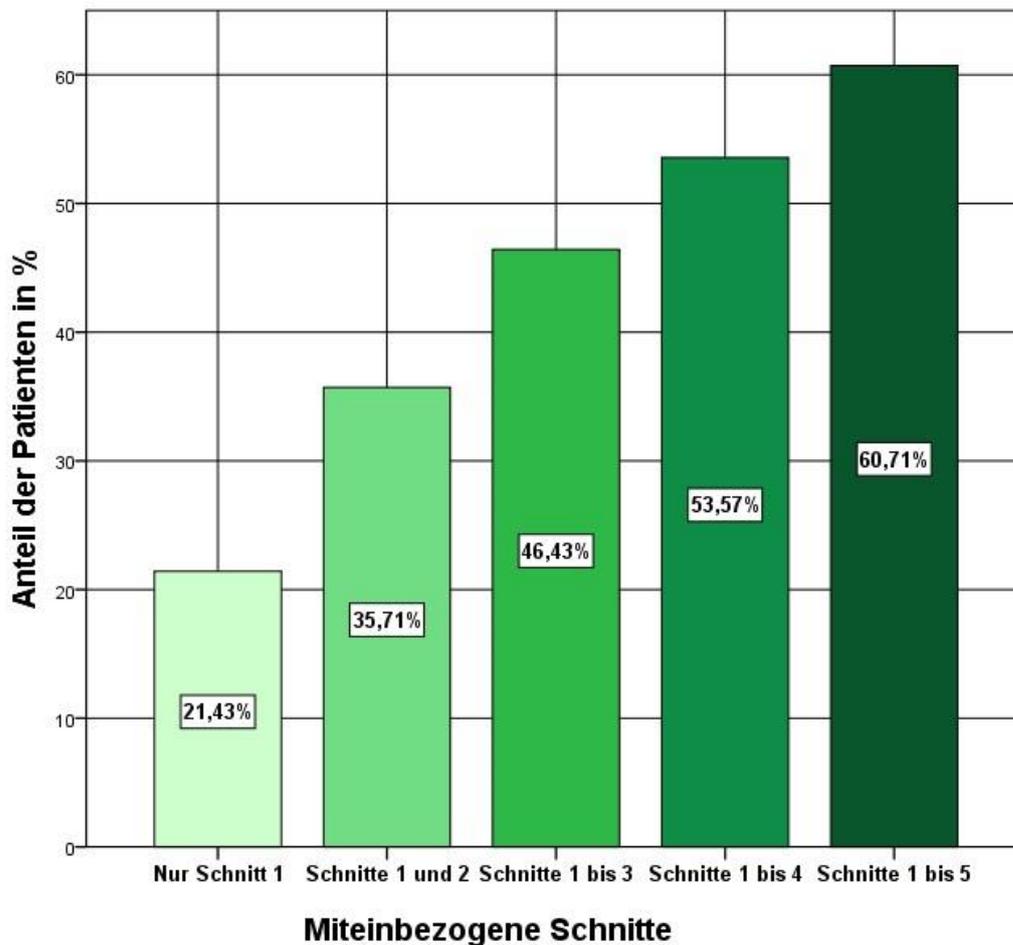


Diagramm 9: Anteil der Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Abhängigkeit von den betrachteten Stufenschnitten

3.4 Phospho-Alpha-Synuclein- und Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in Zusammenhang mit klinischen Merkmalen

3.4.1 Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium

Bei der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA) und Anti-PGP9.5 wurde mit dem exakten Test nach Fisher untersucht, ob sich ein Unterschied in der Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Syn-positiver Hautbiopsie zwischen dem Hoehn-und-Yahr-Stadium I und II zeigt. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Signifikanzwert $p=0,057$ und somit $>0,05$), jedoch zeigte sich ein Trend zu häufigerem Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein im Hoehn-

und-Yahr-Stadium II. Diagramm 10 zeigt die Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein Ablagerungen in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium.

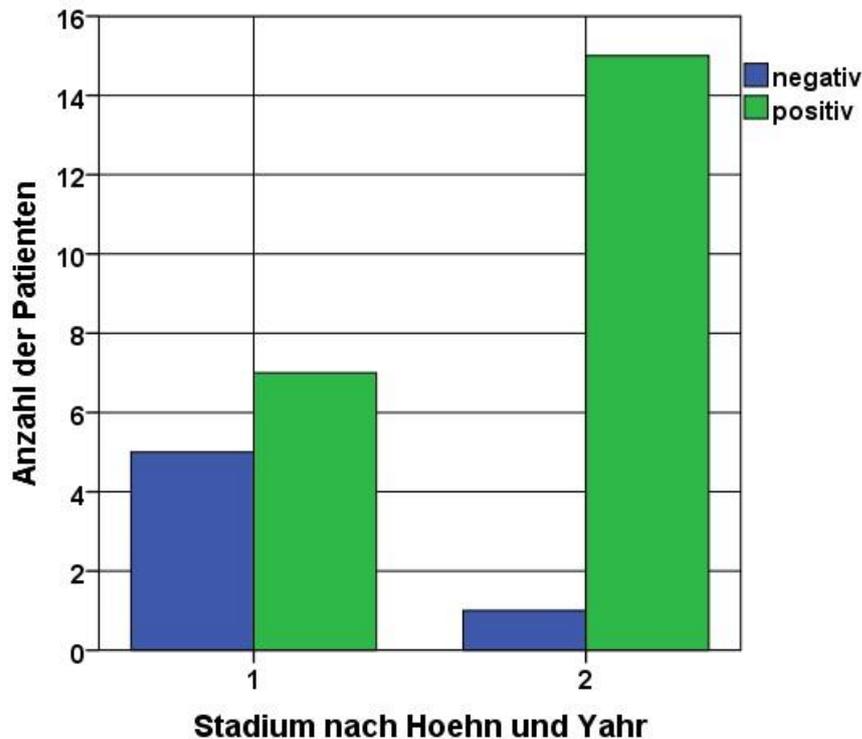


Diagramm 10: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (BioLegend®, San Diego, USA) in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium

Bei der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) und Anti-PGP9.5 wurde mit der Korrektur nach Yates (=Kontinuitätskorrektur) untersucht, ob sich ein Unterschied in der Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Syn-positiver Hautbiopsie zwischen dem Hoehn-und-Yahr-Stadium I und II zeigt. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Kontinuitätskorrektur(1)=0,003; Signifikanzwert $p=0,956$ und somit $>0,05$). Diagramm 11 zeigt die Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein Ablagerungen in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium.

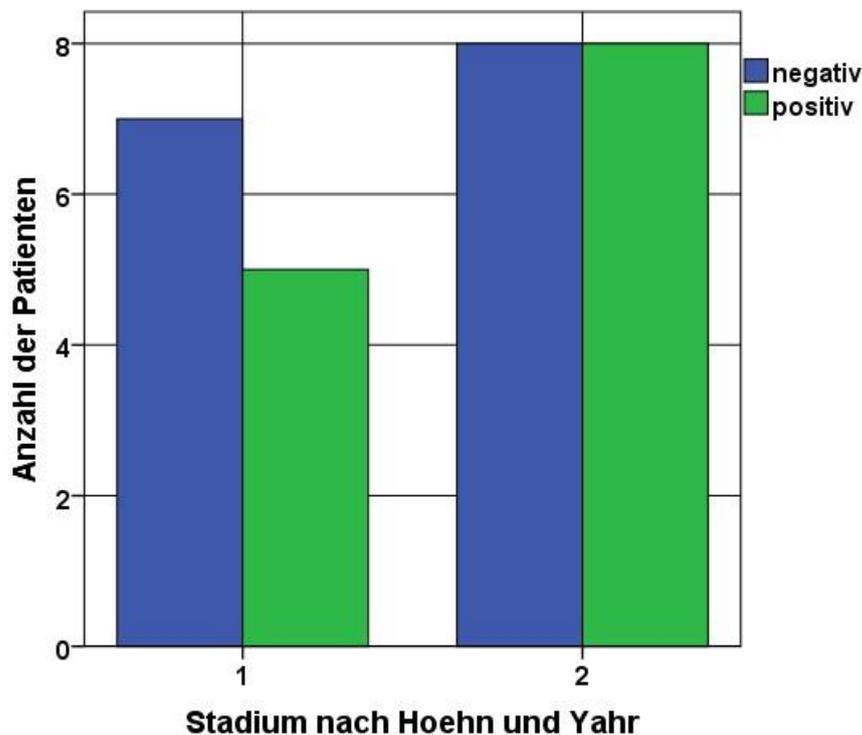


Diagramm 11: Anzahl der Patienten mit Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA) in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium

Mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher wurde untersucht, ob sich ein Unterschied in der Anzahl der Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein-positiver Hautbiopsie zwischen dem Hoehn-und-Yahr-Stadium I und II zeigt. Es konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Signifikanzwert $p=0,121$), jedoch zeigte sich ein Trend zu häufigerem Nachweis von Truncated-Alpha-Synuclein im Hoehn-und-Yahr-Stadium II. Diagramm 12 zeigt die Anzahl der Patienten mit Truncated-Alpha-Synuclein Ablagerungen in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium.

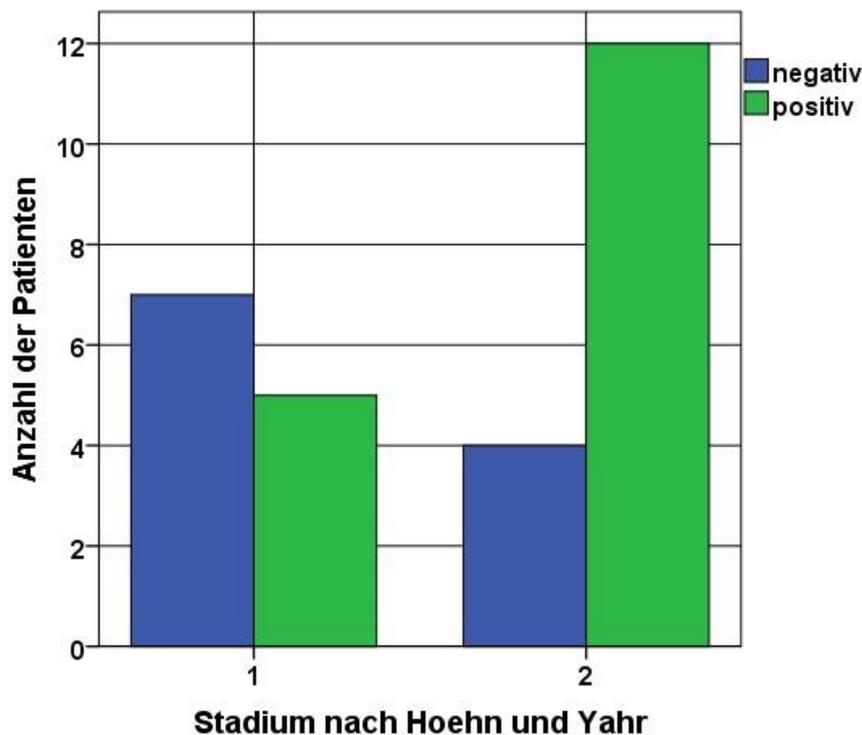


Diagramm 12: Anzahl der Patienten mit trunkierten Alpha-Synuclein Ablagerungen in Abhängigkeit vom Hoehn-und-Yahr-Stadium

3.4.2 Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer bei Biopsieentnahme

Mit Hilfe des Eta-Koeffizienten wurde überprüft, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen der Erkrankungsdauer bei Biopsieentnahme und der Anzahl der für Phospho-Alpha-Synuclein positiven Patienten besteht. Der Eta-Koeffizient lag hier für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) bei 0,583, was einen starken Zusammenhang anzeigt. Eine längere Krankheitsdauer war mit einer erhöhten Positivität für Phospho-Alpha-Synuclein assoziiert. Für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) lag der Eta-Koeffizient bei 0,638, was ebenfalls bedeutet, dass ein starker Zusammenhang besteht. Auch die Färbung mit dem Antikörper gegen Truncated-Alpha-Synuclein wurde hinsichtlich eines statistischen Zusammenhangs zwischen der Erkrankungsdauer und der Anzahl der für

trunkiertes Alpha-Synuclein positiven Patienten geprüft. Auch hier besteht ein starker Zusammenhang ($\eta=0,568$).

3.4.3 Abhängigkeit vom Alter der Patienten

Mit dem Eta-Koeffizienten wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und dem Auftreten von Phospho-Alpha-Synuclein- und Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen besteht. Bei der Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) erreichte Eta einen Wert von 0,826, bei der Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) einen Wert von 0,844. Dies zeigt für beide Färbungen einen starken Zusammenhang an. Auch zwischen dem Auftreten von Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen und dem Alter der Patienten bei Biopsieentnahme lag bei Untersuchung mit Hilfe des Eta-Koeffizienten ein starker Zusammenhang vor ($\eta=0,837$). Ältere Patienten wiesen häufiger Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen auf. Das Alter der Patienten war nicht mit der Erkrankungsdauer assoziiert.

3.4.4 Abhängigkeit von Teil I des MDS-UPDRS-Fragebogens

Mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher wurden die Immunfluoreszenzdoppelfärbungen hinsichtlich eines Zusammenhangs mit dem ersten Teil des MDS-UPDRS-Fragebogens untersucht. Für Ablagerungen von Phospho-Alpha-Synuclein konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden (Signifikanzwert $p=0,764$ für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) und Signifikanzwert $p=0,401$ für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA)). Auch für Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang in Abhängigkeit des UPDRS-Fragebogens festgestellt werden (Signifikanzwert $p=0,996$).

3.4.5 Abhängigkeit von der NMS-Skala

Auch die Abhängigkeit von der NMS-Skala wurde untersucht. Ein statistischer Zusammenhang zwischen dem erreichten Punktwert im NMS-Fragebogen und der Anzahl der für Phospho- und Truncated-Alpha-Synuclein positiven Patienten besteht nicht. Im exakten Test nach Fisher ergaben sich für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) ein Signifikanzwert $p=0,413$, für die Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) ein Signifikanzwert $p=0,468$ und für den Antikörper gegen Truncated-Alpha-Synuclein ein Signifikanzwert $p=0,922$.

3.5 Zeitlicher Abstand zwischen dem Schneiden der Gewebeproben und der Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen

Interessanterweise führten die Färbungen im zeitlichen Verlauf zu immer niedrigeren Detektionsraten. Die Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) wurde im direkten Anschluss an das Schneiden der Gewebeproben durchgeführt.

Bei der Suche nach trunkiertem Alpha-Synuclein wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit einem Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörper und einem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper durchgeführt. Dies diente zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den beiden pathologischen posttranslationalen Modifikationen Phosphorylierung und Trunkierung. Zur Anfärbung des phosphorylierten Alpha-Synucleins wurde erneut der Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) eingesetzt, zur Anfärbung des trunkierten Alpha-Synucleins wurde der Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörper (Anti-Syn 105) von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) verwendet. Diese Immunfluoreszenzdoppelfärbung wurde mit einem zeitlichen Abstand von einem bis 4 Monaten, im Vergleich zur ersten Immunfluoreszenzdoppelfärbung, durchgeführt. Aufgrund der Tatsache, dass der gleiche Antikörper zur Anfärbung des Phospho-Alpha-Synucleins wie in der ersten Immunfluoreszenzdoppelfärbung verwendet wurde, kann hier ein

direkter Vergleich von zwei Färbungen mit dem identischen Antikörper angestellt werden.

Eine weitere Immunfluoreszenzdoppelfärbung diente dem Nachweis von Phospho-Alpha-Synuclein, sie erfolgte mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA). Im Vergleich zur ersten Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) wurde sie mit einem zeitlichen Abstand von 4 bis 7 Monaten durchgeführt. Ein Vergleich mit der ersten Immunfluoreszenzdoppelfärbung ist in diesem Fall jedoch nur eingeschränkt möglich, da diese Färbung mit einem anderen Antikörper durchgeführt wurde.

Tabelle 13 gibt einen Überblick über die Verzögerung der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen nach dem Schneiden der Gewebeproben und die jeweiligen Detektionsraten.

Antikörper	Verzögerung	Detektionsrate
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA)	keine	78,6%
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (BioLegend®, San Diego, USA)	1-4 Monate	64,3%
Anti-Truncated-Alpha-Synuclein (Anti-Syn 105, Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA)	1-4 Monate	60,7%
Anti-Phospho-Alpha-Synuclein (Prothena Biosciences Inc, San Francisco, USA)	4-7 Monate	46,4%

Tabelle 13: Verzögerung zwischen dem Schneiden der Gewebeproben und der Durchführung der Immunfluoreszenzdoppelfärbungen; Bei den grün markierten Feldern wurde ein identischer Antikörper verwendet

Auffällig ist, dass beim Vergleich von zwei Färbungen mit dem identischen Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA), die in einem zeitlichen Abstand von einem bis 4 Monaten durchgeführt wurden, die Detektionsrate deutlich voneinander abweicht.

Die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) wurde zu einem noch späteren Zeitpunkt durchgeführt. Die Detektionsrate ist hier niedriger als in den anderen Färbungen, die mit einer geringeren Verzögerung durchgeführt wurden. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Färbung mit einem Antikörper

einer anderen Firma durchgeführt wurde und somit ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der hier vorliegenden Forschungsarbeit wurde die Haut von an idiopathischem M. Parkinson erkrankten Patienten hinsichtlich pathologischer Alpha-Synuclein-Ablagerungen untersucht. Eine mögliche Einsetzbarkeit der Hautbiopsien als frühdiagnostischer Marker wurde überprüft.

Für die Studie wurden zwischen November 2014 und Juni 2016 28 Patienten mit idiopathischem M. Parkinson, 12 in Hoehn-und-Yahr-Stadium I und 16 in Hoehn-und-Yahr-Stadium II, und 5 gesunde Kontrollen an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg rekrutiert.

Die Entnahme der Biopsien erfolgte am Unterschenkel, am Oberschenkel, am Rücken und im Nacken. Anschließend wurden die Hautproben mittels Stufenschnitten der Dicke 20µm aufgearbeitet, drei immunhistochemische Färbungen durchgeführt und je Hautprobe 5 Stufenschnitte untersucht.

Bei der Suche nach phosphoryliertem Alpha-Synuclein konnte in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) bei beinahe 80% der Patienten das gesuchte Protein gefunden werden, in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) lediglich in etwas mehr als 46% der Fälle. Die Suche nach trunkiertem Alpha-Synuclein mit Hilfe des Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörpers von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) gestaltete sich bei fast 61% der Patienten als erfolgreich.

Der am häufigsten positive Biopsieort war in allen drei Immunfluoreszenzdoppelfärbungen der Unterschenkel. Darüber hinaus war die am häufigsten positive Hautstruktur in allen drei Immunfluoreszenzdoppelfärbungen das autonom innervierte Blutgefäß. Weiterhin zeigte sich eine Assoziation zur Erkrankungsdauer. Des Weiteren konnte durch die Anfertigung von Stufenschnitten die Nachweisrate der pathologischen Alpha-Synuclein-Ablagerungen deutlich gesteigert werden.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung

4.2.1 Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut

In der vorliegenden Studie konnten mit Hilfe von zwei verschiedenen Antikörpern Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in der Haut nachgewiesen werden. Mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) zeigten sich bei fast 80% der Patienten Ablagerungen. In Stadium I nach Hoehn und Yahr präsentierten sich 7 von 12 (58,3%) Patienten positiv, wohingegen bei den Patienten in Stadium II sogar bei 15 von 16 (93,8%) Ablagerungen nachgewiesen wurden. In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) zeigten sich nur in etwas mehr als 46% der Patienten Ablagerungen. Von den 12 Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium I präsentierten sich 5 (41,7%) positiv und von den 16 Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium II konnten bei 8 (50%) Ablagerungen gefunden werden.

Nachdem Michell et al. 2005 erstmals Forschungsergebnisse zu Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut von Parkinson-Patienten veröffentlichten, gab es im Vorfeld dieser Forschungsarbeit bereits eine Vielzahl weiterer Studien, die Ablagerungen von Phospho-Alpha-Synuclein in Hautbiopsien untersuchten und als möglichen Biomarker zur Diagnostik des M. Parkinson überprüften (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015; Ikemura et al., 2008; Miki et al., 2010).

Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in der Haut waren bisher immer spezifisch für das Vorliegen einer Synucleinopathie (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a; Donadio, 2018b; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015; Ikemura et al., 2008; Miki et al., 2010; Zange et al., 2015).

Hinsichtlich der Detektionsrate unterschieden sich die Forschungsergebnisse der einzelnen Studien jedoch deutlich. Dies könnte sich unter anderem durch die Auswahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten, die gewählten Biopsieentnahmestellen, die Anzahl der entnommenen Hautbiopsien, eine

unterschiedliche Anzahl an untersuchten Schnitten und eine unterschiedliche Methodik in der Aufbereitung der Hautbiopsien begründen.

Ikemura et al. konnten 2008 bereits eine Sensitivität von 70% nachweisen. Miki et al. erreichten 2010 hingegen nur eine Nachweisrate von 10%. Donadio et al. beschrieben sogar Nachweisraten von bis zu 100% in zervikalen Biopsien (Donadio et al., 2014, Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a; Donadio et al., 2018b). Die hohen Nachweisraten von Donadio et al. mit bis zu 100% in der zervikalen Hautbiopsie lassen sich dadurch begründen, dass für jede entnommene Biopsie zusätzlich noch eine zweite Biopsie im Abstand von 3-4 cm entnommen wurde. Die Nachweisraten waren bei Betrachtung von lediglich einer Biopsie pro Körperstelle deutlich niedriger (Donadio et al., 2014, Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a; Donadio et al., 2018b). Donadio et al. stellten die Hypothese auf, dass dieses Resultat eine ungleichmäßige räumliche Verteilung des Phospho-Alpha-Synucleins bei Patienten mit M. Parkinson wahrscheinlich macht (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a; Donadio et al., 2018b). Dies wäre eine mögliche Begründung, warum nicht in Hautbiopsien aller an der vorliegenden Studie teilgenommenen Patienten Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein gefunden werden konnten, denn an jeder Körperstelle wurde lediglich eine Biopsie entnommen. Die Hypothese der ungleichmäßigen räumlichen Verteilung des Phospho-Alpha-Synucleins wird des Weiteren durch die Tatsache, dass es zwischen den einzelnen untersuchten Stufen der vorliegenden Studie deutliche Unterschiede in der Positivität gab, gestützt.

Ein weiterer Aspekt, der die im Vergleich zu den Forschungsarbeiten von Donadio et al. in der vorliegenden Studie niedrigeren Nachweisraten von nur bis zu 78,6% erklären könnte, wäre die Auswahl der Patienten. In die vorliegende Studie wurden nur Patienten in den Hoehn-und-Yahr-Stadien I und II (I: n=12; II: n=16) eingeschlossen. Hierbei konnten im Hoehn-und-Yahr-Stadium I Nachweisraten von bis zu 58,3% erreicht werden, wohingegen im Hoehn-und-Yahr-Stadium II sogar Nachweisraten von bis zu 93,8% erreicht wurden. Im Vergleich hierzu schloss die Forschungsgruppe um Donadio in ihre Studien Patienten in den Hoehn-und-Yahr-Stadien I bis IV ein (Donadio et al., 2014;

Donadio et al., 2016). In beiden Studien befanden sich lediglich 2 Patienten in Hoehn-und-Yahr-Stadium I (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016).

Darüber hinaus könnte die Verwendung unterschiedlicher Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper und die Anfertigung unterschiedlich dicker Hautschnitte eine Rolle spielen. Die Forschungsgruppe um Donadio et al. verwendete in ihren Forschungsarbeiten 10µm dicke Hautschnitte, unsere Forschungsgruppe 20µm dicke, in einem Vorläuferprojekt dieser Arbeit sogar 50µm dicke, Hautschnitte (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015).

4.2.2 Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen in der Haut

Im Rahmen dieser Studie konnten in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) und dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) erstmals Ablagerungen von Truncated-Alpha-Synuclein in Hautbiopsien bei Patienten mit idiopathischem M. Parkinson nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten alle Hautbiopsien, in denen Truncated-Alpha-Synuclein Ablagerungen gefunden wurden, auch Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Lewy-Körperchen im Gehirn von Patienten mit idiopathischem M. Parkinson oder Lewy-Körperchen-Demenz, so ist das darin enthaltene Alpha-Synuclein zu 15% Truncated-Alpha-Synuclein (Baba et al., 1998; Campbell et al., 2001; Liu et al., 2005). Truncated-Alpha-Synuclein in löslicher Form im Gehirn ist nicht spezifisch für den idiopathischen M. Parkinson oder die anderen Synucleinopathien, es wurde auch im Gehirn von Patienten mit M. Alzheimer und gesunden Kontrollen beschrieben (Liu et al., 2005). Aggregierte Ablagerungen von trunkiertem Alpha-Synuclein sind jedoch spezifisch für den idiopathischen M. Parkinson oder die Lewy-Body-Demenz (Liu et al., 2005). Posttranslational trunkiertes Alpha-Synuclein neigt, im Vergleich zu Alpha-Synuclein normaler Länge, stärker zur Aggregation und induziert darüber hinaus die Aggregation des Alpha-Synucleins normaler Länge (Crowther et al.,

1998; Lewis et al., 2010; Li et al., 2005; Liu et al., 2005; Murray et al., 2003; Prasad et al., 2012). Prasad et al. beschrieben Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen im Gehirn von Patienten mit idiopathischem M. Parkinson nur bei Fällen, in denen auch Phospho-Alpha-Synuclein nachgewiesen werden konnte (Prasad et al., 2012). Dies ist konsistent zu den Ergebnissen der vorliegenden Forschungsarbeit, in der in der Haut von Patienten mit idiopathischem M. Parkinson in Abwesenheit von Phospho-Alpha-Synuclein auch kein Truncated-Alpha-Synuclein nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der Tatsache, dass trunkiertes Alpha-Synuclein möglicherweise eine kritische, wenn nicht sogar essentielle, Rolle in der pathologischen Aggregation des Proteins einnimmt, könnte also auch Truncated-Alpha-Synuclein eines Tages einen sinnvollen peripheren Biomarker darstellen (Prasad et al., 2012; siehe 1.6).

4.3 Bewertung der Biopsieentnahmestelle

In anderen Studien wurde ein Gradient der Nachweisrate von Phospho-Alpha-Synuclein mit einer Abnahme von proximal nach distal beschrieben (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017b; Doppler et al., 2014). Dies deutete auf eine mögliche Ausbreitung des Phospho-Alpha-Synucleins von proximal nach distal, vom Spinalganglion bzw. den autonomen Ganglien ausgehend entlang des peripheren Nervensystems, hin (Donadio et al., 2014). In anderen Forschungsergebnissen unserer Arbeitsgruppe (Schneider, 2018) und in der vorliegenden Studie konnte dieser Gradient der Nachweisrate von proximal nach distal nicht bestätigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der vorliegenden Studie sogar in allen Färbungen die höchste Nachweisrate im Unterschenkel. Die Hypothese der Ausbreitung von proximal nach distal von Donadio et al. kann also durch diese Studie nicht weiter gestützt werden. Schneider diskutierte, dass phosphoryliertes Alpha-Synuclein möglicherweise direkt in der Peripherie entsteht (Schneider, 2018). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind mit dieser Hypothese gut vereinbar und sprechen gegen eine Ausbreitung von proximal nach distal.

4.4 Bewertung der betroffenen Hautstruktur

In der vorliegenden Studie zeigten sich die Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein in autonomen Nervenfasern (vasomotorische, sudomotorische und pilomotorische Fasern), somatosensiblen Fasern (subepidermaler Nervenplexus) und nicht näher spezifizierbaren Fasern (dermale Nervenfaserbündel).

Vergleicht man die bisherigen Ergebnisse aus Vorläuferprojekten unserer Arbeitsgruppe und der Forschungsgruppe um Donadio mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, so stimmen die Ergebnisse weitgehend überein (Donadio et al., 2014; Doppler et al., 2014; Schneider, 2018). Analog zu den vorherigen Ergebnissen war in dieser Studie die am häufigsten als positiv gewertete Hautstruktur in allen Färbungen das durch autonome Fasern innervierte Blutgefäß. Interessant war, dass in der Färbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) auch in dermalen Nervenbündeln die Detektionsrate sehr hoch war. In Übereinstimmung mit vorherigen Forschungsergebnissen traten bei den Parkinson-Patienten dieser Studie Ablagerungen in somatosensiblen Nervenfasern selten auf (Donadio et al., 2014; Doppler et al., 2014; Schneider, 2018).

Auch im Hinblick auf die anderen Synucleinopathien, die Lewy-Body-Demenz, die Multisystematrophie und die idiopathische orthostatische Hypotonie, gibt es hierzu interessante Erkenntnisse (Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a; Doppler et al., 2015; Schneider, 2018). Bei der idiopathischen orthostatischen Hypotonie und bei der Lewy-Körperchen-Demenz lagern sich die phosphorylierten Alpha-Synuclein-Ablagerungen ebenfalls überwiegend in autonomen Nervenfasern ab (Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a). Dies ist konsistent mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie bei Patienten mit idiopathischem M. Parkinson. Im Gegensatz dazu sind die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen bei der Multisystematrophie fast ausschließlich in somatosensiblen Nerven zu finden, wodurch dies zur Abgrenzung gegen die weiteren Synucleinopathien hilfreich sein könnte (Doppler et al., 2015; Donadio et al., 2018a). Ablagerungen in

somatosensiblen Nervenfasern bei Patienten mit idiopathischem M. Parkinson wurden in dieser Studie und in weiteren Forschungsprojekten unserer Arbeitsgruppe und der Forschungsgruppe um Donadio nämlich lediglich sehr selten in somatosensiblen Fasern beschrieben (Donadio et al., 2014; Doppler et al., 2014; Schneider, 2018). Patienten mit Multisystematrophie oder sonstigen Synucleinopathien waren in der vorliegenden Studie nicht eingeschlossen.

4.5 Bewertung der Stufenschnitte

In einem Vorläuferprojekt unserer Arbeitsgruppe konnte bereits 2015 erstmals beschrieben werden, dass durch die Anwendung von Stufenschnitten die Detektionsrate von phosphoryliertem Alpha-Synuclein erhöht werden konnte (Doppler et al., 2015). Die Detektionsrate wurde hierdurch von 67% auf 73% gesteigert (Doppler et al., 2015). In der vorliegenden Studie zeigte sich dieser Unterschied sogar noch deutlich höher, in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) konnte die Detektionsrate von 46,4% auf 78,6% und in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) von 28,6% auf 46,4% erhöht werden.

Auch bei der Suche nach trunkierten Alpha-Synuclein-Ablagerungen zeigte sich eine deutliche Steigerung. Der Anteil der für Truncated-Alpha-Synuclein positiven Patienten konnte durch die Anwendung von Stufenschnitten von 21,4% auf 60,7% gesteigert werden.

Folglich stellt die Durchführung von Stufenschnitten ein hervorragendes Mittel zur Steigerung der Nachweisraten der pathologischen Alpha-Synuclein-Ablagerungen dar. Zu bedenken ist jedoch, dass die Anfertigung von Stufenschnitten für die klinische Routine einen sehr großen Aufwand bedeuten würde.

4.6 Klinische Bedeutung

Die Entnahme von Hautbiopsien zur frühen Diagnosestellung des M. Parkinson ist aktuell noch kein in der Klinik etabliertes Verfahren.

Da nach aktuellem Forschungsstand bisher bei keiner gesunden Kontrollperson und bei keinem Patienten mit Tauopathie oder vaskulärem sekundärem Parkinson-Syndrom Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen gefunden wurden, stellt die Suche nach phosphoryliertem Alpha-Synuclein in proximalen Nervenfasern einen hochspezifischen potenziellen Biomarker für den idiopathischen M. Parkinson und die anderen Synucleinopathien dar, der darüber hinaus zur Abgrenzung von Tauopathien hilfreich sein könnte (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a; Donadio, 2018b; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015; Ikemura et al., 2008; Miki et al., 2010; Zange et al., 2015). Auch zur Abgrenzung der Multisystematrophie von den anderen Synucleinopathien könnte phosphoryliertes Alpha-Synuclein in der Haut möglicherweise ein unterstützender Faktor zur Differenzierung sein, da bei der Multisystematrophie die Ablagerungen, im Gegensatz zu den anderen Synucleinopathien, fast ausschließlich in somatosensiblen Fasern zu finden sind (Donadio et al., 2018a; Doppler et al., 2015; siehe 1.4).

Auch die Detektionsrate ist inzwischen ab dem Hoehn-und-Yahr-Stadium II sehr hoch (siehe 1.2.1). Bevor die Suche nach phosphoryliertem Alpha-Synuclein jedoch als Biomarker zur Diagnostik des idiopathischen M. Parkinson eingesetzt werden kann, müssen noch weitere Studien durchgeführt werden, um auch die Detektionsrate in Hoehn-und-Yahr-Stadium I noch weiter zu erhöhen. Auch eine Diagnosestellung vor dem Auftreten von motorischen Symptomen ist von großem Interesse. Von unserer Arbeitsgruppe gibt es bereits eine Studie, die Phospho-Alpha-Synuclein-Ablagerungen bei Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörungen in Hautnerven nachweisen konnte (Doppler et al., 2017). Die REM-Schlaf-Verhaltensstörung ist oft ein Prodromalstadium anderer Synucleinopathien, insbesondere des idiopathischen M. Parkinson oder der Lewy-Körperchen-Demenz (Doppler et al., 2017; Iranzo et al., 2013; Iranzo et al.,

2014). In dem Projekt unserer Arbeitsgruppe konnten in bereits 55,6% der Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörung Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein nachgewiesen werden (Doppler et al., 2017).

Um Phospho-Alpha-Synuclein in Hautnerven als Biomarker verwenden zu können, müssen darüber hinaus Untersuchungsmethoden und -techniken zwischen einzelnen Forschungsgruppen vereinheitlicht werden, um konsistente Ergebnisse zu erhalten und somit eine valide Aussage über die Sensitivität treffen zu können.

Hinsichtlich der Ablagerungen von Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen ist man aktuell noch weit entfernt, dies ebenfalls als Biomarker nutzen zu können. Interessanterweise konnten in der vorliegenden Studie erstmals in menschlichen Hautnerven Ablagerungen gefunden werden. Nun müssen weitere Studien durchgeführt werden, um zu evaluieren, ob auch in anderen Synucleinopathien Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen auftreten. Die Ergebnisse des Mausmodells von Hall et al. (2015; siehe 1.2.6) deuten darauf hin, dass Truncated-Alpha-Synuclein möglicherweise auch bei der Lewy-Körperchen-Demenz eine Rolle spielt und Ablagerungen von Truncated-Alpha-Synuclein in der Haut auftreten könnten. Des Weiteren müssten auch Kontrollpersonen in einer großen Anzahl auf Truncated-Alpha-Synuclein-Ablagerungen untersucht werden, um die Spezifität zu prüfen.

4.7 Kritikpunkte der vorliegenden Studie und Ausblick

Der wohl wichtigste Kritikpunkt der vorliegenden Studie ist die begrenzte Fallzahl an Patienten (n=28). Auch andere Studien zu dieser Thematik wurden lediglich mit einer vergleichbaren oder sogar geringeren Fallzahl durchgeführt (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2017a; Donadio et al., 2017b; Donadio et al., 2018a; Doppler et al., 2014; Doppler et al., 2015; Miki et al., 2010; Zange et al., 2015). Um für den klinischen Alltag aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, müssten weitere Studien mit einer weitaus größeren Fallzahl und standardisierten Bedingungen durchgeführt werden.

Ein weiterer bedeutender Kritikpunkt ist die Tatsache, dass die Diagnose der in die Studie eingeschlossenen Patienten klinisch gestellt wurde. Die Genauigkeit einer klinischen Diagnostik ist gering, in verschiedenen Studien liegt sie im Vergleich zu einer postmortalen neuropathologischen Diagnosestellung zwischen 70 und 90% (Adler et al., 2014; Hughes et al., 1992; Hughes et al., 2002; Litvan et al., 1998; Schrag et al., 2002). Insbesondere in einem frühen Stadium der Erkrankung ist die Genauigkeit sogar noch deutlich niedriger (Adler et al., 2014). Dieser Aspekt wäre eine mögliche Begründung, weshalb in der vorliegenden Studie nicht in Hautbiopsien aller Patienten in den Hoehn-und-Yahr-Stadien I und II Ablagerungen von phosphoryliertem Alpha-Synuclein gefunden werden konnten.

Ein weiterer limitierender Faktor der vorliegenden Studie ist das begrenzte Untersuchungsareal. Lediglich an vier Körperstellen wurde eine Biopsie von nur 5mm Durchmesser entnommen. Aufgrund der Annahme, dass Alpha-Synuclein beim M. Parkinson in der Haut ungleichmäßig verteilt ist (Donadio et al., 2014; Donadio et al., 2016; Donadio et al., 2018a; Donadio et al., 2018b), wäre in weiteren Studien die Entnahme von mindestens zwei Hautbiopsien pro Körperstelle sinnvoll, um die Detektionsrate weiter steigern zu können. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass eine derart hohe Anzahl an Biopsien eine sehr starke Belastung für den Patienten darstellen würde. Aus ethischen Gründen bleibt das Untersuchungsareal zwangsläufig begrenzt.

Darüber hinaus stellt sich die Lagerung der bereits geschnittenen und auf Objektträger aufgebrauchten Hautproben möglicherweise als problematisch dar. Auffällig ist, dass die Färbungen im zeitlichen Verlauf zu immer niedrigeren Nachweisraten führten. Insbesondere bei dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA), der in zwei Färbungen verwendet wurde, kann ein direkter Vergleich angestellt werden. Der Antikörper wurde sowohl in einer Immunfluoreszenzdoppelfärbung, zusammen mit einem axonalen Marker (Anti-PGP9.5), als auch in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA), zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den verschiedenen pathologischen Proteinen, zusätzlich verwendet. Zwischen der Durchführung der

einzelnen Färbungen lag ein Zeitabschnitt von einem bis 4 Monaten. Interessanterweise ist die Nachweisrate für Phospho-Alpha-Synuclein in zwei Färbungen mit dem identischen Antikörper unterschiedlich. Konnten bei den frisch geschnittenen Hautproben Nachweisraten von 78,6% erzielt werden, so fällt diese Nachweisrate nach einem bis 4 Monaten Lagerungszeit mit 64,3% erheblich niedriger aus. Weiterhin könnte vielleicht sogar schon die Lagerung des Biopsiematerials vor dem Schneiden ein Problem darstellen. In zukünftigen Studien sollte drauf geachtet werden, die Durchführung so zu planen, dass alle Arbeitsschritte ohne lange Lagerungszeiten des Biopsiematerials und der vorbereiteten Objektträger durchgeführt werden.

Zusammengefasst müsste in zukünftigen Studien eine größere Fallzahl untersucht werden, die Methodik, die Technik und die Auswertung müssten standardisiert und vereinheitlicht werden. Ebenfalls wäre auf eine zeitlich sehr rasche Durchführung aller Arbeitsschritte zu achten. Darüber hinaus wäre es in künftigen Studien weiterhin interessant, im zeitlichen Verlauf bei den gleichen Probanden weitere Biopsien zu entnehmen und die zeitliche Entwicklung zu beurteilen. Ausblickend wäre es zudem wünschenswert multizentrische Studien durchzuführen.

5 Zusammenfassung

Ziel der Studie war, phosphoryliertes und trunkiertes Alpha-Synuclein in Nervenfasern der Haut zu untersuchen und herauszufinden, ob die posttranslationalen Modifikationen Phosphorylierung und Trunkierung des Alpha-Synucleins als potenzielle Biomarker für eine Diagnosestellung des M. Parkinson geeignet sind. Die Besonderheit der vorliegenden Studie war zum einen, dass ausschließlich Patienten in frühen Erkrankungsstadien (Hoehn-und-Yahr-Stadien I und II) des idiopathischen M. Parkinson untersucht wurden und zum anderen der Versuch, die Detektionsrate anhand von Stufenschnitten zu erhöhen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass phosphoryliertes Alpha-Synuclein ein hohes Potenzial als Biomarker für die Diagnosestellung und zur Differenzialdiagnostik eines M. Parkinson hat und Stufenschnitte die Nachweisrate deutlich erhöhen können.

In der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von BioLegend® (San Diego, USA) konnte bei beinahe 80% der Patienten das gesuchte Protein gefunden werden (Nachweisrate Hoehn-und-Yahr-Stadium I: 58,3%; Hoehn-und-Yahr-Stadium II: 93,8%), in der Immunfluoreszenzdoppelfärbung mit dem Anti-Phospho-Alpha-Synuclein-Antikörper von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) nur in etwas mehr als 46% der Patienten (Nachweisrate Hoehn-und-Yahr-Stadium I: 41,7%; Hoehn-und-Yahr-Stadium II: 50%).

In Hoehn-und-Yahr-Stadium I ist die Sensitivität jedoch noch nicht ausreichend hoch. Da insbesondere in frühen Stadien der Erkrankung eine Differenzierung zwischen atypischen Parkinson-Syndromen und idiopathischem M. Parkinson klinisch sehr schwierig ist, ist jedoch vor allem das frühdiagnostische Potential eines Biomarkers entscheidend. In Hoehn-und-Yahr-Stadium I müsste die Detektionsrate noch erhöht werden, um einen sinnvollen Einsatz des Biomarkers Phospho-Alpha-Synuclein in der Klinik gewährleisten zu können.

Trunkiertes Alpha-Synuclein in Nervenfasern der Haut konnten in dieser Studie erstmals nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Anti-Truncated-Alpha-Synuclein-Antikörpers von Prothena Biosciences Inc (San Francisco, USA) konnten bei fast 61% der Patienten Ablagerungen beschrieben werden (Nachweisrate Hoehn-und-Yahr-Stadium I: 41,7%; Hoehn-und-Yahr-Stadium II: 75%). Es bleiben jedoch noch viele Fragen ungeklärt. Ist trunkiertes Alpha-Synuclein auch bei anderen Synucleinopathien in der Haut nachweisbar? Ist die Suche nach trunkiertem Alpha-Synuclein in der Haut ebenso spezifisch für den M. Parkinson beziehungsweise für Synucleinopathien wie die Suche nach phosphoryliertem Alpha-Synuclein? Oder kann in Studien mit einer höheren Fallzahl Truncated-Alpha-Synuclein auch in der Haut gesunder Kontrollen nachgewiesen werden?

Viele Fragen zu Alpha-Synuclein in Hautbiopsien sind aktuell noch nicht ausreichend geklärt. Alpha-Synuclein in Nervenfasern der Haut bleibt also auch weiterhin ein spannendes Forschungsthema mit noch viel Potenzial und zahlreichen interessanten bisher noch unbeantworteten Fragestellungen.

6 Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BSA	Bovine serum albumin
cm	Zentimeter
Ig	Immunglobulin
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
NMSS	Skala zur Erfassung nicht-motorischer Symptome bei der Parkinson-Erkrankung (Non-Motor Symptoms assessment scale for Parkinson's disease)
p	Signifikanzwert
Phospho-Alpha-Synuclein	phosphoryliertes Alpha-Synuclein
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PGP	Protein gene product
σ	Standardabweichung
UPDRS	Unified Parkinson's disease Rating Scale

7 Literatur

Adler, Charles H.; Beach, Thomas G.; Hentz, Joseph G.; Shill, Holly A.; Caviness, John N.; Driver-Dunckley, Erika et al. (2014): Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study. In: *Neurology* 83 (5), S. 406–412. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000641.

Antonini, Angelo; Barone, Paolo; Marconi, Roberto; Morgante, Letterio; Zappulla, Salvatore; Pontieri, Francesco Ernesto et al. (2012): The progression of non-motor symptoms in Parkinson's disease and their contribution to motor disability and quality of life. In: *Journal of neurology* 259 (12), S. 2621–2631. DOI: 10.1007/s00415-012-6557-8.

Antony, Paul M. A.; Diederich, Nico J.; Krüger, Rejko; Balling, Rudi (2013): The hallmarks of Parkinson's disease. In: *The FEBS journal* 280 (23), S. 5981–5993. DOI: 10.1111/febs.12335.

Ascherio, Alberto; Schwarzschild, Michael A. (2016): The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. In: *The Lancet Neurology* 15 (12), S. 1257–1272. DOI: 10.1016/S1474-4422(16)30230-7.

Baba, M.; Nakajo, S.; Tu, P. H.; Tomita, T.; Nakaya, K.; Lee, V. M. et al. (1998): Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. In: *The American Journal of Pathology* 152 (4), S. 879–884.

Baumann, Christian R.; Waldvogel, Daniel (2013): Die Therapie der Parkinson-Erkrankung. In: *Praxis* 102 (25), S. 1529–1535. DOI: 10.1024/1661-8157/a001505.

Bergström, Ann-Louise; Kallunki, Pekka; Fog, Karina (2016): Development of Passive Immunotherapies for Synucleinopathies. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 31 (2), S. 203–213. DOI: 10.1002/mds.26481.

Bhidayasiri, R. (2005): Differential diagnosis of common tremor syndromes. In: *Postgraduate medical journal* 81 (962), S. 756–762. DOI: 10.1136/pgmj.2005.032979.

Braak, Heiko; Del Tredici, Kelly; Rüb, Udo; Vos, Rob A. I. de; Jansen Steur, Ernst N. H.; Braak, Eva (2003): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. In: *Neurobiology of aging* 24 (2), S. 197–211.

Brahmachari, Saurav; Karuppagounder, Senthilkumar S.; Ge, Preston; Lee, Saebom; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M.; Ko, Han Seok (2017): c-Abl and Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Potential. In: *Journal of Parkinson's disease* 7 (4), S. 589–601. DOI: 10.3233/JPD-171191.

Breydo, Leonid; Wu, Jessica W.; Uversky, Vladimir N. (2012): A-synuclein misfolding and Parkinson's disease. In: *Biochimica et biophysica acta* 1822 (2), S. 261–285. DOI: 10.1016/j.bbadis.2011.10.002.

Brundin, Patrik; Dave, Kuldip D.; Kordower, Jeffrey H. (2017): Therapeutic approaches to target alpha-synuclein pathology. In: *Experimental neurology* 298 (Pt B), S. 225–235. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.10.003.

Burn, David J.; Landau, Sabine; Hindle, John V.; Samuel, Michael; Wilson, Kenneth C.; Hurt, Catherine S.; Brown, Richard G. (2012): Parkinson's disease

motor subtypes and mood. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 27 (3), S. 379–386. DOI: 10.1002/mds.24041.

Campbell, B. C.; McLean, C. A.; Culvenor, J. G.; Gai, W. P.; Blumbergs, P. C.; Jäkälä, P. et al. (2001): The solubility of alpha-synuclein in multiple system atrophy differs from that of dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. In: *Journal of neurochemistry* 76 (1), S. 87–96.

Campenhausen, Sonja von; Bornschein, Bernhard; Wick, Regina; Bötzel, Kai; Sampaio, Cristina; Poewe, Werner et al. (2005): Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe. In: *European neuropsychopharmacology: the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 15 (4), S. 473–490. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2005.04.007.

Chan, Sharon L.; Tan, Eng-King (2017): Targeting LRRK2 in Parkinson's disease: an update on recent developments. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 21 (6), S. 601–610. DOI: 10.1080/14728222.2017.1323881.

Connolly, Barbara S.; Lang, Anthony E. (2014): Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. In: *JAMA* 311 (16), S. 1670–1683. DOI: 10.1001/jama.2014.3654.

Costa, C. A. da; Ancolio, K.; Checler, F. (2000): Wild-type but not Parkinson's disease-related ala-53 -- Thr mutant alpha -synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (31), S. 24065–24069. DOI: 10.1074/jbc.M002413200.

Crawford, Paul; Zimmerman, Ethan E. (2011): Differentiation and diagnosis of tremor. In: *American family physician* 83 (6), S. 697–702.

Crowther, R. A.; Jakes, R.; Spillantini, M. G.; Goedert, M. (1998): Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated alpha-synuclein. In: *FEBS letters* 436 (3), S. 309–312.

Deuschl, G.; Raethjen, J.; Baron, R.; Lindemann, M.; Wilms, H.; Krack, P. (2000): The pathophysiology of parkinsonian tremor: a review. In: *J Neurol* 247 (S5), S. 33–48. DOI: 10.1007/PL00007781.

Dickson, Dennis W.; Braak, Heiko; Duda, John E.; Duyckaerts, Charles; Gasser, Thomas; Halliday, Glenda M. et al. (2009): Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. In: *The Lancet Neurology* 8 (12), S. 1150–1157. DOI: 10.1016/S1474-4422(09)70238-8.

Dickson, Dennis W. (2012): Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. In: *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2 (8), S. 1–15. DOI: 10.1101/cshperspect.a009258.

Dickson, Dennis W. (2018): Neuropathology of Parkinson disease. In: *Parkinsonism & related disorders* 46 Suppl 1, S. 30–33. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2017.07.033.

Djaldetti, Ruth; Ziv, Ilan; Melamed, Eldad (2006): The mystery of motor asymmetry in Parkinson's disease. In: *The Lancet Neurology* 5 (9), S. 796–802. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70549-X.

Donadio, Vincenzo; Incensi, Alex; Leta, Valentina; Giannoccaro, Maria Pia; Scaglione, Cesa; Martinelli, Paolo et al. (2014): Skin nerve α -synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease. In: *Neurology* 82 (15), S. 1362–1369. DOI: 10.1212/WNL.0000000000000316.

Donadio, Vincenzo; Incensi, Alex; Piccinini, Cristina; Cortelli, Pietro; Giannoccaro, Maria Pia; Baruzzi, Agostino; Liguori, Rocco (2016): Skin nerve misfolded α -synuclein in pure autonomic failure and Parkinson disease. In: *Annals of neurology* 79 (2), S. 306–316. DOI: 10.1002/ana.24567.

Donadio, Vincenzo; Incensi, Alex; Rizzo, Giovanni; Scaglione, Cesa; Capellari, Sabina; Fileccia, Enrico et al. (2017a): Spine Topographical Distribution of Skin α -Synuclein Deposits in Idiopathic Parkinson Disease. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 76 (5), S. 384–389. DOI: 10.1093/jnen/nlx021.

Donadio, Vincenzo; Incensi, Alex; Rizzo, Giovanni; Capellari, Sabina; Pantieri, Roberta; Stanzani Maserati, Michelangelo et al. (2017b): A new potential biomarker for dementia with Lewy bodies: Skin nerve α -synuclein deposits. In: *Neurology* 89 (4), S. 318–326. DOI: 10.1212/WNL.0000000000004146.

Donadio, V.; Incensi, A.; El-Agnaf, O.; Rizzo, G.; Vaikath, N.; Del Sorbo, F. et al. (2018a): Skin α -synuclein deposits differ in clinical variants of synucleinopathy: an in vivo study. In: *Scientific reports* 8 (1): Artikelnummer 14246. S. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-018-32588-8.

Donadio, Vincenzo (2018b): Skin nerve α -synuclein deposits in Parkinson's disease and other synucleinopathies: a review. In: *Clinical autonomic research*:

official journal of the Clinical Autonomic Research Society. DOI: 10.1007/s10286-018-0581-4.

Doppler, Kathrin; Ebert, Sönke; Uçeyler, Nurcan; Trenkwalder, Claudia; Ebentheuer, Jens; Volkmann, Jens; Sommer, Claudia (2014): Cutaneous neuropathy in Parkinson's disease: a window into brain pathology. In: *Acta neuropathologica* 128 (1), S. 99–109. DOI: 10.1007/s00401-014-1284-0.

Doppler, Kathrin; Weis, Jessica; Karl, Katharina; Ebert, Sönke; Ebentheuer, Jens; Trenkwalder, Claudia et al. (2015): Distinctive distribution of phospho-alpha-synuclein in dermal nerves in multiple system atrophy. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 30 (12), S. 1688–1692. DOI: 10.1002/mds.26293.

Doppler, Kathrin; Jentschke, Hanna-Maria; Schulmeyer, Lena; Vadasz, David; Janzen, Annette; Luster, Markus et al. (2017): Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. In: *Acta neuropathologica* 133 (4), S. 535–545. DOI: 10.1007/s00401-017-1684-z.

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

Games, Dora; Valera, Elvira; Spencer, Brian; Rockenstein, Edward; Mante, Michael; Adame, Anthony et al. (2014): Reducing C-terminal-truncated alpha-synuclein by immunotherapy attenuates neurodegeneration and propagation in

Parkinson's disease-like models. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 34 (28), S. 9441–9454. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5314-13.2014.

George, Julia M. (2001): The synucleins. In: *Genome Biology* 3 (1), reviews3002. S. 1-6. DOI: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002.

Goedert, Michel; Spillantini, Maria Grazia; Del Tredici, Kelly; Braak, Heiko (2013): 100 years of Lewy pathology. In: *Nature reviews. Neurology* 9 (1), S. 13–24. DOI: 10.1038/nrneurol.2012.242.

Goedert, Michel; Jakes, Ross; Spillantini, Maria Grazia (2017): The Synucleinopathies: Twenty Years On. In: *Journal of Parkinson's disease* 7 (s1), S. 51–69. DOI: 10.3233/JPD-179005.

Goetz, Christopher G.; Tilley, Barbara C.; Shaftman, Stephanie R.; Stebbins, Glenn T.; Fahn, Stanley; Martinez-Martin, Pablo et al. (2008): Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 23 (15), S. 2129–2170. DOI: 10.1002/mds.22340.

Hall, Katie; Yang, Sujeong; Sauchanka, Olga; Spillantini, Maria Grazia; Anichtchik, Oleg (2015): Behavioural deficits in transgenic mice expressing human truncated (1-120 amino acid) alpha-synuclein. In: *Experimental neurology* 264, S. 8–13. DOI: 10.1016/j.expneurol.2014.11.003.

Hess, Christopher W.; Hallett, Mark (2017): The Phenomenology of Parkinson's Disease. In: *Seminars in neurology* 37 (2), S. 109–117. DOI: 10.1055/s-0037-1601869.

Hoehn, M. M.; Yahr, M. D. (1967): Parkinsonism: onset, progression and mortality. In: *Neurology* 17 (5), S. 427–442.

Hornykiewicz, Oleh (2008): Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. In: *Neuro-degenerative diseases* 5 (3-4), S. 114–117. DOI: 10.1159/000113678.

Hughes, A. J.; Daniel, S. E.; Kilford, L.; Lees, A. J. (1992): Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 55 (3), S. 181–184.

Hughes, A. J.; Daniel, S. E.; Blankson, S.; Lees, A. J. (1993): A Clinicopathologic Study of 100 Cases of Parkinson's Disease. In: *Arch Neurol* 50 (2), S. 140–148. DOI: 10.1001/archneur.1993.00540020018011.

Hughes, Andrew J.; Daniel, Susan E.; Ben-Shlomo, Yoav; Lees, Andrew J. (2002): The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. In: *Brain: a journal of neurology* 125 (Pt 4), S. 861–870.

Ikemura, Masako; Saito, Yuko; Sengoku, Renpei; Sakiyama, Yoshio; Hatsuta, Hiroyuki; Kanemaru, Kazutomi et al. (2008): Lewy body pathology involves

cutaneous nerves. In: *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67 (10), S. 945–953. DOI: 10.1097/NEN.0b013e318186de48.

Iranzo, Alex; Tolosa, Eduard; Gelpi, Ellen; Molinuevo, José Luis; Valldeoriola, Francesc; Serradell, Mónica et al. (2013): Neurodegenerative disease status and post-mortem pathology in idiopathic rapid-eye-movement sleep behaviour disorder: an observational cohort study. In: *The Lancet Neurology* 12 (5), S. 443–453. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70056-5.

Iranzo, Alex; Fernández-Arcos, Ana; Tolosa, Eduard; Serradell, Mónica; Molinuevo, José Luis; Valldeoriola, Francesc et al. (2014): Neurodegenerative disorder risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: study in 174 patients. In: *PloS one* Volume 9 (Issue 2), e89741, S.1-6. DOI: 10.1371/journal.pone.0089741.

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

Jellinger, K. A. (1991): Pathology of Parkinson's disease. Changes other than the nigrostriatal pathway. In: *Molecular and chemical neuropathology* 14 (3), S. 153–197.

Jellinger, Kurt A. (2012): Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: evaluation and changes of concepts. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 27 (1), S. 8–30. DOI: 10.1002/mds.23795.

Kalia, Lorraine V.; Lang, Anthony E. (2015): Parkinson's disease. In: *The Lancet* 386 (9996), S. 896–912. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)61393-3.

Karuppagounder, Senthilkumar S.; Brahmachari, Saurav; Lee, Yunjong; Dawson, Valina L.; Dawson, Ted M.; Ko, Han Seok (2014): The c-Abl inhibitor, nilotinib, protects dopaminergic neurons in a preclinical animal model of Parkinson's disease. In: *Scientific reports* 4, Artikelnummer 4874, S.1-8. DOI: 10.1038/srep04874.

Katzenschlager, R.; Head, J.; Schrag, A.; Ben-Shlomo, Y.; Evans, A.; Lees, A. J. (2008): Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. In: *Neurology* 71 (7), S. 474–480. DOI: 10.1212/01.wnl.0000310812.43352.66.

Kingwell, Katie (2017): Zeroing in on neurodegenerative α -synuclein. In: *Nat Rev Drug Discov* 16 (6), S. 371–373. DOI: 10.1038/nrd.2017.95.

Lang, Anthony E.; Espay, Alberto J. (2018): Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 33 (5), S. 660–677. DOI: 10.1002/mds.27360.

Lau, Lonneke M. L. de; Breteler, Monique M. B. (2006): Epidemiology of Parkinson's disease. In: *The Lancet Neurology* 5 (6), S. 525–535. DOI: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.

Lee, Hong Ji; Lee, Woong Woo; Kim, Sang Kyong; Park, Hyeyoung; Jeon, Hyo Seon; Kim, Han Byul et al. (2016): Tremor frequency characteristics in

Parkinson's disease under resting-state and stress-state conditions. In: *Journal of the neurological sciences* 362, S. 272–277. DOI: 10.1016/j.jns.2016.01.058.

Lees, Andrew J; Hardy, John; Revesz, Tamas (2009): Parkinson's disease. In: *The Lancet* Volume 373, Issue 9680, S. 2055–2066. DOI: 10.1016/S0140-6736(09)60492-X.

Levin, Johannes; Kurz, Alexander; Arzberger, Thomas; Giese, Armin; Höglinger, Günter U. (2016): The Differential Diagnosis and Treatment of Atypical Parkinsonism. In: *Deutsches Arzteblatt international* 113 (5), S. 61–69. DOI: 10.3238/arztebl.2016.0061.

Lew, Mark (2007): Overview of Parkinson's disease. In: *Pharmacotherapy* 27 (12 Pt 2), S. 155–160. DOI: 10.1592/phco.27.12part2.155S.

Lewis, Karen A.; Yaeger, Aryn; Demartino, George N.; Thomas, Philip J. (2010): Accelerated formation of alpha-synuclein oligomers by concerted action of the 20S proteasome and familial Parkinson mutations. In: *Journal of bioenergetics and biomembranes* 42 (1), S. 85–95. DOI: 10.1007/s10863-009-9258-y.

Li, Wenxue; West, Neva; Colla, Emanuela; Pletnikova, Olga; Troncoso, Juan C.; Marsh, Laura et al. (2005): Aggregation promoting C-terminal truncation of α -synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (6), S. 2162–2167. DOI: 10.1073/pnas.0406976102.

Litvan, I.; MacIntyre, A.; Goetz, C. G.; Wenning, G. K.; Jellinger, K.; Verny, M. et al. (1998): Accuracy of the Clinical Diagnoses of Lewy Body Disease, Parkinson Disease, and Dementia With Lewy Bodies. In: *Arch Neurol* 55 (7), S. 969–978. DOI: 10.1001/archneur.55.7.969.

Litvan, Irene; Bhatia, Kailash P.; Burn, David J.; Goetz, Christopher G.; Lang, Anthony E.; McKeith, Ian et al. (2003): Movement Disorders Society Scientific Issues Committee report: SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for Parkinsonian disorders. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 18 (5), S. 467–486. DOI: 10.1002/mds.10459.

Liu, Chang-Wei; Giasson, Benoit I.; Lewis, Karen A.; Lee, Virginia M.; Demartino, George N.; Thomas, Philip J. (2005): A precipitating role for truncated alpha-synuclein and the proteasome in alpha-synuclein aggregation: implications for pathogenesis of Parkinson disease. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (24), S. 22670–22678. DOI: 10.1074/jbc.M501508200.

Mahul-Mellier, Anne-Laure; Fauvet, Bruno; Gysbers, Amanda; Dikiy, Igor; Oueslati, Abid; Georgeon, Sandrine et al. (2014): c-Abl phosphorylates α -synuclein and regulates its degradation: implication for α -synuclein clearance and contribution to the pathogenesis of Parkinson's disease. In: *Human molecular genetics* 23 (11), S. 2858–2879. DOI: 10.1093/hmg/ddt674.

Mandler, Markus; Valera, Elvira; Rockenstein, Edward; Weninger, Harald; Patrick, Christina; Adame, Anthony et al. (2014): Next-generation active immunization approach for synucleinopathies: implications for Parkinson's disease clinical trials. In: *Acta neuropathologica* 127 (6), S. 861–879. DOI: 10.1007/s00401-014-1256-4.

Marinus, Johan; van Hilten, Jacobus J. (2015): The significance of motor (a)symmetry in Parkinson's disease. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 30 (3), S. 379–385. DOI: 10.1002/mds.26107.

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

Michell, Andrew W.; Luheshi, Leila M.; Barker, Roger A. (2005): Skin and platelet alpha-synuclein as peripheral biomarkers of Parkinson's disease. In: *Neuroscience letters* 381 (3), S. 294–298. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.02.030.

Miki, Yasuo; Tomiyama, Masahiko; Ueno, Tatsuya; Haga, Rie; Nishijima, Haruo; Suzuki, Chieko et al. (2010): Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. In: *Neuroscience letters* 469 (3), S. 357–359. DOI: 10.1016/j.neulet.2009.12.027.

Murray, Ian V. J.; Giasson, Benoit I.; Quinn, Shawn M.; Koppaka, Vishwanath; Axelsen, Paul H.; Ischiropoulos, Harry et al. (2003): Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. In: *Biochemistry* 42 (28), S. 8530–8540. DOI: 10.1021/bi027363r.

Postuma, Ronald B.; Berg, Daniela; Stern, Matthew; Poewe, Werner; Olanow, C. Warren; Oertel, Wolfgang et al. (2015): MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 30 (12), S. 1591–1601. DOI: 10.1002/mds.26424.

Olanow, C. Warren (2004): The scientific basis for the current treatment of Parkinson's disease. In: *Annual review of medicine* 55, S. 41–60. DOI: 10.1146/annurev.med.55.091902.104422.

Olanow, C. Warren; Obeso, José A.; Stocchi, Fabrizio (2006): Drug insight: Continuous dopaminergic stimulation in the treatment of Parkinson's disease. In: *Nature clinical practice. Neurology* 2 (7), S. 382–392. DOI: 10.1038/ncpneuro0222.

Olanow, C. Warren; Brundin, Patrik (2013): Parkinson's disease and alpha synuclein: is Parkinson's disease a prion-like disorder? In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 28 (1), S. 31–40. DOI: 10.1002/mds.25373.

O'Sullivan, Sean S.; Williams, David R.; Gallagher, David A.; Massey, Luke A.; Silveira-Moriyama, Laura; Lees, Andrew J. (2008): Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. In: *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society* 23 (1), S. 101–106. DOI: 10.1002/mds.21813.

Park, Ariane; Stacy, Mark (2015): Disease-Modifying Drugs in Parkinson's Disease. In: *Drugs* 75 (18), S. 2065–2071. DOI: 10.1007/s40265-015-0497-4.

Parkinson, James (2002): An essay on the shaking palsy. 1817. In: *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 14 (2), 223-36; discussion 222. DOI: 10.1176/jnp.14.2.223.

Periquet, Magali; Fulga, Tudor; Myllykangas, Liisa; Schlossmacher, Michael G.; Feany, Mel B. (2007): Aggregated alpha-synuclein mediates dopaminergic neurotoxicity in vivo. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (12), S. 3338–3346. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0285-07.2007.

Pfeiffer, Ronald F. (2016): Non-motor symptoms in Parkinson's disease. In: *Parkinsonism & related disorders* 22 Suppl 1, S119-22. DOI: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.004.

Poewe, W. (2008): Non-motor symptoms in Parkinson's disease. In: *European Journal of Neurology* 2008, 15 (Suppl. 1): S. 14-20. DOI: 10.1111/j.1468-1331.2008.02056.x.

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.; Iorio, G. Di; Golbe, L. I.; Nussbaum, R. L. (1997): Mutation in the α -Synuclein Gene Identified in Families with Parkinson's Disease. In: *Science* 276 (5321), S. 2045–2047. DOI: 10.1126/science.276.5321.2045.

Prasad, Kavita; Beach, Thomas G.; Hedreen, John; Richfield, Eric K. (2012): Critical role of truncated α -synuclein and aggregates in Parkinson's disease and incidental Lewy body disease. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 22 (6), S. 811–825. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00597.x.

Rajput, A. H.; Rozdilsky, B.; Rajput, A. (1991): Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism--a prospective study. In: The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques 18 (3), S. 275–278.

Rao, Goutham; Fisch, Laura; Srinivasan, Sukanya; D'Amico, Frank; Okada, Tadao; Eaton, Carolyn; Robbins, Craig (2003): Does this patient have Parkinson disease? In: JAMA 289 (3), S. 347–353. DOI: 10.1001/jama.289.3.347.

Rao, Shobha S.; Hofmann, Laura A.; Shakil, Amer (2006): Parkinson's disease: diagnosis and treatment. In: American family physician 74 (12), S. 2046–2054.

Rooden, Stephanie M. van; Heiser, Willem J.; Kok, Joost N.; Verbaan, Dagmar; van Hilten, Jacobus J.; Marinus, Johan (2010): The identification of Parkinson's disease subtypes using cluster analysis: a systematic review. In: Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society 25 (8), S. 969–978. DOI: 10.1002/mds.23116.

Samii, Ali; Nutt, John G.; Ransom, Bruce R. (2004): Parkinson's disease. In: The Lancet 363 (9423), S. 1783–1793. DOI: 10.1016/S0140-6736(04)16305-8.

Schneider, Katharina (2018): Proof and analysis of phospho-alpha-synuclein in the skin of patients with Parkinsons' disease or multiple system atrophy. Online verfügbar unter <https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/frontdoor/index/index/docId/16969>, zuletzt geprüft am 12.02.2019. URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-169694.

Schrag, A.; Ben-Shlomo, Y.; Quinn, N. (2002): How valid is the clinical diagnosis of Parkinson's disease in the community? In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 73 (5), S. 529–534. DOI: 10.1136/jnnp.73.5.529.

Shulman, Lisa M.; Taback, Robin Leifert; Bean, Judy; Weiner, William J. (2001): Comorbidity of the nonmotor symptoms of Parkinson's disease. In: *Mov. Disord.* 16 (3), S. 507–510. DOI: 10.1002/mds.1099.

Sidransky, E.; Nalls, M. A.; Aasly, J. O.; Aharon-Peretz, J.; Annesi, G.; Barbosa, E. R. et al. (2009): Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. In: *The New England journal of medicine* 361 (17), S. 1651–1661. DOI: 10.1056/NEJMoa0901281.

Spillantini, M. G.; Schmidt, M. L.; Lee, V. M.; Trojanowski, J. Q.; Jakes, R.; Goedert, M. (1997): Alpha-synuclein in Lewy bodies. In: *Nature* 388 (6645), S. 839–840. DOI: 10.1038/42166.

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

Storch, A.; Odin, P.; Trender-Gerhard, I.; Fuchs, G.; Reifschneider, G.; Ray Chaudhuri, K. et al. (2010): Non-motor Symptoms Questionnaire und Scale für das idiopathische Parkinson-Syndrom. Interkulturell adaptierte Versionen in deutscher Sprache. In: *Der Nervenarzt* 81 (8), S. 980–985. DOI: 10.1007/s00115-010-3010-z.

Storch, Alexander; Schneider, Christine B.; Wolz, Martin; Stürwald, Yannic; Nebe, Angelika; Odin, Per et al. (2013): Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications. In: *Neurology* 80 (9), S. 800–809. DOI: 10.1212/WNL.0b013e318285c0ed.

Sveinbjornsdottir, Sigurlaug (2016): The clinical symptoms of Parkinson's disease. In: *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 1, S. 318–324. DOI: 10.1111/jnc.13691.

Thenganatt, Mary Ann; Jankovic, Joseph (2014): Parkinson disease subtypes. In: *JAMA neurology* 71 (4), S. 499–504. DOI: 10.1001/jamaneurol.2013.6233.

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

Tolosa, Eduardo; Wenning, Gregor; Poewe, Werner (2006): The diagnosis of Parkinson's disease. In: *The Lancet Neurology* 5 (1), S. 75–86. DOI: 10.1016/S1474-4422(05)70285-4.

Ulusoy, Ayse; Febbraro, Fabia; Jensen, Poul H.; Kirik, Deniz; Romero-Ramos, Marina (2010): Co-expression of C-terminal truncated alpha-synuclein enhances full-length alpha-synuclein-induced pathology. In: *The European journal of neuroscience* 32 (3), S. 409–422. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2010.07284.x.

Villar-Piqué, Anna; Lopes da Fonseca, Tomás; Outeiro, Tiago Fleming (2016): Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. In: *Journal of neurochemistry* 139 Suppl 1, S. 240–255. DOI: 10.1111/jnc.13249.

Voon, Valerie; Gao, Jennifer; Brezing, Christina; Symmonds, Mkael; Ekanayake, Vindhya; Fernandez, Hubert et al. (2011): Dopamine agonists and risk: impulse control disorders in Parkinson's disease. In: *Brain: a journal of neurology* 134 (Pt 5), S. 1438–1446. DOI: 10.1093/brain/awr080.

Wakabayashi, Koichi; Tanji, Kunikazu; Mori, Fumiaki; Takahashi, Hitoshi (2007): The Lewy body in Parkinson's disease: molecules implicated in the formation and degradation of alpha-synuclein aggregates. In: *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 27 (5), S. 494–506.

Wang, Ningshan; Gibbons, Christopher H.; Lafo, Jacob; Freeman, Roy (2013): α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. In: *Neurology* 81 (18), S. 1604–1610. DOI: 10.1212/WNL.0b013e3182a9f449.

Weerkamp, Nico J.; Tissingh, Gerrit; Poels, Petra J. E.; Zuidema, Systse U.; Munneke, Marten; Koopmans, Raymond T. C. M.; Bloem, Bastiaan R. (2013): Nonmotor symptoms in nursing home residents with Parkinson's disease: prevalence and effect on quality of life. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 61 (10), S. 1714–1721. DOI: 10.1111/jgs.12458.

West, Andrew B. (2017): Achieving neuroprotection with LRRK2 kinase inhibitors in Parkinson disease. In: *Experimental neurology* 298 (Pt B), S. 236–245. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.07.019.

Williams, D. R.; Watt, H. C.; Lees, A. J. (2006): Predictors of falls and fractures in bradykinetic rigid syndromes: a retrospective study. In: *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77 (4), S. 468–473. DOI: 10.1136/jnnp.2005.074070.

Winters, Boyer D.; Forwood, Suzanna E.; Cowell, Rosemary A.; Saksida, Lisa M.; Bussey, Timothy J. (2004): Double dissociation between the effects of perirhinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. In: *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 24 (26), S. 5901–5908. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1346-04.2004.

Wirdefeldt, Karin; Adami, Hans-Olov; Cole, Philip; Trichopoulos, Dimitrios; Mandel, Jack (2011): Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. In: *European journal of epidemiology* 26 Suppl 1, S1-58. DOI: 10.1007/s10654-011-9581-6.

Zach, H.; Walter, U.; Liepelt-Scarfone, I.; Maetzler, W. (2017): Diagnostik des klinischen und prodromalen idiopathischen Parkinson-Syndroms: Neue Kriterien. In: *Der Nervenarzt* 88 (4), S. 356–364. DOI: 10.1007/s00115-017-0290-6.

Zange, Leonora; Noack, Cornelia; Hahn, Katrin; Stenzel, Werner; Lipp, Axel (2015): Phosphorylated α -synuclein in skin nerve fibres differentiates Parkinson's disease from multiple system atrophy. In: *Brain: a journal of neurology* 138 (Pt 8), S. 2310–2321. DOI: 10.1093/brain/awv138.

8 Anhang

8.1 Patienteninformation

Universitätsklinikum Würzburg

Neurologische Klinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. J. Volkmann

Neurologische Klinik und Poliklinik · Josef-Schneider-Str. 11 · 97080 Würzburg

Patienteninformation zur Studie

Hautbiopsie zur Diagnostik und Erforschung des M. Parkinson

1 / 2

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Sie leiden an einem Parkinson-Syndrom. Die Krankheitsgruppe umfasst neben der klassischen Parkinsonerkrankung sogenannte atypische Parkinsonsyndrome, die sich in der Therapierbarkeit und in einigen Symptomen von der klassischen Parkinsonerkrankung unterscheiden. V.a. im Anfangsstadium sind die Parkinson-Syndrome nicht immer eindeutig zu diagnostizieren. Zur optimalen Therapie ist es wichtig, die Parkinson-Erkrankung frühzeitig und mit hinreichender Sicherheit zu diagnostizieren und von den atypischen Parkinson-Syndromen abzugrenzen. In einer Vorläuferstudie konnten wir nachweisen, dass es bei einem Teil der Patienten mit Parkinson-Erkrankung zur Ablagerung von Alpha-Synuclein, dem Protein, das auch im Hirngewebe von Parkinsonpatienten gefunden werden kann, in Nervenfasern der Haut kommt. Hautbiopsien sind eine komplikationslose Methode und werden seit einigen Jahren zur Diagnostik von Erkrankungen des Nervensystems (v.a. bei sogenannten Polyneuropathien) eingesetzt. Das Ziel unserer Studie ist es, herauszufinden, ob Hautbiopsien geeignet sind, um über den Nachweis von Alpha-Synuclein in Nervenfasern der Haut die Parkinsonerkrankung zu diagnostizieren und näher zu erforschen.

Wie wird eine Hautbiopsie entnommen?

Der Ablauf der Biopsieentnahme ist identisch mit dem bei der seit Jahren in der Routinediagnostik durchgeführten Hautbiopsie vom Ober- und Unterschenkel. Es erfolgt eine gründliche Desinfektion des Biopsieortes und in das entsprechende Areal (Oberschenkel, Unterschenkel, Rücken und Nacken) wird ein lokales Betäubungsmittel gespritzt. Dann wird mit einer Hautstanze ein Hautstück von 5 mm Durchmesser entnommen und die entstehende Wunde mit einem Pflaster versorgt.

Was geschieht mit den Hautbiopsien?

Die Biopsien werden ebenso wie die schon seit Jahren routinemäßig durchgeführten Hautbiopsien vom Oberschenkel und Unterschenkel feingeweblich aufgearbeitet. Es erfolgt die Anfärbung der

Neurologische Klinik
und Poliklinik
Josef-Schneider-Str. 11 · Haus B1
97080 Würzburg

Tel.: (09 31) 2 01 – 2 46 21 (Pforte)
Fax: (09 31) 2 01 – 2 36 97
www.klinik.uni-wuerzburg.de/neurologie



Die Klinik ist mit Straßenbahn, Linie 1 und 5 (Grombühl), Haltestelle Robert-Koch-Str. (Uniklinikum B und C), zu erreichen.

Nervenfasern und des Alpha-Synucleins mit Antikörpern.

Ist mit irgendwelchen Komplikationen zu rechnen?

Die Hautbiopsie ist eine schonende und komplikationsarme Methode. Bei der seit Jahren durchgeführten Hautbiopsie vom Ober- und Unterschenkel sind bisher an unserer Klinik keine Komplikationen aufgetreten. Denkbar wäre eine allergische Reaktion auf das lokale Betäubungsmittel, eine verstärkte Blutung bei Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten und eine Wundinfektion. Wir bitten Sie daher, uns Allergien oder die Einnahme von blutverdünnenden Medikamenten, wie z.B. Marcumar mitzuteilen. Außerdem sollten Sie in den Tagen bis zum Abheilen eine Verunreinigung der Wunde vermeiden.

Ist die Teilnahme freiwillig? Kann die Zustimmung widerrufen werden?

Die Teilnahme an dieser Studie ist absolut freiwillig. Die Teilnahme kann jederzeit und ohne Angabe von Gründen auch während der Biopsieentnahme widerrufen werden, ohne dass Ihnen daraus irgendwelche Nachteile entstehen.

Datenschutzerklärung

Alle bei der Durchführung der Biopsie beteiligten Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind auf das Datengeheimnis verpflichtet. Die Daten werden nur in pseudonymisierter Form weiterverarbeitet (d.h. Ihre Personaldaten werden durch Zahlencodes ersetzt) und im Computersystem des Klinikums gespeichert. Zugang zum Zuordnungsschlüssel haben nur an der Studie beteiligte Personen (Studienärzte, Doktoranden, Laborpersonal). Die Hautproben sowie die Studiendaten werden im Archiv des histologischen Labors der Neurologischen Klinik für 10 Jahre aufbewahrt. Danach werden die Proben vernichtet und die Daten anonymisiert. Falls Sie vor Ablauf dieser Frist Ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie widerrufen, wird Ihr Gewebe vernichtet und Ihre Studiendaten werden gelöscht. Zugang zu den im Rahmen der Studie erhobenen Daten und Hautproben haben nur die an unserer Klinik hieran beteiligten Personen (Ärzte, Doktoranden, Laborpersonal). Die Veröffentlichung der Studienergebnisse erfolgt anonymisiert (d.h. aus den publizierten Daten kann nicht auf die Identität von an der Studie beteiligten Probanden geschlossen werden). Alle geltenden Datenschutzbestimmungen werden berücksichtigt.

Für Ihre Mitarbeit danken wir Ihnen recht herzlich!

Kontaktdaten: Dr. K. Doppler, Neurologische Klinik, Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg, Tel. 0931-20124621, Doppler_K@ukw.de

8.2 Einwilligungserklärung

Universitätsklinikum Würzburg

Neurologische Klinik und Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. J. Volkmann



Neurologische Klinik · Josef-Schneider-Str. 11 · 97080 Würzburg

Einwilligungserklärung für Patienten

Name: _____

zur Teilnahme am Forschungsprojekt:

Hautbiopsie zur Diagnostik und Erforschung des M. Parkinson

Ich bin durch Herrn/Frau über die Bedeutung, die Risiken und den Ablauf der Studie sowohl mündlich als auch schriftlich aufgeklärt worden. Ich hatte ausreichend Gelegenheit Fragen zu stellen und eine ausreichende Bedenkzeit. Es wurde mir eine schriftliche Teilnahmeinformation ausgehändigt und ich hatte ausreichend Zeit, diese zu lesen. Den Inhalt habe ich verstanden. Ich weiß, dass ich weitere Informationen jederzeit bei den Versuchsleitern erfragen kann. Alle meine Fragen wurden ausreichend beantwortet. Ich wurde darüber informiert, dass die Teilnahme an dieser Studie absolut freiwillig ist und ich meine Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile widerrufen kann.

Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten im Zusammenhang mit dieser Untersuchung gespeichert, verarbeitet und in pseudonymisierter Form an die an der Durchführung und Auswertung dieser Studie beteiligten Personen weitergegeben werden. Dabei werden die Bestimmungen des geltenden Datenschutzes und die ärztliche Schweigepflicht eingehalten.

Ich erkläre mich bereit, an der Untersuchung teilzunehmen.

(Datum, Name, Unterschrift PatientIn)

(Datum, Name, Unterschrift Arzt/Ärztin)

Kontaktdaten: Dr. K. Doppler, Neurologische Klinik, Josef-Schneider-Str. 11, 97080 Würzburg, Tel. 0931-20124621, Doppler_K@ukw.de

Neurologische Klinik
und Poliklinik
Josef-Schneider-Str. 11 · Haus B1
97080 Würzburg

Tel.: (09 31) 2 01 – 2 46 21 (Pflege)
Fax: (09 31) 2 01 – 2 36 97
www.klinik.uni-wuerzburg.de/neurologie



Die Klinik ist mit Straßenbahn, Linie 1 und 5 (Grombühl), Haltestelle Robert-Koch-Str. (Uniklinikum B und C), zu erreichen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich zunächst Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Anregungen während der Arbeitsgruppenseminare danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Doppler für die großartige, unermüdliche und geduldige Anleitung, Betreuung und Unterstützung während der gesamten klinischen und experimentellen Arbeit und für das Korrekturlesen der Dissertation.

Ein großes Dankeschön geht darüber hinaus an Herrn Prof. Dr. med. Henning Hamm für die Übernahme der externen Betreuung im Betreuungskomitee.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des histologischen Labors und der AG Sommer, insbesondere bei Frau Barbara Dekant für die ausgezeichnete Anleitung, Hilfestellung und Unterstützung.

Des Weiteren danke ich allen Probanden, die diese Forschungsarbeit durch ihre Teilnahme möglich gemacht haben.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und Alexander für ihre Unterstützung und Ermutigung bedanken.