

Aus der Klinik für Neurologie und dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Phosphoryliertes α -Synuclein als diagnostischer Marker für eine
dermale sympathische Neurodegeneration bei
Lewy body-Erkrankungen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonora Zange

aus Reichenbach / Vogtland

Datum der Promotion: 05.12.2014

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt.....	IV
Abstract.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Klinik des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie.....	1
1.1.1 Epidemiologie und Diagnose.....	1
1.1.2 Apparative Diagnostik.....	2
1.2 Neuropathologische Aspekte.....	6
1.2.1 Lewy body-Erkrankungen.....	6
1.2.2 Multisystematrophie.....	9
1.3 Die Rolle des phosphorylierten α -Synucleins.....	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Patienten.....	15
2.1.1 Patientenrekrutierung und Studieneinschluss.....	15
2.1.2 Klinische Untersuchung.....	18
2.2 Gewebe.....	21
2.2.1 Entnahmetechnik und Aufarbeitung.....	21
2.2.2 Immunhistochemie.....	22
2.2.3 Morphologische Analyse.....	27
2.3 Statistische Methoden.....	31
3 Ergebnisse.....	33
3.1 Patienten.....	33
3.2 Diagnostisch relevante Daten.....	33

3.3	Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein.....	35
3.4	Semiquantitative Bewertung	41
3.4.1	Phosphoryliertes α -Synuclein.....	41
3.4.2	Protein Gene Product 9.5.....	43
3.4.3	Tyrosinhydroxylase	49
3.5	Grad der Denervation der sympathisch innervierten Hautstrukturen.....	54
3.6	Korrelationsanalyse	55
3.6.1	Immunhistochemische Daten	55
3.6.2	Klinische Daten	55
4	Diskussion.....	57
4.1	Expression von phosphoryliertem α -Synuclein in dermalen sympathischen Nervenfasern bei Patienten mit LBD	57
4.2	Reduktion kutaner sympathischer Nervenfasern bei LBD.....	64
4.3	Relation von kutaner sympathischer Neurodegeneration und Lewy-Pathologie	65
4.4	Diskussion der Tyrosinhydroxylase-Immunoreaktivität.....	66
4.5	Diskussion der Methode	68
4.6	Fazit.....	70
5	Literaturverzeichnis	71
	Eidesstattliche Versicherung.....	80
	Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	81
	Lebenslauf.....	82
	Publikationsliste	83
	Danksagung.....	84

Abstrakt

Einleitung: Phosphoryliertes α -Synuclein ist ein intrazelluläres, pathologisch modifiziertes Protein, welches den Krankheitsprozess im zentralen Nervensystem (ZNS) einer heterogenen Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen charakterisiert. Es ist Hauptbestandteil intraneuronaler Lewy bodies bei Lewy body-Erkrankungen (LBD), wie dem idiopathischen Parkinson-Syndrom, und der oligodendroglialen Einschlusskörperchen der Multisystematrophie (MSA). Beiden Erkrankungen ist es gemeinsam, dass eine gesicherte Diagnose derzeit nur postmortem - anhand des histologischen Nachweises von phosphoryliertem α -Synuclein sowie einer Neurodegeneration an Prädilektionsstellen im ZNS - gestellt werden kann. Eine frühzeitige Differenzierung der Erkrankungen mittels Anamnese, klinischer Untersuchung sowie apparativer Zusatzdiagnostik besitzt nur eine begrenzte Sensitivität und Spezifität. Neben dem Ausbleiben eines symptomatischen Effekts von Levodopa ist eine ausgeprägte autonome Dysfunktion ein verlässlicher klinischer Marker im Verlauf einer MSA. Pathophysiologisch ist diese autonome Dysfunktion der MSA auf zentrale, präganglionäre autonome Neurone begrenzt, während bei LBD zusätzlich postganglionäre autonome Neurone von der Neurodegeneration betroffen sind. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression, funktionell relevanter und pathognomonischer Proteine in postganglionären sympathischen Nervenfasern zu analysieren. In dieser Studie wurde erstmals intravital gewonnenes Hautgewebe von LBD- und MSA-Patienten hinsichtlich der α -Synuclein-Pathologie untersucht und verglichen.

Methoden: Anhand der Identifikation und semiquantitativen Bewertung des Expressionsmusters von phosphoryliertem α -Synuclein soll dessen potenzielle Funktion als intravitales diagnostischer Marker in der Differenzialdiagnostik von LBD und MSA überprüft werden. Es wurden 3 mm breite Hautstanzbiopsien am volaren Unterarm von jeweils 10 klinisch diagnostizierten LBD- und MSA-Patienten entnommen sowie von 6 Kontroll-Patienten mit essenziellem Tremor (ET). An 3 μ m dünnen Paraffinschnitten wurde die Immunoreaktivität des monoklonalen Antikörpers gegen phosphoryliertes α -Synuclein (PSyn) in den sympathischen Nervenfasern der Schweißdrüsen, Haarmuskeln und Blutgefäße untersucht. Die dermale autonome Innervation wurde immunhistochemisch mittels des panaxonalen Markers Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) und des adrenergen Markers Tyrosinhydroxylase (TH) dargestellt und das Muster an den autonomen Zielorganen semiquantitativ bewertet.

Ergebnisse: Phosphoryliertes α -Synuclein war in den sympathischen Hautnervenfasern der LBD-Patienten nachweisbar, nicht jedoch in denen der MSA oder ET-Patienten.

Patienten mit LBD wiesen altersunabhängig signifikant weniger PGP 9.5-positive Nervenfasern auf, als Patienten mit MSA oder ET. Die Expression von phosphoryliertem α -Synuclein in sympathischen Hautnervenfasern korrelierte mit einem Verlust PGP 9.5-positiver Nervenfasern bei LBD-Patienten. Die TH-Immunoreaktivität der sympathischen Hautnervenfasern differierte nicht signifikant zwischen den Gruppen.

Fazit: Die Resultate demonstrieren die Involvierung postganglionärer sympathischer Nervenfasern der Haut in den neurodegenerativen Krankheitsprozess bei LBD; bei der MSA gibt es diese Involvierung nicht. Die intravitale Hautbiopsie und immunhistochemische Analyse der Haut bieten einen vielversprechenden Ansatz zur frühzeitigen Differenzierung von LBD und MSA an Lebenden.

Abstract

Background: Phosphorylated α -Synuclein is a pathologically modified protein which characterizes the disease process within the central nervous system (CNS) of heterogeneous neurodegenerative disorders. It constitutes the main component of Lewy bodies in idiopathic Parkinson's disease, a Lewy body disorder (LBD), and of glial cytoplasmatic inclusions in multiple system atrophy (MSA). The definitive diagnosis of both diseases is based on post mortem neuropathological criteria with evidence of phosphorylated α -Synuclein and degeneration of predilection sites in the CNS. An early differentiation during lifetime based on medical history, examination, nuclear imaging and functional analysis is insufficient. However, in MSA autonomic dysfunction as clinical marker is often more pronounced than in LBD. While preganglionic and central autonomic neurons are involved in the neurodegenerative process in MSA, peripheral postganglionic sympathetic nerves are additionally affected in LBD. The aim of this study is to analyze the expression of pathognomonic proteins in postganglionic sympathetic nerve fibers. This study examines and compares for the first time intravital α -synuclein pathology in skin sympathetic nerve fibers of LBD and MSA patients.

Methods: To evaluate the potential function of phosphorylated α -Synuclein as an intravital diagnostic marker, the immunohistochemical pattern of the monoclonal phosphorylated α -synuclein Antibody (PSyn) in dermal sympathetic nerve fibers was investigated by identification and semiquantitative scoring. Three millimeter skin punch biopsies were obtained from the flexor surface of the forearm of 10 clinically diagnosed LBD and MSA- patients as well as of 6 control subjects with essential tremor (ET), respectively. The paraffin-embedded 3 μ m sections were stained separately with antibodies against PSyn, Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) as a panaxonal marker and Tyrosinhydroxylase (TH) as an adrenergic marker. Immunoreactivity was assessed in sympathetic nerve fibers of sweat glands, arrector pili muscles and blood vessels.

Results: Abnormal deposits of PSyn in dermal sympathetic skin nerve fibers were found in all LBD specimens, yet none in MSA or ET specimens. Independent of patient's age, LBD samples showed significantly less PGP 9.5-positive nerve fibers compared to samples of MSA or ET patients. Deposition of PSyn correlated with loss of PGP 9.5-positive nerve fibers in LBD. TH immunoreactivity did not differ significantly between groups.

Conclusion: The results confirm an involvement of skin sympathetic nerve fibers in the disease process of LBD different from MSA. The skin punch biopsy and immunohistochemical demonstration of phosphorylated α -synuclein in dermal sympathetic nerve fibers are a promising method to distinguish LBD from MSA in living patients.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ADLB	Alzheimer's disease with Lewy bodies
AG	Schweißdrüsen-Ausführungsgang
ANS	Autonomes Nervensystem
Art	Arteriole
BMI	Body-mass-Index
CASS	Composite Autonomic Scoring Scale
CGRP	Calcitonin-gene-related peptide
DAT	Dopamintransporter
DLB	Dementia with Lewy bodies
ET	Essenzieller Tremor
ENS	Enterisches Nervensystem
ES	Schweißdrüsen-Endstück
¹²³I-FP-CIT	Ioflupan
GCI	Glial cytoplasmatic inclusions
H/M-ratio	Heart/Mediastinum-ratio
HRDB	Heart-rate-response to deep breathing
¹²³I-IBZM	Iodobenzamid
¹²³I-MIBG	Metaiodobenzylguanidin
ILBD	Incidental Lewy body disease
IPS	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
LB	Lewy bodies
LBD	Lewy body disorder, Lewy body-Erkrankung
LN	Lewy Neuriten
LSAB	Labeled Streptavidin-Biotin
L-Dopa	L-3,4-Dihydroxyphenylalanin
Map	Musculus arrector pili
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MSA	Multisystematrophie

N	Nervenfaszikel
NAC(P)	Non-A β Component Protein (Precursor)
NF	Neurofilament
NPY	Neuropeptid Y
NSE	Neuronenspezifische Enolase
OPCA	Olivopontozerebelläre Atrophie
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PANS	Peripheres autonomes Nervensystem
PET	Positronen-Emissionstomografie
PGP 9.5	Protein Gene Product 9.5
PSyn	Phosphoryliertes α -Synuclein
QSART	Quantitative sudomotorische Axon-Reflex-Testung
SGNFD	Sweat gland nerve fiber density
SPECT	Single-photon emission computed tomography
SND	Striatonigrale Degeneration
SR	Specific binding ratio
TH	Tyrosinhydroxylase
UCH-L1	Ubiquitin Carboxyl-terminal Esterase L1
UKPDSBBC	UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Criteria
UMSARS	Unified Multiple System-Atrophy Rating Scale
UPDRS	Unified Parkinson's Disease Rating Scale
VIP	Vasoaktives intestinales Polypeptid
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZANS	Zentrales autonomes Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematischer Aufbau von α -Synuclein	11
Abb. 2:	Indirekter Antikörpernachweis unter Anwendung der Labeled Streptavidin-Biotin Methode.....	23
Abb. 3:	Positiv-Kontrolle für Anti-phosphoryliertes α -Synuclein: ZNS-Gewebe einer Patientin mit gesicherter Multisystematrophie.....	26
Abb. 4:	Schematischer Querschnitt der Haut	27
Abb. 5:	Histologischer Querschnitt einer ekkrinen Schweißdrüse.....	28
Abb. 6:	Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in den sympathischen Nervenfasern der Schweißdrüsen bei Lewy body-Erkrankung.	36
Abb. 7:	Unauffällige immunhistochemische Färbung der Schweißdrüse mit phosphoryliertem α -Synuclein bei Multisystematrophie und essenziellem Tremor.	37
Abb. 8:	Positive Immunoreaktivität für phosphoryliertes α -Synuclein in den Nervenfasern der Arteriolen und Musculi arrectores pilorum bei Lewy body-Erkrankten.....	38
Abb. 9:	Phospho- α -Synuclein-Immunoreaktivität in Nervenfaszikeln.	39
Abb. 10:	Lewy body-Erkrankte exprimieren phosphoryliertes α -Synuclein in postganglionären sympathischen Nervenfasern der Haut.	40
Abb. 11:	Visualisierung der semiquantitativen Einzelscores für phosphoryliertes α -Synuclein. ...	42
Abb. 12:	Verminderte Protein Gene Product 9.5.-Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Schweißdrüsen bei Patienten mit Lewy body-Erkrankungen.	44
Abb. 13:	Protein Gene Product 9.5-Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Arteriolen und Musculi arrectores pilorum.	45
Abb. 14:	Protein Gene Product 9.5-Immunoreaktivität in Nervenfaszikeln.	46
Abb. 15:	Einzelvergleich der Protein Gene Product 9.5-Scores.	48
Abb. 16:	Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung der Nervenfasern der Schweißdrüsen-Endstücke, -Ausführungsgänge und der Musculi arrectores pilorum. ...	50
Abb. 17:	Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung der Nervenfasern der dermalen Arteriolen und Nervenfaszikel.....	51
Abb. 18:	Einzelvergleich der Tyrosinhydroxylase-Scores.....	53
Abb. 19:	Grad der Denervation der sympathisch innervierten Hautstrukturen.....	54
Abb. 20:	Altersunabhängiger Verlust Protein Gene Product 9.5-positiver autonomer Nervenfasern bei Lewy body-Erkrankungen.	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gegenüberstellung des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie	4
Tabelle 2: Komponenten des zentralen autonomen und peripheren sympathischen Nervensystems.....	6
Tabelle 3: Schematische Darstellung der aufsteigenden Neurodegeneration beim idiopathischen Parkinson-Syndrom	9
Tabelle 4: Klassifizierung des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie innerhalb der α -Synucleinopathien.....	12
Tabelle 5: Klinische Diagnosekriterien für das idiopathische Parkinson-Syndrom.....	16
Tabelle 6: Klinische Diagnosekriterien für die Multisystematrophie	17
Tabelle 7: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien.....	18
Tabelle 8: Formeln zur Berechnung der kardiovagalen und adrenergen Parameter.	19
Tabelle 9: Berechnung der Composite Autonomic Scoring Scale-Subscores.....	20
Tabelle 10: Auflistung der Lösungen und Einwirkzeit der aufsteigenden Alkoholreihe.....	22
Tabelle 11: Charakterisierung der Primärantikörper	25
Tabelle 12: Semiquantitative Bewertung für das Färbemuster der Antikörper-Immunoreaktivität... ..	30
Tabelle 13: Diagnostisch relevante klinische und nuklearmedizinische Daten der Patientenkollektive.	34
Tabelle 14: Relation zwischen dem Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein und der zugrunde liegenden Erkrankung.....	35
Tabelle 15: Charakterisierung der dermalen Phospho- α -Synuclein-Immunfärbung.....	41
Tabelle 16: Charakterisierung der dermalen Protein Gene Product 9.5-Immunfärbung.....	47
Tabelle 17: Charakterisierung der dermalen Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung	52
Tabelle 18: Inverse Korrelation von phosphoryliertem α -Synuclein und Protein Gene Product 9.5.....	55
Tabelle 19: Keine Korrelation zwischen Expression von phosphoryliertem α -Synuclein in postganglionären sympathischen Hautnervenfaser und klinischen Parametern bei Lewy body-Erkrankungen.....	56
Tabelle 20: Gegenüberstellung der Studien zur Untersuchung von phosphoryliertem α -Synuclein in der Haut.....	60
Tabelle 21: Vergleich der Degenerationsmarker an kardialen sympathischen Nervenfaser bei α -Synucleinopathien.....	66

1 Einleitung

1.1 Klinik des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie

1.1.1 Epidemiologie und Diagnose

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) zählt mit einer Inzidenz von 8-18 pro 100.000 Personen pro Jahr zu den häufigsten neurologischen Erkrankungen.¹ Das Risiko zu erkranken steigt ab einem Alter von über 50 Jahren um 9% pro Jahr an.² In industrialisierten Ländern sind etwa 1% der über 60-jährigen an einem IPS erkrankt.¹ Das Hauptmerkmal der Erkrankung ist der progrediente Verlust von Dopamin-haltigen Neuronen in der Substantia nigra pars compacta.³ Diese Neurone projizieren hauptsächlich in das dorsale Putamen im Striatum der Basalganglien. Die reduzierte dopaminerge Stimulation dieser Eingangsneurone der Basalganglien führt zu einem Ungleichgewicht der Projektionssysteme und damit zu einer Reduktion des Thalamokortikalen Regelkreises. Daraus resultiert eine erschwerte Initiierung motorischer Programme, was sich klinisch u. a. in einer Reduktion von Bewegungsamplitude und -geschwindigkeit manifestiert.^{4,5} Klinisch ist das Parkinson-Syndrom durch die Kombination von Bradykinese und mindestens einem weiteren Kardinalsymptom, Rigor, Ruhetremor und posturaler Instabilität, definiert.⁶ Allerdings sind diese Symptome nicht spezifisch für die idiopathische Form, sondern ebenfalls bei atypischen und symptomatischen Formen vorhanden. Die Diagnosestellung erfolgt klinisch gemäß den „UK-Parkinson’s Disease Brain Bank clinical diagnostic criteria“ (UKPDSBBC).⁵⁻⁷ Die Sensitivität und der positive prädiktive Wert der klinischen Kriterien liegen jeweils bei 92% und 98,6% in einer pathologisch definierten Kohorte.⁸ Andererseits wurden von 100 klinisch diagnostizierten IPS-Patienten sechs Patienten postmortal als Multisystematrophie (MSA) identifiziert.⁷

Die MSA ist eine sporadische, rasch progrediente, neurodegenerative Erkrankung, die sich klinisch in einer Kombination aus Parkinson-Syndrom (MSA-P), zerebellärem Syndrom (MSA-C) und autonomer Funktionsstörung darstellt.⁹ Der Manifestationsgipfel der Erkrankung ist die sechste Lebensdekade.¹⁰ Mit einer geschätzten Inzidenz von etwa 0,6-2,1 pro 100.000 Einwohner pro Jahr ist sie deutlich seltener als das IPS.^{10,11} Jedoch ist die Progredienz der MSA mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 5-8 Jahren nach Diagnosestellung gegenüber ca. 16 Jahren beim IPS deutlich rascher.^{10, 12, 13} Die symptomatische Dopamin-Ersatztherapie durch

eine Kombination aus Levodopa und einem peripher wirksamen Decarboxylase-Inhibitor führt beim IPS in den ersten Jahren zu einer effektiven Symptomreduktion.^{14, 15} Dagegen profitieren nur etwa 30% der MSA-Patienten von einer hochdosierten (über 1000 mg pro Tag) dopaminergen Therapie, oftmals nur unter einem erhöhten Nebenwirkungs-Risiko und von begrenzter Dauer.¹⁶

Neben motorischen Symptomen führen im Verlauf der Parkinson-Erkrankung nicht-motorische Symptome, wie Depression, kognitive Einbußen, Schmerzen und vor allem vegetativ-autonome Funktionsstörungen zu einer erheblichen Einschränkung der Lebensqualität.^{17, 18} Sie können sich unmerklich bereits vor dem Auftreten motorischer Symptome manifestieren und progredient entwickeln.¹⁹⁻²¹ Allgemein wird der Nachweis einer klinisch signifikanten autonomen Dysregulation, im Sinne einer Blasenentleerungsstörung oder einer neurogenen orthostatischen Hypotonie, als Zeichen eines atypischen Parkinson-Syndroms, wie der MSA, interpretiert.^{5, 14} In einer prospektiven multizentrischen Studie berichteten 73% der MSA-Patienten von Blasenentleerungsstörungen, 56,7% von orthostatischer Hypotension und 58,2% von Obstipation²². Die gültigen Diagnosekriterien bedingen den klinischen Nachweis von mindestens einer autonomen Funktionsstörung.⁹ Dennoch sind autonome Funktionsstörungen eine häufige Komplikation beim IPS. In einer Multicenter-Studie gaben 35% der IPS-Patienten an, unter Blasenentleerungsstörungen, 27,5% unter Obstipation und 14,2% an orthostaseabhängigen Symptomen zu leiden.²³ Die Symptome der autonomen Dysfunktion sind bei der MSA häufig schwerer ausgeprägt als beim IPS.²⁴ Pathophysiologisch beruht das autonome Versagen bei der MSA auf einer Schädigung der präganglionären, zentralen Neurone, wohingegen beim IPS zusätzlich periphere, postganglionäre Neurone des autonomen Nervensystems degenerieren.^{24, 25} Durch die phänotypische Überlappung zwischen IPS und MSA (siehe Tabelle 1) ist die Diagnosestellung insbesondere im Frühstadium der Erkrankung erschwert. Die endgültige Diagnosesicherung gelingt derzeit ausschließlich durch eine postmortale neuropathologische Untersuchung des zentralen Nervensystems.^{8, 9}

1.1.2 Apparative Diagnostik

Im Frühstadium der Erkrankung trägt eine apparative Zusatzdiagnostik, allen voran bildgebende Methoden, zur Differenzierung der neurodegenerativen Parkinson-Syndrome bei. Die folgenden Ausführungen über die klinisch relevanten bildgebenden Verfahren in der Differenzialdiagnostik von IPS und MSA werden durch die Darstellung in Tabelle 1 unterstützt. Die zerebrale

Kernspintomographie (MRT) dient vor allem dem Ausschluss symptomatischer Ursachen eines Parkinson-Syndroms, wie z. B. subkortikale vaskuläre Läsionen, Normaldruckhydrozephalus oder supratentorielle Tumoren. Darüber hinaus wird auf charakteristische Veränderungen für atypische Parkinson-Syndrome, wie der MSA, geachtet.^{14, 26} Die transkranielle Parenchym-Sonographie des Mittelhirns zeigt bei bis zu 90% der IPS-Patienten eine Hyperechogenität der Substantia nigra, die bei MSA-Patienten überwiegend nicht nachweisbar ist.²⁶

Nuklearmedizinische Verfahren nutzen hoch-selektiv bindende, radioaktiv markierte Tracer zum quantitativen Nachweis einer neuronalen Degeneration. Die präsynaptischen Dopamintransporter der striatalen dopaminergen Neurone werden mittels DaTScan (Ioflupan, ¹²³I-FP-Cit-SPECT) visualisiert. Die Reduktion dieser Neurone ist nicht spezifisch für das IPS und somit ebenfalls nicht zur Differenzierung von neurodegenerativen Parkinson-Syndromen geeignet.²⁷ Iodobenzamid (¹²³I-IBZM) bindet selektiv an postsynaptische D2-Rezeptoren im Bereich des Striatums, deren Reduktion charakteristisch für nicht-idiopathische neurodegenerative Parkinson-Syndrome ist. Jedoch schließt ein unauffälliger Befund die Diagnose einer MSA nicht aus.²⁷

Die Darstellung des cerebralen Glukosemetabolismus mittels Fluoro-Deoxy-Glukose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) zeigt krankheitsspezifische Muster von Hypo- und Hypermetabolismus, die die Differenzialdiagnose von Parkinson-Syndromen mit einer Sensitivität von 95% bei statistikbasierter Auswertung unterstützen.²⁶ Die das IPS kennzeichnende Degeneration postganglionärer sympathischer Neurone kann mittels einer Metaiodobenzylguanidin (¹²³I-MIBG)-Szintigrafie am Herzen dargestellt werden.^{28, 29} IPS-Patienten weisen eine deutliche Minderbelegung des Tracers als Zeichen einer kardialen Denervierung auf.³⁰⁻³² Im Vergleich dazu zeigen MSA-Patienten eine weniger ausgeprägte Reduktion der kardialen ¹²³I-MIBG-Aufnahme.³³⁻³⁶ Allerdings ist der klinische Nutzen dieser Untersuchung aufgrund der vergleichsweise geringen Spezifität von nur 77% in der Routinediagnostik begrenzt.^{27, 36}

Zusammengefasst unterstützen die dargestellten bildgebenden Verfahren die Diagnosefindung, wobei im Einzelfall eine unzureichende Sensitivität und Spezifität die Unterscheidung zwischen IPS und MSA erschwert. Darüber hinaus sind nuklearmedizinische Verfahren mit einer Strahlenexposition für den Patienten, höheren Kosten und einer eingeschränkten Verfügbarkeit verbunden.

Tabelle 1: Gegenüberstellung des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie (eigene Darstellung nach Baldereschi et al.², Bjornsdottir et al.¹⁰, Katzenschlager et al.³⁷, Schrag et al.¹², Wenning et al.¹⁶; Brooks et al.²⁶, Bouwmans et al.³⁸).

	IPS	MSA
Epidemiologische Daten		
Jährliche Inzidenz/ 100.000.	8-18	0,6-3
Häufigstes Erkrankungsalter	Median 60.Lebensjahr Risiko steigt mit zunehmendem Alter	60.-70. Lebensjahr
Mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung	~16 Jahre	~5-8 Jahre
Klinische Präsentation		
Motorische Hauptsymptome	Parkinson-Syndrom	Parkinson-Syndrom und/ oder zerebelläres Syndrom
L-Dopa Responsivität	Vorhanden und gut	Fehlend, bzw. mäßig und vorübergehend
Autonome Dysfunktion	Mild und oftmals im Verlauf	Frühzeitig und schwer, obligat für die Diagnosestellung
Bildgebung		
MRT	Unauffällig	<u>MSA-P</u> : T2-hypointense Putamen-Atrophie mit hyperintensem Randsaum; <u>MSA-C</u> : Hyperintensitäten im Pons („Hot-cross-bun sign“), Atrophie des mittleren Kleinhirnstiels und Zerebellum
Transkranielle Mittelhirn-Sonografie	Typischerweise Hyperechogenität der Substantia nigra	Parenchym überwiegend unverändert
¹²³ I-FP-Cit-SPECT	Präsynaptische Dopamin-Transporter pathologisch vermindert	
¹²³ I-IBZM-SPECT	Unauffällig	Postsynaptische Dopmanin (D2)-Rezeptoren vermindert
¹²³ I-MIBG-SPECT	Traceraufnahme reduziert	Allenfalls milde Reduktion
FDG-PET	Hypermetabolismus im Putamen; Hypometabolismus frontotemporal	Hypometabolismus im Zerebellum, Hirnstamm, Striatum
Neuropathologie		
Neuropathologisches Charakteristikum	LB, LN	GCI
ZANS	+	+
Präganglionäres PANS	+	+
Postganglionäres PANS	+	-
<p>SPECT single photon emission computed tomography; ¹²³I-FP-Cit Ioflupan; ¹²³I-IBZM Iodobenzamid; ¹²³I-MIBG Metaiodobenzylguanidin; <i>FDG-PET</i> Fluoro-Deoxy-Glucose Positronen-Emissionstromografie; <i>LB</i> Lewy bodies; <i>LN</i> Lewy-Neuriten; <i>GCI</i> Gliale zytoplasmatische Einschlusskörperchen; <i>ZANS</i> Zentrales autonomes Nervensystem; <i>PANS</i> Peripheres autonomes Nervensystem. (+) betroffen; (-) nicht betroffen.</p>		

Die Quantifizierung der autonomen Dysfunktion anhand einer standardisierten autonomen Reflextestung (Composite Autonomic Scoring Scale, CASS) unterstützt die Differenzierung zwischen IPS und MSA.³⁹⁻⁴¹ Das autonome Nervensystem ist Teil eines internen Regulationssystems, worüber das Gehirn die für das Überleben essenziellen viszeromotorischen, neuroendokrinen, Schmerz- und Verhaltensantworten kontrolliert.²⁵ Es besteht aus einem zentralen Abschnitt, der u. a. präganglionäre sympathische und parasympathische Neurone kontrolliert, die wiederum über postganglionäre Neurone die autonomen Erfolgsorgane (wie beispielsweise Schweißdrüsen, Haarmuskeln, Blutgefäße der Haut, Herz) ansteuern (siehe Tabelle 2). Die funktionelle Integrität des autonomen Netzwerkes kann durch eine Kombination folgender standardisierter Funktionstests ermittelt werden:

- *Kardiovaskulär*: kontinuierliche nichtinvasive Blutdruck- und Herzfrequenzanalyse während tiefer Atmung (Sinusarrhythmie), Valsalva-Manöver und Kipptisch-Untersuchung
- *Sudomotorisch*: Quantitativer sudomotorischer Axon-Reflex-Test (QSART) zur Schweißmengenmessung nach lokaler Reizung sudomotorischer Nervenfasern mittels perkutaner Acetylcholin-Iontophorese
- *Thermoregulatorisch*: Thermoregulatorischer Schweißtest (TST) zur Ermittlung des Anteils an Anhidrose durch Farbänderung eines Indikatorpulvers an der anterioren Körperoberfläche nach externer Erhöhung der Körpertemperatur.⁴²

Im Vergleich zu den kardiovaskulären Tests ermöglicht die kombinierte Untersuchung mittels TST und QSART eine differenzierte Beurteilung prä- und postganglionärer (sudomotorischer) Funktionen.^{39, 43} Die Ausprägung der Anhidrose im TST stellt den derzeit sensitivsten klinischen Parameter zur Differenzierung der MSA-P vom IPS dar.⁴⁴ Allerdings stehen diese Methoden ausschließlich in wenigen spezialisierten Zentren zur Verfügung^{40, 45}

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Differenzialdiagnose von neurodegenerativen Parkinson-Syndromen anhand von klinischen Kriterien, insbesondere in der Frühphase, nicht ausreichend sicher zu stellen ist. Zusätzliche apparative Methoden erhöhen die differenzialdiagnostische Sicherheit nur unzureichend. Derzeit existiert kein klinischer oder nuklearmedizinischer Marker, der frühzeitig die Diagnose eines IPS sichert und gegenüber atypischen Parkinson-Syndromen, wie der MSA, abgrenzt. Aufgrund des rasch progredienten

Verlaufs, der eingeschränkten therapeutischen Möglichkeiten und der verringerten Lebenserwartung der MSA, ist die frühzeitige und korrekte Diagnosestellung für den Patienten von herausragender Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, einen Beitrag zur Differenzialdiagnostik neurodegenerativer Parkinson-Syndrome zu leisten und ätiopathogenetisch zu untersuchen, ob und wie die sympathische Hautinnervation in den Krankheitsprozess eingebunden ist.

Tabelle 2: Komponenten des zentralen autonomen und peripheren sympathischen Nervensystems (eigene Darstellung nach Benarroch²⁵ und Furness⁴⁶).

Abschnitt	Anatomische Struktur
Zentrales Autonomes Nervensystem	
Telencephalon	<ul style="list-style-type: none"> • Insulärer Kortex • Nucleus centralis der Amygdala
Diencephalon	<ul style="list-style-type: none"> • Hypothalamus
Mesencephalon	<ul style="list-style-type: none"> • Periaquäduktales Grau
Pons	<ul style="list-style-type: none"> • Parabrachialer Komplex
Medulla oblongata	<ul style="list-style-type: none"> • Nuclei tractus solitarii • Ventrolaterale Medulla
Rückenmark	<i>Präganglionäres Neuron</i> <ul style="list-style-type: none"> • Th2-L1 Nucleus intermediolateralis
Peripheres Autonomes Nervensystem	
	<i>Postganglionäres Neuron</i> <ul style="list-style-type: none"> • Truncus sympathicus
	(Plexus)
	↓
	Erfolgsorgan
	Haut (Schweißdrüsen, Blutgefäße, Musculi arrectores pilorum), Herz, viszerale Organe, etc.

1.2 Neuropathologische Aspekte

1.2.1 Lewy body-Erkrankungen

James Parkinson (1755-1824) veröffentlichte 1817 in seinem Buch „An Essay on the Shaking Palsy“ erstmals die Symptome einer Erkrankung, die der französische Psychiater Jean-Martin Charcot (1825-1893) in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts nach Parkinson benannte und so ein weltweit benutztes Eponym für diese Erkrankung schuf.^{3, 47} Im Jahr 1912 entdeckte Fritz Jakob Heinrich Lewy (1885-1950) Einschlusskörperchen in Neuronen des ZNS von Patienten mit Paralysis agitans und zeigte 1923 deren diffuse und kortikale Verteilung.⁴⁸⁻⁵⁰ Konstantin Nikolaevich Tretiakoff (1892-1958) benannte sie 1919 nach ihrem Erstbeschreiber „Lewy bodies“ (LB).⁵¹ Erst 1983 entdeckten Goldmann et al. Neurofilament und Kuzuhara et al. 1988

Ubiquitin als Bestandteile der LB.^{52, 53} Der eigentliche Durchbruch erfolgte 1997, nachdem durch molekulargenetische Untersuchungen eine Substitutionsmutation (A53T) im Gen für α -Synuclein (*SNCA*) erkannt wurde, die in hereditären Parkinson-Erkrankungen nachgewiesen wurde.⁵⁴ Darauf folgende Untersuchungen enthüllten weitere Punktmutationen (A30P, E46K), Triplikation und Duplikation des *SNCA*-Gens - jeweils in Assoziation mit autosomal-dominant vererbter Parkinson-Erkrankung.⁵⁵⁻⁵⁹ 1997 zeigten Spillantini et al., dass das aggregierte Protein α -Synuclein die Hauptkomponente der LB ist, sowohl bei der sporadischen als auch hereditären Form der Parkinson-Erkrankung sowie der Lewy body-Demenz (DLB).^{60, 61} Es existieren zwei Typen von LB: Hirnstamm-LB sind kugelförmig und haben einen eosinophilen hyalinen Kern, der von einem schwach färbenden Schatten umgeben ist. Sie bestehen aus granulärem und fibrillärem Material und vesikulären Strukturen. Hingegen fehlen innerer Kern und Schatten bei kortikalen LB, die eine filamentöse Struktur aufweisen.⁶²⁻⁶⁵ Die Einschlusskörperchen sind weiterhin spindel- oder fadenförmig in den Axonen und Dendriten betroffener Neurone nachweisbar und werden als Lewy-Neuriten (LN) bezeichnet.⁶⁶ Strukturelle Untersuchungen zeigten, dass LB und LN aus unverzweigten α -Synuclein Filamenten von 200-600 nm Länge und 5-10 nm Breite bestehen.⁶⁷

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit IPS als Vertreter der LBD untersucht. Das IPS ist eine Erkrankung, bei der prädisponierte Nervenzellen in spezifischen Regionen des Nervensystems nach einem typischen Muster untergehen.⁶⁸ Das bedeutendste Kennzeichen ist die Degeneration der Dopamin-haltigen Neurone der Substantia nigra pars compacta.⁶⁹ Ferner sind extranigrale Strukturen, wie beispielsweise der Nucleus dorsalis des Nervus glossopharyngeus und der Nervus vagus, involviert, wodurch nichtmotorische Symptome erklärt werden können.⁷⁰ Die neuropathologische Diagnose IPS wird bestätigt, wenn in den betroffenen Neuronen des ZNS die Lewy-Pathologie nachgewiesen wird.⁷¹ Braak et al. untersuchten 2003, in welcher topografischen Reihenfolge LB und LN im ZNS auftreten und erstellten ein Schema bestehend aus 6 Erkrankungsstadien (siehe Tabelle 3).⁶⁸ Dabei entsprechen die Stadien 1-3 der subklinischen Form des IPS und die Stadien 4-6 der klinisch-symptomatischen Form.⁷² Laut Braak et al. beginnt die Erkrankung mit intraneuronalen Läsionen im Nucleus dorsalis des Nervus glossopharyngeus und Nervus vagus und in den anterioren olfaktorischen Strukturen (Stadium 1). Im Stadium 2 treten Einschlusskörperchen zusätzlich in den Hirnstammkernen, inklusive Nucleus raphe magnus und Teile der angrenzenden *Formatio reticularis*, auf. Erste LN werden außerdem im noradrenergen Locus coeruleus gesehen. Im Stadium 3 breiten sich die LB erstmals oberhalb des pontinen Tegmentum bis in die basalen Anteile des Mittel- und

Vorderhirns aus, inklusive einer geringen Beteiligung der Amygdala, des tegmentalen pedunculopontinen Kerns und des Nucleus basalis Meynert. Der Nachweis von LN in der pars compacta der Substantia nigra, ohne einen makroskopischen und mikroskopischen Zellverlust in diesem Stadium, kündigt die Destruktion dieser spezifischen Zellpopulation bei Fortschreiten des Krankheitsprozesses an. Kortikale LN und LB erscheinen erstmals im Stadium 4 im temporalen Mesocortex und zunehmend auch in der Amygdala. Ungefähr in dieser Phase werden motorische Symptome klinisch relevant. Im Stadium 5 werden, ausgehend von den Läsionen im temporalen Mesocortex, zunehmend Anteile des temporalen Neokortex eingebunden. Die Erkrankung erreicht ihre vollständige topographische Ausprägung durch die weitverbreitete kortikale Beteiligung im Stadium 6. Charakteristisch dafür ist die bereits makroskopisch erkennbare bleiche Substantia nigra sowie die Einbeziehung primärer und sekundärer neokortikaler Felder in die Lewy body-Pathologie.⁷² Darüber hinaus werden Fälle mit Nachweis der Lewy-Pathologie jedoch ohne klinisch dokumentierte Parkinson-Erkrankung als inzidentelle Lewy body-Erkrankung (ILBD) benannt. Dabei handelt es sich vermutlich um eine präklinische Form der Lewy body-Erkrankung, bei der die Pathologie die Schwelle zur klinischen Manifestation nicht erreicht hat.⁷³

Das Schema von Braak et al. berücksichtigt nicht, dass α -Synuclein-Einschlusskörperchen im enterischen Nervensystem (ENS) bereits während der asymptomatischen Krankheitsphase auftreten können.⁷⁴ Daraufhin wurde vermutet, dass ein Umweltpathogen die Proteinfehlfaltung induziert, die den unteren Hirnstamm durch retrograden axonalen Transport und transsynaptische Transmission erreicht.⁷⁵ Unmyelinisierte Nervenfasern, wie beispielsweise des ENS oder des präganglionären Nervus vagus, besitzen keine schützende Myelinschicht und gehören deshalb zu den vulnerablen Zellen in LBD.^{75, 76} Diese Hypothese wird gestützt durch den (frühzeitigen) Nachweis der Lewy-Pathologie in den unmyelinisierten postganglionären, sympathischen Nervenfasern des kardialen und pelvinen Plexus, der Speicheldrüsen sowie des Nebennierenmarks und der sympathischen Ganglien.⁷⁷ Obwohl die Hypothese von Braak et al. zunehmend anerkannt wird, sorgt sie auch für kontroverse Diskussionen. Der Grund dafür ist, dass das vorgeschlagene Schema nur auf eine Untergruppe von Parkinson-Patienten mit frühzeitigem Krankheitsbeginn und prolongiertem Verlauf zuzutreffen scheint. Weiterhin scheint das neuropathologisch identifizierte Stadium nicht zwangsläufig mit der klinischen Präsentation übereinzustimmen.^{78, 79} In retrospektiven klinisch-pathologischen Studien wurde gezeigt, dass sich die α -Synuclein-Pathologie bei einem Teil der Patienten nicht nach dem von Braak et al. postuliertem kaudo-rostralen Muster ausbreitete.⁷⁸

Tabelle 3: Schematische Darstellung der aufsteigenden Neurodegeneration beim idiopathischen Parkinson-Syndrom (eigene Darstellung nach Braak et al.⁸⁰).

Stadium	Neuropathologie	Klinik (Motorik)
6	Neokortex	symptomatisch
5	↑ Assoziationsareale des Neokortex	
4	↑ Mesokortex, Thalamus	
	↑ [Schwelle]	
3	Substantia nigra, Amygdala	asymptomatisch
2	↑ Kaudaler Hirnstamm	
1	↑ Nucleus dorsalis n. vagi	

Die autonome Dysfunktion ist neuropathologisch durch die Beteiligung des zentralen und peripheren autonomen Nervensystems zu erklären. Wakabayashi et al. identifizierten Lewy bodies im Hypothalamus, den intermediolateralen Nuclei des thorakalen Rückenmarks, prävertebralen sympathischen Ganglien, den kardialen und pelvinen Plexus sowie in der adrenalen Medulla.^{81, 82}

Zusammengefasst beschränkt sich die pathologische α -Synuclein-Ablagerung als LB und LN und die Neurodegeneration bei der Parkinson-Erkrankung nicht ausschließlich auf Dopamin-spezifische Hirnstamm-Nervenkerne. Vielmehr handelt es sich um eine neurodegenerative Multisystemerkrankung, die multiple Areale des Gehirns und Rückenmarks einbezieht, u.a. zentrale autonome Nervenkerne, präganglionäre und postganglionäre sympathische Neurone.⁷³ Die komplexe Pathogenese, neuropathologische Progression und Entwicklung klinischer Symptome der Erkrankung sind durch ein Staging-System nicht vollständig zu erfassen und bleiben somit weiterhin Thema der aktuellen Forschung.

1.2.2 Multisystematrophie

Der Begriff Multisystematrophie wurde 1969 von Graham und Oppenheimer eingeführt.^{16, 83} Die striatonigralen und olivopontozerebellären Systeme sind makroskopisch am häufigsten und stärksten betroffen. Deshalb wurden vor 1969 die Erkrankungen striatonigrale Degeneration (SND), olivopontozerebelläre Atrophie (OPCA) und Shy-Drager-Syndrom unterschieden.^{16, 71} Erst durch die mikroskopische Identifikation von krankheitsspezifischen,

glialen, zytoplasmatischen Einschlüssen (GCI) in der weißen Substanz des ZNS von MSA-Patienten gelang Papp et al. 1989 der Nachweis, dass die Erkrankungen durch eine identische oligodendrogliale Pathologie gekennzeichnet sind.⁸⁴ GCI sind ca. 5-20µm groß, haben eine Sichel-, Halbmond-, Kegel-, oder Eiform und befinden sich in der Nähe des Zellkerns der oligodendroglialen Zellen.⁸⁴ Ultrastrukturell bestehen sie aus zufällig angeordneten Filamenten und Tubuli. 1998 konnte α -Synuclein als Hauptkomponente der GCI identifiziert werden.⁸⁵ GCI kommen ubiquitär im ZNS von MSA-Erkrankten vor, wobei das pyramidale, extrapyramidale, limbische, kortikozerebelläre System sowie supraspinale autonome System besonders stark involviert sind.⁷¹ Die definitive neuropathologische Diagnose wird gestellt, wenn α -Synuclein-positive GCIs weitverbreitet im ZNS und neurodegenerative Veränderungen in den striatonigralen und olivopontozerebellären Systemen nachgewiesen werden.⁸⁶ In den Schwann-Zellen des PNS wurden die Einschlusskörperchen dagegen nicht beobachtet.⁸⁷ Neben den GCI akkumuliert α -Synuclein in geringer Anzahl in den Nuclei der Oligodendrozyten und neuronal im Zytoplasma, Nuclei und Neuriten.^{88, 89} Für die MSA wurde 2005 von Jellinger et al. ein Staging-Schema erstellt, das anhand einer 3-Punkte-Skala den Schweregrad der OPCA und SND bewertet. Patienten mit überwiegender SND entsprechen klinisch der MSA-P und solchen mit überwiegender OPCA der MSA-C.⁹⁰

Die ausgeprägte autonome Dysfunktion wird durch eine Affektion des zentralen autonomen Nervensystems und der präganglionären autonomen Nervenfasern hervorgerufen.²⁵ Im Einzelnen handelt es sich dabei um eine Neurodegeneration im Nucleus dorsalis des Nervus glossopharyngeus und Nervus vagus, Locus coeruleus, catecholaminerger Neurone der ventrolateralen Medulla und präganglionärer sympathischer Nuclei intermediolaterales des thorakolumbalen Rückenmarks.⁹¹⁻⁹³ Postganglionäre sympathische Nervenfasern scheinen dagegen nicht involviert, wie auch in funktionellen autonomen Tests (Thermoregulatorische Testung und QSART) gezeigt wurde.³⁹ Dennoch wurden vereinzelt pathologische α -Synuclein-Aggregate und LB in sympathischen Ganglien von Patienten mit MSA nachgewiesen.⁹⁴⁻⁹⁶ Dabei ist zu berücksichtigen, dass periphere und zentrale Neurone klinisch gesunder Patienten ebenfalls LB aufweisen und, wie bereits erwähnt, als ILBD gewertet werden.^{96, 97} Eine milde Degeneration myokardialer sympathischer Nervenfasern kann bei MSA auftreten und wird durch eine mögliche transsynaptische Degeneration erklärt.⁹⁶ Darüber hinaus konnten keine Neurodegeneration oder Aggregate von phosphoryliertem α -Synuclein in den postganglionären sympathischen Nervenfasern der Haut nachgewiesen werden.^{98, 99}

Zusammengefasst ist die MSA gekennzeichnet durch das ubiquitäre Vorkommen von pathologischen GCI im ZNS und einer spezifischen Neurodegeneration, die zentrale autonome Zentren einbezieht und eine schwere autonome Dysfunktion hervorruft.

1.3 Die Rolle des phosphorylierten α -Synucleins

Die pathologische Ablagerung von α -Synuclein stellt das histologische Kennzeichen von LBD und MSA dar, weshalb die Erkrankungen zu den α -Synucleinopathien zusammengefasst werden (siehe Tabelle 4).^{100, 101} Das physiologische α -Synuclein ist ein ungefaltetes, kleines, cytosolisches Protein bestehend aus 140 Aminosäuren (siehe Abb. 1).¹⁰² Es ist Mitglied der Familie der Synuclein-Proteine (α -, β -, γ -Synuclein) und bevorzugt in den präsynaptischen Nervenenden, in enger Nachbarschaft synaptischer Vesikel, lokalisiert.¹⁰³ Aufgrund der Lokalisation wird seine Aufgabe bei der Transmitterfreisetzung vermutet, jedoch konnte die exakte physiologische Funktion bisher nicht vollständig entschlüsselt werden.^{104, 105} Alpha-Synuclein ist zu 50% mit synaptischen Membranen assoziiert und liegt zu 50% frei im Zytosol vor. Es wird angenommen, dass physiologisches α -Synuclein die Bildung synaptischer Vesikel aus frühen Endosomen reguliert.¹⁰⁶ Alpha-Synuclein ist deshalb ebenfalls in den Nervenzellen gesunder Gehirne nachweisbar.¹⁰⁷ Interessanterweise wurde 1993 in Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten das sogenannte „Non-A β Component Protein“ (NAC) und dessen Vorläufer „Non-A β Component Protein Precursor“ (NACP) nachgewiesen. Letzteres ist mit α -Synuclein identisch.^{108, 109} 2002 entdeckten Fujiwara et al., dass α -Synuclein bei den neurodegenerativen Erkrankungen LBD und MSA an der Aminosäure Serin 129 phosphoryliert ist.¹¹⁰ Diese Modifikation bewirkt eine Konformationsänderung des Proteins in eine Faltblattstruktur, die - vergleichbar mit Amyloid-Proteinen - eine Aggregation von α -Synuclein hervorrufen kann.¹¹¹

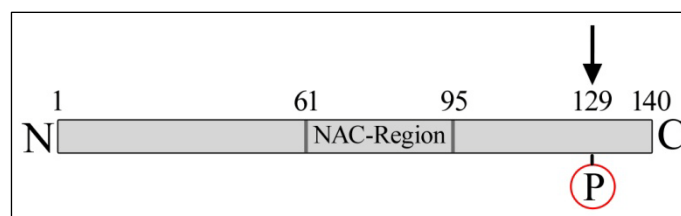


Abb. 1: Schematischer Aufbau von α -Synuclein (eigene Darstellung modifiziert nach Stefanis et al.¹¹²). Non-A β -component of Alzheimer's disease amyloid precursor (NACP) ist homolog zu α -Synuclein.^{103, 109} Alpha-Synuclein besteht aus 140 Aminosäuren. Das pathologische modifizierte α -Synuclein ist an der Aminosäure Serin 129 phosphoryliert. Die sogenannte Non-A β -component (NAC)-Region besteht aus 35 Aminosäuren und ermöglicht die β -Faltblattstruktur von α -Synuclein.¹¹²

Ob die Aggregation die neuronale Degeneration hervorruft, ist aufgrund widersprüchlicher Forschungsergebnisse bisher nicht geklärt.^{113, 114} Bellucci et al. gehen in ihrer Übersichtsarbeit davon aus, dass die α -Synuclein-Anreicherung und -Aggregation die synaptische Funktion durch multiple Mechanismen beeinträchtigt. Dazu zählen beispielsweise die Störung der synaptischen Membran, wodurch proapoptotische Mechanismen aktiviert werden können. Des Weiteren ist aggregiertes α -Synuclein in der Lage, den axonalen antero- und retrograden Transport zu vermindern.⁵⁰ Verallgemeinernd lässt sich festhalten, dass die pathologische Ablagerung von phosphoryliertem α -Synuclein von herausragender Bedeutung für die Pathogenese der Synucleinopathien zu sein scheint. Somit könnte der intravitale Nachweis von pathologisch verändertem α -Synuclein bei unterschiedlicher topografischer Verteilung zur Differenzialdiagnostik innerhalb der Gruppe der Synucleinopathien beitragen.

Tabelle 4: Klassifizierung des idiopathischen Parkinson-Syndroms und der Multisystematrophie innerhalb der α -Synucleinopathien (eigene Darstellung nach Jellinger et al.^{71, 90}).

α -Synucleinopathien					
Lewy body disorders (LBD)			Multisystematrophie (MSA)		
Idiopathisches Parkinson-Syndrom (IPS)	Parkinson-Demenz	Lewy-Körperchen Demenz	striatonigrale Degeneration (SND)	Olivo-ponto-zerebelläre Atrophie (OPCA)	Shy-Drager-Syndrom

In der vorliegenden Arbeit wurden periphere sympathische Nervenfasern von lebenden Patienten neuropathologisch auf phosphoryliertes α -Synuclein untersucht. In der Haut innervieren sympathische Nervenfasern Schweißdrüsen, Haarmuskeln und Arteriolen; zudem ist die Haut von außen einfach zugänglich. Die Hautbiopsie hat sich zur Untersuchung der kleinkalibrigen und unmyelinisierten Nervenfasern bei Verdacht auf Small-fiber-Neuropathie bewährt.¹¹⁵ Sie ist eine wenig invasive Technik, die in Abhängigkeit der Symptome und des klinischen Bildes an jeder beliebigen Körperlokalisierung durchgeführt werden kann.¹¹⁶ Eine Hautnaht ist nicht notwendig, die Heilung geschieht rasch, und es verbleibt in der Regel keine oder eine kaum sichtbare Narbe.¹¹⁶ Epidermale und dermale Nervenfasern der Haut sind mittels des panaxonalen Markers Protein Gene Product 9.5 (PGP 9.5) darstellbar.¹¹⁷ Autonome Nervenfasern können anhand ihrer innervierten Zielstruktur (Schweißdrüse, Haarmuskel und Arteriolen) identifiziert werden. Weiterhin bietet sich die Verwendung funktionsspezifischer immunhistochemischer Marker, wie beispielsweise Tyrosinhydroxylase (TH) oder β -Hydroxylase, an.¹¹⁶ Die Analyse der Haut von Patienten mit LBD und/oder MSA auf phosphoryliertes α -Synuclein wurde in zwei postmortalen und zwei prä-mortalen Studien durchgeführt.^{43, 99, 118, 119} Bisher wurde kein direkter

immunhistochemischer Vergleich von in vivo Hautbiopsien von Patienten mit LBD und MSA durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, über in vivo morphologische Untersuchungen der Haut Informationen zur Expression funktionell relevanter Proteine zu erhalten, die im ZNS charakteristisch für den Krankheitsprozess sind bzw. an seiner Pathogenese in zentraler Weise beteiligt sind. Die Identifikation, quantitative Zuordnung und das Muster der Expression der Proteine in einem gefahrlos zugänglichen Organ wie der Haut, könnten eine diagnostische Möglichkeit sein, die verschiedenen Synucleinopathien wie das IPS und die MSA voneinander zu unterscheiden.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Während die neuropathologischen Veränderungen bei MSA vorwiegend zentrale (autonome Nervenkerne des Hirnstamms) und präganglionäre Neurone (Nucleus intermediolateralis des Rückenmarks) betreffen¹²⁰, sind beim IPS sowohl ZNS, als auch peripher ENS und ANS betroffen.⁸² Demzufolge wird vermutet, dass die α -Synuclein-Pathologie in postganglionären sympathischen Nervenfasern der Haut bei LBD - im Gegensatz zu MSA - nachweisbar ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die diagnostische Relevanz von phosphoryliertem α -Synuclein in dermalen Nervenstrukturen verschiedener Synucleinopathien zu überprüfen.

Im Einzelnen sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Lassen sich pathologische Ablagerungen von phosphoryliertem α -Synuclein in den sympathischen Nervenfasern der Haut von LBD-Patienten nachweisen?
 - Mithilfe des monoklonalen Antikörpers gegen phosphoryliertes α -Synuclein (PSyn) sollen die sympathischen Nervenfasern der Haut auf pathologische α -Synuclein-Ablagerungen untersucht werden. In einem zweiten Schritt soll die PSyn-Immunoreaktivität semiquantitativ erfasst werden.
- Ist die dermale autonome Innervation bei LBD gegenüber der bei MSA reduziert?
 - Es soll anhand eines semiquantitativen Scores das dermale Innervationsmuster für PGP 9.5, ein panaxonaler Neuronen-Marker und TH, zum Nachweis adrenerger sympathischer Nervenfasern, erfasst werden. Durch die semiquantitative Bewertung sollen mögliche Unterschiede bei LBD und MSA-Patienten, sowie bei nicht neurodegenerativ erkrankten Kontrollpersonen (Patienten mit essenziellem Tremor (ET)) analysiert werden.
 - Anhand einer Regressionsanalyse soll der Einfluss des Alters auf die Innervation der autonomen Hautstrukturen, angezeigt durch PGP 9.5, untersucht werden
- Führt der Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein zu einer Degeneration sympathischer Nervenfasern?
 - Anhand einer Korrelationsanalyse sollen die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen PGP 9.5- und PSyn-Immunoreaktivität überprüft werden

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenrekrutierung und Studieneinschluss

Für diese prospektive Studie wurden Patienten der Ambulanz für Bewegungsstörungen der Neurologischen Poliklinik der Charité (Campus Virchow-Klinikum) in einem Zeitraum von Januar bis Mai 2010 gescreent. Die Rekrutierung umfasste drei Patientengruppen: Patienten mit der klinischen Diagnose eines IPS mit einem Schweregrad bis Hoehn/Yahr-Stadium 3 (definiert im Medikamenten-off), Patienten mit der klinischen Diagnose einer wahrscheinlichen / möglichen MSA und Patienten mit der klinischen Diagnose eines ET, die als Kontrollgruppe untersucht wurden (siehe Tabellen 5 bis 7). Das Mindestalter bei Studieneinschluss wurde, in Anlehnung an die Diagnosekriterien der MSA, übereinstimmend für die drei Gruppen auf die Vollendung des 30. Lebensjahres festgelegt. Um eine möglichst hohe diagnostische Sicherheit zu gewährleisten, wurde die Rekrutierung auf Patienten begrenzt, bei denen die klinische Diagnostik durch die nachfolgend genannten nuklearmedizinische Untersuchungen erweitert wurde. Die ^{123}I -FP-CIT erfolgte zum Nachweis eines neurodegenerativ bedingten dopaminergen Defizits.¹²¹ Das erzeugte Bild zeigt die Verteilung des „spezifischen uptake“ des Tracers im Striatum und des „nicht spezifischen uptake“ im gesamten Cortex. Die „Specific binding ratio“ (SR) ist definiert als Verhältnis zwischen den Konzentrationen der spezifischen zur nicht spezifisch gebundenen Radioaktivität im Striatum.²⁷ Die SR des Putamens kontralateral zur betroffenen Seite wurde für die Auswertung herangezogen. Die kardiale ^{123}I -MIBG-Szintigraphie untersucht die postganglionäre sympathische Innervation des Herzens. Hierfür wurde der Quotient aus den Counts per Pixel einer vom Untersucher festgelegten Region im Bereich des Myokards und einer Referenzregion im Mediastinum vier Stunden post-injectionem bestimmt (Heart/Mediastinum ratio; H/M ratio). Der Wert spiegelt die aktive neuronale Aufnahme des Noradrenalin-Analogen ^{123}I -MIBG in die sympathischen Nervenendigungen am Herzen wider.¹²² Patienten mit Begleiterkrankungen, die potenziell das autonome Nervensystem betreffen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Im Verlauf wurde die Diagnose klinisch bei Wiedervorstellung in der Ambulanz oder anamnestisch durch telefonische Nachfrage überprüft. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin genehmigt (EA 2/133/09). Jeder Patient wurde umfassend mündlich und schriftlich über Ablauf, Bedeutung und mögliche Risiken der Untersuchungen aufgeklärt. Alle Patienten willigten schriftlich zur Teilnahme an der Studie ein.

Tabelle 5: Klinische Diagnosekriterien für das idiopathische Parkinson-Syndrom (übersetzt nach Gibb et al.⁵, mit freundlicher Genehmigung der BMJ Publishing Group Ltd.)

UK Parkinson's Disease Society Brain Bank – Klinische Diagnosekriterien		
Schritt 1: Diagnose eines Parkinson-Syndroms		
Bradykinese Verlangsamung der Initiierung willkürlicher Bewegungen mit einer progressiven Geschwindigkeitsabnahme und Amplitude repetitiver Bewegungen	<i>UND</i>	Mindestens eines der folgenden Zeichen: <ul style="list-style-type: none"> - Muskulärer Rigor - Ruhetremor 4-6 Hz - Posturale Instabilität (nicht verursacht durch primär visuelle, zerebelläre oder propriozeptive Dysfunktion)
Schritt 2: Ausschlusskriterien für ein idiopathisches Parkinson-Syndrom		
<ul style="list-style-type: none"> - Anamnese wiederholter zerebraler Infarkte mit schrittweiser Progression der Parkinson-Symptome - Anamnese rezidivierender Schädel-Hirn-Traumata - Anamnese einer Enzephalitis - Okulogyre Krisen - Neuroleptika-Therapie bei Symptombeginn - Mehr als ein betroffener Verwandter - Anhaltende Remission - Ausschließlich unilaterale Symptomausprägung nach 3 Jahren - Supranukleäre Blickparese - Zerebelläre Zeichen - Frühzeitig schwere autonome Beteiligung - Frühzeitig Demenz mit Störung des Gedächtnisses, der Sprache und der Praxis - Babinski-Zeichen - Präsenz eines cerebralen Tumors oder Hydrocephalus communicans im CT - Fehlendes Ansprechen auf hohe L-Dopa Dosen (nach ausgeschlossener Malabsorption) - 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP)-Exposition 		
Schritt 3: Supportive prospektive Zeichen für ein idiopathisches Parkinson-Syndrom		
(≥3 Zeichen werden für die Diagnose eines sicheren idiopathischen Parkinson-Syndroms benötigt)		
<ul style="list-style-type: none"> - Unilateraler Beginn - Ruhetremor nachweisbar - Progressive Erkrankung - Persistierende Asymmetrie auf der Seite des Symptombeginns - Exzellente L-Dopa Response - Schwere Levodopa-induzierte choreatische Bewegungsstörung - Levodopa Response für mehr als 5 Jahre - Klinischer Verlauf ≥10 Jahre 		

Tabelle 6: Klinische Diagnosekriterien für die Multisystematrophie (übersetzt nach Gilman et al.⁹⁾

Die Multisystematrophie ist eine sporadische, progressive und nach dem 30. Lebensjahr beginnende Erkrankung.		
Wahrscheinliche MSA:		
<p>Autonomes Versagen: Harninkontinenz (Unzureichende Miktionskontrolle mit erektiler Dysfunktion bei Männern) <i>ODER</i> Orthostatischer Blutdruckabfall von mindestens 30 mmHg systolisch oder 15 mmHg diastolisch innerhalb von 3-minütigem Stehen</p>	<i>UND</i>	<p>Gering Levodopa-responsives Parkinson-Syndrom (Bradykinese, assoziiert mit Rigor, Tremor oder posturaler Instabilität) <i>ODER</i> Zerebelläres Syndrom (Gangataxie mit zerebellärer Dysarthrie, Extremitätenataxie oder zerebellärer okulomotorischer Dysfunktion)</p>
Mögliche MSA:		
<p>Parkinson-Syndrom (Bradykinese, assoziiert mit Rigor, Tremor oder posturaler Instabilität) <i>ODER</i> Zerebelläres Syndrom (Gangataxie mit zerebellärer Dysarthrie, Extremitätenataxie oder zerebellärer okulomotorischer Dysfunktion)</p>	<i>UND</i>	<p>Mindestens ein Kriterium für eine autonome Dysfunktion (anderweitig nicht erklärbarer Harndrang, Pollakisurie, unvollständige Blasenentleerung) <i>UND</i> Mindestens eins der folgenden Kriterien: <u>Mögliche MSA-P oder MSA-C</u> - Babinski-Zeichen mit Hyperreflexie - Stridor <u>Mögliche MSA-P</u> - Rasch progredientes Parkinson-Syndrom - Geringe Levodopa Response - Posturale Instabilität innerhalb von 3 Jahren nach Beginn der motorischen Symptomatik - Gangataxie, zerebelläre Dysarthrie, Extremitätenataxie oder zerebelläre okulomotorische Dysfunktion - Dysphagie innerhalb von 5 Jahren nach motorischem Symptombeginn - MRT: Atrophie des Putamens, der mittleren zerebellären Pedunculi, des Pons oder des Zerebellums - FDG-PET: Hypometabolismus im Putamen, Hirnstamm oder Cerebellum <u>Mögliche MSA-C</u> - Parkinsonismus (Bradykinese und Rigor) - MRT: Atrophie von Putamen, mittlerer zerebellärer Pedunculi oder Pons - FDG-PET: Hypometabolismus im Putamen - Präsynaptische nigrostriatale dopaminerge Denervation im SPECT oder PET</p>

Tabelle 7: Darstellung der Ein- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Vollendung des 30. Lebensjahres	ausgeprägte periphere Polyneuropathie (klinische und/oder elektrophysiologische Hinweise)
kardiale ¹²³ I-MIBG-Szintigraphie <u>und</u> ¹²³ I-FP-CIT Untersuchung vorliegend oder in Folge geplant	Kongestive Herzerkrankung, Myokardinfarkt <6 Monate zurückliegend, auffälliger Befund im Herzkatheter oder ^{99m} Tc Sestamibi Scan
Eines der drei folgenden Kriterien:	Chronische Erkrankungen die potentiell das ZNS betreffen, z.B. Diabetes mellitus Typ I und II, schwere Anämie, Alkoholismus, maligne Neoplasie, Hypothyroidismus, Sympathektomie, zerebrovaskuläre Ereignisse (TIA, PRIND, stroke), Exposition von Neurotoxinen
Diagnose eines IPS: Erfüllung der U.K. Parkinson's Disease Society Brain Bank clinical diagnostic criteria ^{5,6} mit einem Schweregrad bis Hoehn&Yahr 3 (definiert im Medikamenten-off)	
Diagnose einer mögliche oder wahrscheinliche MSA: Erfüllung der Konsensus-Diagnosekriterien nach Gilman et al. ^{9,120}	
Diagnose eines ET: Erfüllung der Kernkriterien nach Deuschl et al. ¹²³	
	Gleichzeitige Therapie mit Anticholinergika, α - und β -adrenergen Agonisten/Antagonisten oder Medikamenten, die das autonome Nervensystem beeinträchtigen
	Demenz, MMST \leq 24 Punkten

2.1.2 Klinische Untersuchung

Die Durchführung der Studie fand im Neurological Clinical Research Center (NCRC) der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Campus Mitte) statt. Zur klinischen Objektivierung des Schweregrades der Erkrankung wurden die Patienten unter Verwendung krankheitsspezifischer Skalen untersucht. Für Parkinson-Patienten wurde Teil III der Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) und das Hoehn&Yahr Staging und für MSA-Patienten Teil II der Unified MSA Rating Scale (UMSARS) angewendet.

Die Autonome Reflextestung

Zur Erfassung der kardiovagalen (Herzfrequenzvariabilität oder „Heart rate response to deep breathing“ (HRDB), Herzfrequenz-Reaktion auf Valsalva-Manöver) und adrenergen Funktion (Blutdruck-Reaktion auf Valsalva-Manöver und passive Orthostase) wurde eine autonome Reflextestung durchgeführt. Anhand der alters- und geschlechtsabhängigen Composite Autonomic Scoring Scale (CASS) wurden die Subscores für die kardiovagale (CASS_v, range 0-3) und adrenerge Funktion (CASS_a, range 0-4) offline berechnet (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9).^{41,124}

Tabelle 8: Formeln zur Berechnung der kardiovagalen und adrenergen Parameter.

Kardiovagale Funktion - Herzfrequenzanalyse	Adrenerge Funktion - Blutdruckanalyse
Tiefe Atmung	Valsalva Manöver
$HRDB = (3 \times HF_{\text{Inspiration}} - HF_{\text{Expiration}}) / 3$	$MAP = (2 \times RR_{\text{diastolisch}} + RR_{\text{systolisch}}) / 2$ $\Delta MAP = MAP_{\text{Phase II}_{\text{früh}}} - MAP_{\text{Baseline}}$ $\text{Pulsdruck} = RR_{\text{systolisch}} - RR_{\text{diastolisch}}$ $\text{Pulsdruck-Reduktion} = \text{Pulsdruck}_{\text{Baseline}} / \text{Pulsdruck}_{\text{Phase II}_{\text{früh}}}$
Valsalva-Manöver	Kipptisch-Untersuchung
$\text{Valsalva ratio} = \text{Kürzestes R-R-Intervall}_{\text{Phase II}} / \text{Längstes R-R-Intervall}_{\text{Phase IV}}$	$\text{Blutdruckabfall} = \text{Blutdruck}_{\text{systolisch}}(\text{Baseline}) - \text{Blutdruck-Minimum}_{\text{systolisch}}(60^\circ)$
<i>HRDB</i> Herzfrequenzvariabilität; <i>MAP</i> Mittlerer Arterieller Blutdruck; <i>HF</i> Herzfrequenz.	

In Vorbereitung der autonomen Reflextestung wurden alle kreislaufwirksamen Medikamente mindestens für das fünffache ihrer Halbwertszeit pausiert. Die Untersuchung erfolgte nach einer mindestens dreistündigen Nahrungskarenz in einem ruhigen, temperaturregulierten Raum, in liegender Position. Die Herzfrequenz wurde durch die Ableitung eines 3-Kanal-EKGs erfasst. Der arterielle Blutdruck wurde mittels Finger-Photoplethysmographie (Finometer® Midi, FMS, Amsterdam, Niederlande) kontinuierlich gemessen und durch ein automatisches Blutdruckmessgerät (Dinamap® Pro Series 2000, Critikon Company LLC, Tampa, Mexiko) am kontralateralen Oberarm intermittierend kontrolliert. Die kardiovaskulären Daten wurden durch einen Analog-Digital-Wandler (DI 720 series und DI-205-C, DATAQ Instruments, Inc, Akron, OH, USA) und der entsprechenden Software (WinDAQ, DATAQ Instruments, Inc, Akron, OH, USA) digitalisiert (Auflösung 14 bit, Frequenz 500Hz).

Der Test der tiefen Atmung

Nach einer Ruhephase von 10 Minuten wurde der Patient aufgefordert, für 90 Sekunden tief ein- und auszuatmen. Die Frequenz von 6 Atemzyklen pro Minute wurde mündlich vorgegeben. Die HRDB wurde aus dem Mittelwert der maximalen Herzfrequenz bei Inspiration und der minimalen Frequenz bei Expiration während drei Atemzyklen berechnet. Der individuelle Wert wurde mit alters- und geschlechtsspezifischen Normwerten (5. und 95. Perzentile) verglichen.¹²⁵

Das Valsalva-Manöver

In Vorbereitung auf das Manöver wurde von einer 10 ml Spritze der Kolben entfernt und mit einer Kanüle ein Loch von ca. 1mm Durchmesser in der Nähe der Düse gebohrt. Die Düse wurde mit dem Schlauch eines Sphygmomanometers (von einem Blutdruckmessgerät) verbunden. Der Patient wurde aufgefordert, nach tiefer Inspiration das Endstück der Spritze mit den Lippen

luftdicht zu verschließen und für 15 Sekunden forciert auszuatmen (40mmHg). Der tatsächliche Widerstand wurde mit Hilfe des Sphygmomanometers verifiziert, um eine standardisierte Auswertung zu ermöglichen. Nach einer Pause von 2 Minuten wurde der Test wiederholt, bis zwei reproduzierbare Ergebnisse vorlagen.

Tabelle 9: Berechnung der Composite Autonomic Scoring Scale-Subscores (übersetzt nach Schrezenmaier et al.¹²⁴, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier).

Cardiovagaler Subscore
<ol style="list-style-type: none"> 1. HRDB gering reduziert, jedoch >50% des Minimums 2. HRDB reduziert auf <50% des Minimums 3. Sowohl HRDB als auch VR reduziert auf <50% des Minimums
Adrenerger Subscore
<p>Der adrenerge Subscore basiert auf den erschlag-abhängigen Blutdruck-Veränderungen während des VM und der Kipptisch-Untersuchung. Ein Score von 1 wird vergeben, wenn eine der nachfolgend genannten Veränderungen im VM auftreten:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Phase II_e Reduktion des MAP >20 mm Hg, jedoch <40 mm Hg ODER b. Phase II_e erreicht nicht die Baseline ODER c. Pulsdruck-Reduktion auf <50% der Baseline <p>Falls das VM normal ist, kann ein Score von 1 vergeben werden, wenn eine der folgenden Veränderungen in der Kipptisch-Untersuchung auftreten:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Exzessive Oszillationen des MAP (>20 mm Hg, während mindestens 50% der Zeit in aufrechter Position) b. Pulsdruckreduktion auf <50% der Baseline c. Transienter Abfall des systolischen Blutdrucks >20 mm Hg mit Erholung innerhalb der ersten Minute d. Systolische Blutdruck-Reduktion >20 mm Hg nach 1 Minute e. Diastolische Blutdruck-Reduktion >10 mm Hg nach 1 minute f. Overshoot des systolischen Blutdrucks >20 mm Hg “at tilt back” <p>Ein Score von 2 wird vergeben, wenn der Abfall des MAP in der Phase II_e des VM >40 mm Hg beträgt. Falls ein Score von 1 im VM bestimmt wurde, kann er auf 2 angehoben werden, wenn eine der folgenden Veränderungen während der Kipptisch-Untersuchung auftreten:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Transienter systolischer Blutdruckabfall >30 mm Hg mit Erholung innerhalb von 2 Minuten b. Systolische Blutdruck-Reduktion >20 mm Hg nach 1 Minute c. Diastolischer Blutdruckabfall >10 mm Hg nach 1 Minute <p>Ein Score von 3 wird vergeben, wenn eine der folgenden Veränderungen im VM auftritt:</p> <ol style="list-style-type: none"> a. Phase II_e Reduktion des MAP >40 mmHg plus fehlende Phase III and IV <p>Ein zusätzlicher Punkt wird vergeben, wenn die Reduktion des manuellen Blutdrucks >30 mm Hg nach 2 Minuten auftritt und für mindestens 2 Minuten in aufrechter Position während der Kipptisch-untersuchung besteht.</p>
<p><i>HRDB</i> Herzfrequenzvariabilität; <i>MAP</i> mittlerer arterieller Blutdruck; <i>VM</i> Valsalva Manöver; <i>VR</i> Valsalva ratio</p>

Die Kipptisch-Untersuchung

Die kardiovaskuläre Orthostasereaktion wurde durch einen passiven Stehversuch mit Hilfe eines elektrischen Kipptisches (KT-1ß60/EE, AGA Sanitätsartikel GmbH, Löhne, Deutschland) von horizontal (0°) bis auf 60° ermöglicht. Zum Schutz vor einem Sturz infolge einer Synkope wurde in Höhe der Kniegelenke ein Gurt angelegt, der Patient hinsichtlich präsynkopaler Symptome regelmäßig befragt und Herzfrequenz und Blutdruck (Finger-Photoplethysmographie) kontinuierlich überwacht. Nach einer Ruhephase von zehn Minuten wurde der Patient innerhalb von ca. 15 Sekunden auf 60° aufgerichtet und der Blutdruck intermittierend nach 1, 2, 4, 6, 8, und 10 Minuten gemessen (sphygmanometrische Blutdruckmessung am Oberarm). Danach wurde der Kipptisch zurück in die Ausgangsposition gefahren und der Blutdruck letztmalig nach zwei Minuten erfasst.

2.2 Gewebe

2.2.1 Entnahmetechnik und Aufarbeitung

Die Hautprobenentnahme erfolgte am volaren Unterarm des liegenden Patienten, da für dieses gut zugängliche Areal eine hohe Schweißdrüsendichte beschrieben worden ist.¹²⁶ Dazu wurde (nach gründlicher alkoholischer Desinfektion und Beachtung der Einwirkungszeit von 30 Sekunden) das Entnahmeareal mittels subkutaner Injektion von 2 prozentigem Lidocain (Lidocain-HCl 2 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) lokal anästhesiert. Die Hautproben wurden mit einer runden 3 mm durchmessenden Hautstanze (Acupunch, Acuderm, Ft. Lauderdale, Fla, USA) entnommen und anschließend in einem 2 ml Eppendorf-Gefäß in neutralem, 4 % gepuffertem Formaldehyd (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland) immersionsfixiert. Die Formalinfixierung dient einerseits der Erhaltung des Gewebes, insbesondere zum Schutz vor Zersetzung und anderen Modifikationen, und führt andererseits zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur verschiedener Proteine.¹²⁷ Die Fixierung dauerte zwischen 24 Stunden und 2 Wochen. Die weitere Probenverarbeitung erfolgte im Institut für Neuropathologie am Campus Mitte der Charité.

Zur Aufrechterhaltung der Gewebestabilität wurden die fixierten Proben in Paraffin eingebettet. Dazu durchliefen die Proben in einem Gewebeeinbett-Automat (Shandon Excelsior™ ES Tissue Processor, Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA) eine aufsteigende Alkoholreihe zur Gewebeentwässerung (siehe Tabelle 10). Am nächsten Tag wurden die entwässerten Proben in ein Metallschälchen platziert und an der Ausguss-Station (Shandon Histocentre™ 3,

Thermo Fisher Scientific, Kalamazoo, MI, USA) in 3 Durchgängen mit flüssigem Wachs übergossen. Anschließend erfolgte eine Trocknungsphase von je 2 Stunden. Von den Paraffinblöcken wurden mithilfe eines Mikrotoms 3µm Gewebeschnitte angefertigt und auf einem beschrifteten (Patienten-ID, Primärantikörper) Adhäsions-Glasobjektträger (Super Frost Plus Objektträger, R. Langenbrink Labor-Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht. Pro Patient wurde ein Paraffinschnitt mittels Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE) gefärbt, um während der Untersuchung der immunhistochemisch angefärbten Präparate die morphologische Orientierung innerhalb des Schnittbildes zu erleichtern.

Tabelle 10: Auflistung der Lösungen und Einwirkzeit der aufsteigenden Alkoholreihe.

Schritt	Alkohol	Dauer (Anzahl x Stunden)
1	Ethanol 70%	1 x 1
2	Ethanol 80%	1 x 1
3	Ethanol 96%	2 x 1
4	Ethanol 100%	3 x 1
5	Xylol	1 x 1,5

2.2.2 Immunhistochemie

Für die immunhistochemische Untersuchung wurden Serienschnitte gefärbt und eine repräsentative Schnittprobe ausgewertet. Die Grundlage der Immunhistochemie stellt eine Antigen-Antikörper-Reaktion dar, wodurch spezifische Strukturen nachgewiesen werden können. Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Antigen und kann anschließend direkt, indirekt oder durch einen Enzym-Immunglobulin-Komplex nachgewiesen werden.¹²⁷ Damit der Primärantikörper das Gewebe durchdringen und das entsprechende Antigen erkennen kann, bedarf es der Entparaffinierung. Dazu wurde das Wachs bei 75°C und 76°C für je 4 Minuten geschmolzen und zwischen den Schritten durch eine Oberflächenspannung-mindernde Detergenzienlösung (EZ Prep Concentrate) aus dem Gewebe herausgelöst und durch mehrere Waschschrte entfernt. Eine vorverdünnte Eindecklösung (Liquid Coverslip, LCS) schützte das Präparat vor der Austrocknung.

Als Folge der Formalinfixierung können die Epitope und/oder elektrostatischen Ladungen des Antigens so verändert werden, dass diese nicht mehr vom Antikörper erkannt werden können.¹²⁷ Zur Epitopfreilegung bedarf es einer Antigendemaskierung. In der vorliegenden Arbeit wurde die des Herstellers empfohlene Methode angewandt. Für Anti-PGP 9.5 und Anti-TH gelang dies durch die Heat-Induced-Epitop-Retrieval-Methode (HIER) unter Verwendung eines

Tris-basierten Puffers mit leicht erhöhtem pH (Cell Conditioning Solution, CC1). Dieser ist in der Lage, bei höheren Temperaturen, in diesem Fall 95°C und 100°C, die sekundär durch die Formalin-Einwirkung entstandenen kovalenten Bindungen im Gewebe zu hydrolysieren, wodurch die Proteinstruktur teilweise wieder hergestellt und die Aufnahmefähigkeit für die Primärantikörper erhöht wird. Bei Anti-PSyn diente eine Endopeptidase (Protease 1) zur enzymatischen Spaltung von Proteinen, mit dem Ziel der Erhöhung der Immunreaktivität.¹²⁸

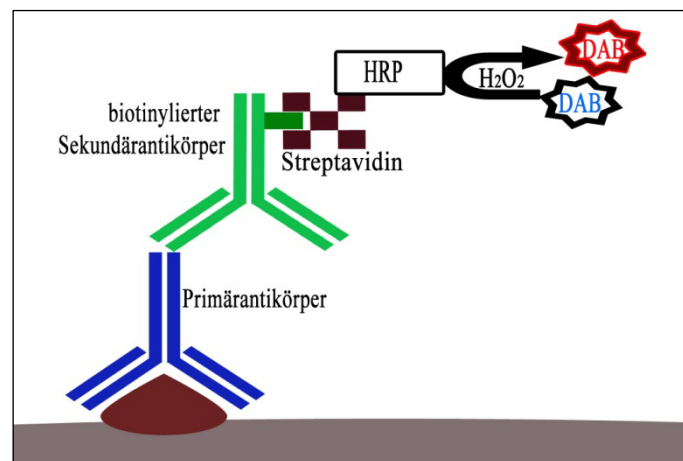


Abb. 2: Indirekter Antikörpernachweis unter Anwendung der Labeled Streptavidin-Biotin Methode (eigene Abbildung modifiziert nach der Produktinformation des iView DAB Detection Kits). Der Primärantikörper bindet an das nachzuweisende Antigen. Dieser wird durch den Sekundärantikörper erkannt. Dessen Biotin-Komponente wird wiederum durch Streptavidin, gekoppelt an die Meerrettich-Peroxidase (HRP), erkannt. Letztere katalysiert die Oxidation von 3', 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid. DAB wird nun als braunes Präzipitat sichtbar.

Der Primärantikörper wurde in einer Lösung (Antibody Diluent, Ventana) entsprechend der im Labor etablierten Verdünnung gelöst (siehe Tabelle 9). Von dem Verdünnungsmedium wurden 100µl per Hand auf die Schnittprobe aufgetragen und für 32 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit konnte der Antikörper an das Zielantigen binden. Anschließend erfolgte ein Spülvorgang mit einer 10fach vorverdünnten Pufferlösung (Reaction Buffer Concentrate), die die Reaktion stoppte und ungebundene Chemikalien entfernte.

Zur Detektion des Primärantikörpers wurde in der vorliegenden Arbeit die Labeled Streptavidin-Biotin (LSAB) Methode angewandt (siehe Abb. 2). Dabei handelt es sich um eine Technik zum indirekten Antigen-Nachweis mittels eines sekundären biotinylierten Antikörpers (iVIEW Biotinylated Ig Secondary Antibody, Ziege-Anti-Maus-IgG- und IgM und Ziege Anti-Kaninchen IgG). Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper während einer 8-minütigen

Inkubationszeit. Im nächsten Schritt wurde eine konjugierte Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Lösung (iVIEW SA-HRP) hinzugefügt, welche an die Biotinkomponente des Sekundärantikörpers anknüpft. Nach Hinzufügen der Substrat-Chromogenlösung (0,04-0,08%igem Wasserstoffperoxid (iVIEW H₂O₂) und Diaminobenzidin (DAB)), erfolgte eine 8-minütige Inkubationszeit zur Spaltung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und atomarem Sauerstoff unter Oxidation von DAB. Letzteres wurde als braunes Präzipitat sichtbar. Zur Intensivierung der Färbung wurde Kupfersulfat (iVIEW Copper) aufgetragen und für 4 Minuten inkubiert. Danach wurde eine Gegenfärbung mit Hematoxylin und eine blaue Nach-Gegenfärbung (Bluing reagent, Ventana) aufgetragen und jeweils für 4 Minuten inkubiert. Dies diente der Verbesserung der Unterscheidung von Gewebestrukturen im histologischen Schnittbild. Zuletzt wurde ausgiebig mit Reaktionspuffer gespült.

Der gesamte Färbeprozess, inklusive Entparaffinierung und Antigendemaskierung, wurde am Färbeautomaten Benchmark und Benchmark XT der Firma Ventana Medical Systems (Ventana, Tucson, AZ, USA) unter Verwendung der firmenspezifischen Reagenzien und des iVIEW DAB Detection Kits (Ventana) zur Antikörper-Visualisierung angewandt. Die Glasobjektträger wurden nach Barcode-Beschriftung in die entsprechende Halterung des Färbeautomaten eingelegt. Am Computer wurde der Protokolleditor NexES v9.30 (Ventana) aufgerufen und das entsprechende Färbeprogramm des Autoimmunostainers ausgewählt. Anschließend wurde der beschriebene Vorgang gestartet und mit Ausnahme des Handauftrags des Primärantikörpers automatisch durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte automatisch die Auftragung von Liquid Coverslip zum Schutz vor Evaporation. Nach Ende der Inkubationszeit der iVIEW-Komponenten erfolgte jeweils ein Spülvorgang mit Reaktionspuffer.

Als Primärantikörper kamen polyklonale und monoklonale Immunglobuline der Klasse G zum Einsatz (siehe Tabelle 11). Polyklonale Antikörper entstehen durch verschiedene B-Zell Klone nach Immunisierung des Tieres mit dem entsprechenden Antigen. Daraus resultiert, dass sie gegen verschiedene Epitope des gleichen Antigens gerichtet sind. Monoklonale Antikörper dagegen sind gegen ein einziges Epitop gerichtet und entstehen durch einen isolierten B-Zell-Klon aus der Milz eines zuvor immunisierten Tieres, der mit Myelomzellen fusioniert wird und in einer Zellkultur Antikörper bildet.¹²⁷ Bei allen drei Antikörpern wurden Negativkontrollen unter Ausschluss des Primärantikörpers durchgeführt, um die Spezifität der angewandten Antikörperfärbung zu sichern (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Charakterisierung der Primärantikörper (eigene Darstellung basierend auf den Produktinformationen der Antikörper).

Antikörper	PGP 9.5	TH	PSyn
Herkunft	Kaninchen	Maus	Maus
Klonalität	Polyklonal	Monoklonal	Monoklonal
Antigen / Epitop	unbekannt	N-Terminale Region der Tyrosinhydroxylase	Aminosäuresequenz 124-134 inklusive Phospho-Serin (129) von α -Synuclein ¹²⁹
Verdünnung	1:100	1:100	1:1000
Hersteller	Milipore Corporation, Billerica, MA, USA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland	Wako, Tokyo, Japan
Positivkontrolle	Nervenfaszikel	Nebenniere	ZNS-Gewebe einer Patientin mit gesicherter Multisystematrophie
Negativkontrolle	Auslassen des Primärantikörpers		
<i>PGP 9.5</i> Proteine-Gene Product 9.5; <i>TH</i> Tyrosinhydroxylase; <i>PSyn</i> Phosphoryliertes α -Synuclein.			

Phosphoryliertes α -Synuclein

Alpha-Synuclein ist ein regulärer Bestandteil der präsynaptischen Strukturen und in seiner pathologischen Form an Serin 129 phosphoryliert. Phosphoryliertes α -Synuclein akkumuliert in LB, LN und glialen cytoplasmatischen Einschlüssen.¹¹⁰ Das Gen *SNCA* ist auf dem Chromosom 4 (4q21) lokalisiert.¹³⁰ Der monoklonale Antikörper PSyn erkennt spezifisch die Region, die Phospho-Serin 129 enthält. Das beste Färbe-Ergebnis kann bei paraformaldehydfixiertem Gewebe oder formalinfixiertem Gewebe erreicht werden. Eine Hintergrundfärbung und Färbung normaler präsynaptischer Strukturen wird im Gegensatz zur α -Synuclein Antikörperfärbung nicht produziert.¹²⁹ Als Positiv-Kontrolle wurde ZNS-Gewebe einer Patientin mit klinisch und neuropathologisch gesicherter Multisystematrophie verwendet (siehe Abb. 3).

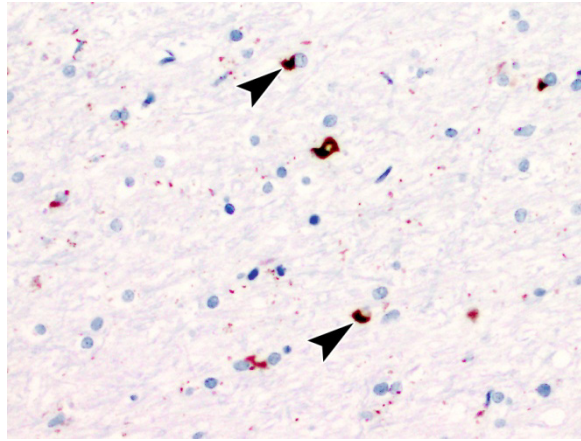


Abb. 3: Positiv-Kontrolle für Anti-phosphoryliertes α -Synuclein: ZNS-Gewebe einer Patientin mit gesicherter Multisystematrophie. Die Pfeile zeigen Oligodendrozyten mit typischen glialen zytoplasmatischen Einschlüssen (GCI) von phosphoryliertem α -Synuclein. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: 100-fach.

Protein Gene Product 9.5

1981 wurde PGP 9.5 erstmals von Jackson and Thompson als neuronenspezifisches Protein unbekannter Funktion beschrieben.¹³¹ Es handelt sich um ein Enzym (Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (UCH-L1)) der Familie der Peptidasen C12, welches die Peptidbindung am C-terminalen Ende von Glycin in Ubiquitin hydrolysiert.¹³² Das Gen befindet sich auf Chromosom 4 (4p14) und wird in den Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems sowie in neuroendokrinen Zellen exprimiert.¹³² Anti-PGP 9.5 visualisiert sowohl sensorische, als auch autonome Nervenfasern in Epidermis und Dermis und ist im Vergleich zu anderen neuronalen Markern, wie Neuronenspezifische Enolase (NSE), Neurofilament (NF), Calcitonin-gene-related peptide (CGRP), Vasoactive-intestinal polypeptide (VIP), Neuropeptid Y (NPY) und Synaptophysin in der Lage, eine höhere Anzahl immunreaktiver Nervenfasern in der Haut nachzuweisen.^{117, 133} In der vorliegenden Arbeit dienten kutane Nervenfaszikel als interne Kontrollstruktur.

Tyrosinhydroxylase

Die Tyrosinhydroxylase hydroxyliert im initialen Schritt der Katecholamin-Synthese L-Tyrosin zu L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) in katecholaminergen Neuronen im Gehirn und Rückenmark, in chromaffinen und entero-chromaffinen Systemen sowie in sympathischen Nervenfasern. In weiteren enzymatisch katalysierten Schritten können die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin gebildet werden. Das Gen ist auf Chromosom 11 (11p15.5) lokalisiert.¹³⁴ Der Antikörper ist dazu geeignet, autonome Nervenfasern der

Schweißdrüsen, Blutgefäße und Nervenfaserbündel in der Haut nachzuweisen.^{135, 136} Als positive Kontrolle diente Gewebe der Nebenniere.

2.2.3 Morphologische Analyse

Die autonome Innervation der Zielstrukturen ekkrine Schweißdrüsen (Endstück und Ausführungsgang), kutane arterielle Gefäße und glatter Haarmuskel wurden von mindestens zwei Untersuchern (L.Z.; W.S.) durch ein Mikroskop (BX 50 Microscopem Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) identifiziert und das Färbemuster der Immunhistochemie analysiert.

Die komplexe Innervation der Haut besteht aus einem afferenten Schenkel sensorischer myelinisierter und unmyelinisierter Nervenfasern (verantwortlich für die Perzeption von Schmerz, Temperatur, Vibration und Juckreiz) sowie einem autonomen Schenkel efferenter, unmyelinisierter Fasern (siehe Abb. 4).¹³⁷ Letztere stellen die peripheren Endigungen paravertebraler sympathischer ganglionärer Neurone dar. Sie regulieren die kutane Vasomotorik, Schweißsekretion und Piloerektion durch Innervation der kleinen Arterien, ekkrinen Schweißdrüsen und Haarmuskeln.¹³⁷

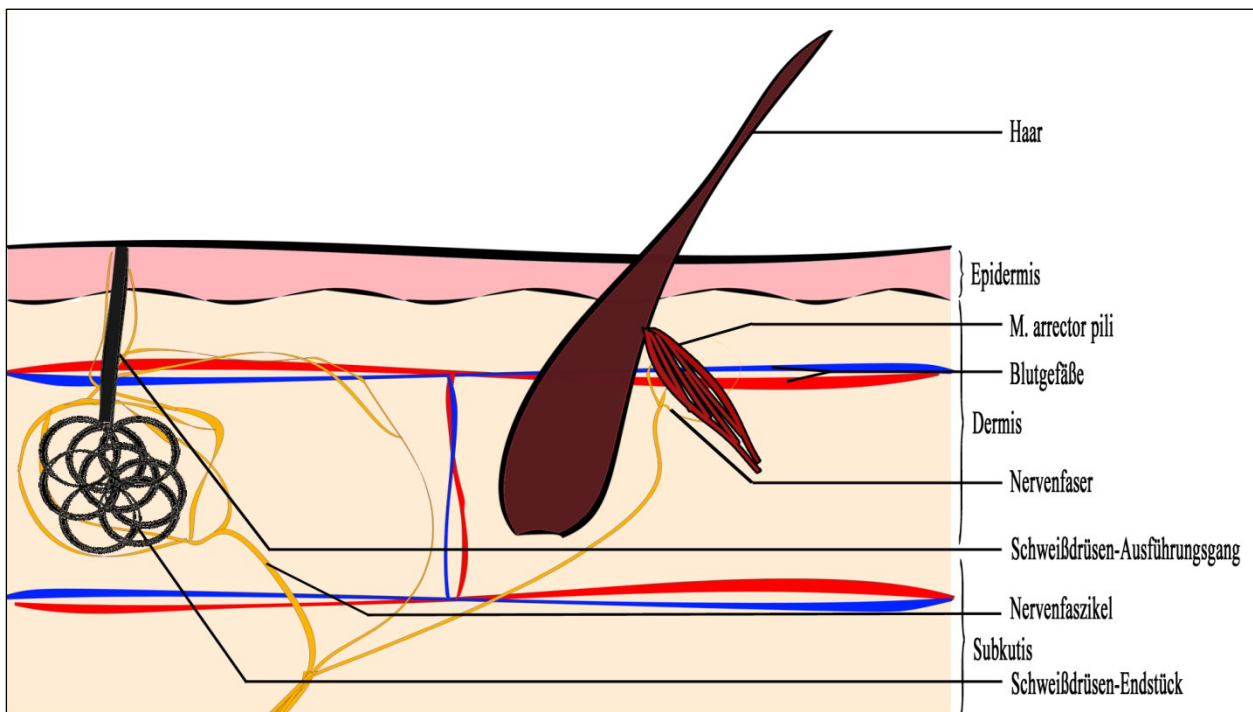


Abb. 4: Schematischer Querschnitt der Haut (eigene Darstellung nach Kanitakis et al.¹³⁷).

Die Haut besteht aus Epidermis, Dermis und Subkutis. Die Hautelemente Schweißdrüse, Haarmuskel und Blutgefäße (Arteriolen) werden von postganglionären sympathischen Nervenfasern innerviert.

Ekrine Schweißdrüsen

Die ekkrine Schweißdrüse besteht aus einem unverzweigten Tubulussystem, welches aus einem geknäult verlaufenden sekretorischen Endstück und einem exkretorischen Ausführungsgang besteht. Obwohl sie mit der epidermalen Oberfläche verbunden ist, befindet sich der Großteil hauptsächlich in der Dermis und Hypodermis (Subkutis). Der Schweiß wird im Endstück von Drüsenepithelzellen durch die Sekretion von Wasser und Elektrolyten produziert und ins Lumen abgegeben. Daneben existieren weitere Drüsenepithelzellen mit PAS-positiven Mukopolysacchariden, deren Rolle bisher nicht eindeutig geklärt ist (siehe Abb. 5). Die sekretorischen Zellen werden peripher von cholinerg innervierten Myoepithelzellen umgeben. Der Schweiß gelangt unter Rückresorption von Natrium im Ausführungsgang, der aus zweischichtigem kubischen Epithel aufgebaut ist, an die Hautoberfläche.¹³⁷ Jede Schweißdrüse wird von mehreren unmyelinisierten Nervenfasern versorgt. Diese verzweigen sich in feine Axone, die einzeln oder in Bündeln von 2-5 Axonen das Endstück umringen. Der Ausführungsgang dagegen wird spärlicher von 1 oder 2 longitudinal dazu verlaufenden Axonen versorgt.¹³⁸ Universell besteht die Annahme, dass Schweißdrüsen, als Ausnahme zur sonst noradrenergen Innervation, durch postganglionäre cholinerge Neurone sympathisch innerviert werden. Die Annahme einer funktionalen dualen Innervation kam zu Beginn der 50er Jahre auf, als Schwitzen durch sowohl cholinerge als auch adrenerge Substanzen induziert werden konnte.^{139, 140} Erst im Jahre 2005 gelang Weihe et al. der neurochemische Nachweis einer Co-Transmission von Acetylcholin und Noradrenalin bei der sympathischen Innervation der Schweißdrüsen und kutanen arterio-venösen Anastomosen (Hoyer-Grosser-Organ).¹⁴¹ Die durchschnittliche Dichte ekkriner Schweißdrüsen beträgt an den volaren Fingern 350/cm², am ventralen Unterarm 159/cm² und am Abdomen 141-82/cm² Haut.¹²⁶

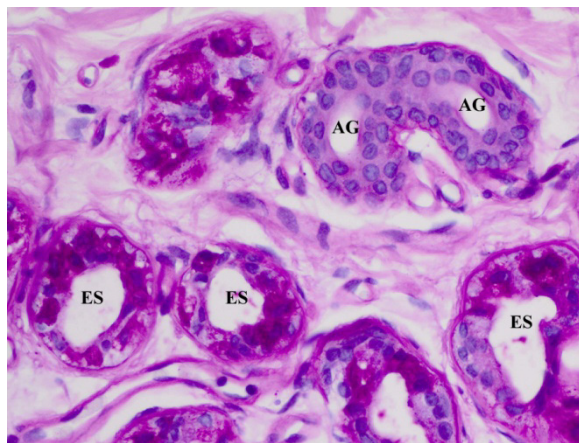


Abb. 5: Histologischer Querschnitt einer ekkrinen Schweißdrüse. Die Endstücke (ES) besitzen ein einschichtiges, ein- bis zweireihiges Epithel und weisen einen hohen Mukopolysaccharid-Gehalt auf (starke Färbung). Die Ausführungsgänge (AG) sind weniger stark gefärbt und bestehen aus einem zweischichtigem kubischen Epithel. Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS). Vergrößerung: 400-fach.

Kutane arterielle Gefäße

In der Dermis regulieren Arterien und Arteriolen (<0,03mm) die Durchblutung der Haut. Sie können leicht anhand ihres runden Lumens und dem typischen Aufbau aus Intima, Media und Adventitia identifiziert werden. Die Intima besteht aus endothelialen Zellen, die Media aus Schichten glatter Muskelzellen und die Adventitia aus Bindegewebe.¹³⁷ Die Vasokonstriktion kutaner Arterien wird über noradrenerge postganglionäre sympathische Fasern vermittelt.¹⁴²

Musculus arrector pili

Dieser glatte Muskel entspringt innerhalb der Dermis und hat seinen Ansatz am Haarfollikel, sodass seine Kontraktion zum Aufrichten des Haares führt.¹³⁷ Die Innervation ist noradrenerg vermittelt.¹⁴²

Nicht in jedem Präparat konnten trotz Analyse auf mindestens zwei verschiedenen Schichttiefen alle drei genannten autonomen Zielstrukturen detektiert werden. Im ersten Untersuchungsdurchgang erfolgte eine Analyse auf Anfärbbarkeit des Materials. Die Proben wurden positiv bewertet, wenn ein Färbemuster an den beschriebenen Strukturen identifiziert werden konnte. War dies nicht der Fall, galt die Probe als negativ. Außerdem wurde die Farbintensität berücksichtigt. Dabei fiel auf, dass diese für TH und PGP 9.5 annähernd gleich stark und für PSyn deutlich schwächer ausgeprägt war. Anhand dieser Information wurde unabhängig für jeden Antikörper eine semiquantitative Ordinalskala erstellt (siehe Tabelle 12).

In einem weiteren Untersuchungsdurchgang wurden die im Schnittbild detektierten sympathisch-innervierten Hautelemente für jeden Antikörper anhand des semiquantitativen Scores bewertet. Wenn in einer Schnittprobe zwei verschiedene Färbemuster zu detektieren waren, wurde der Mittelwert der Scores gebildet.

Tabelle 12: Semiquantitative Bewertung für das Färbemuster der Antikörper-Immunoreaktivität. Aufgrund der visuell schwächeren Anfärbbarkeit für phosphoryliertes α -Synuclein, wurde ein 3-Punkte Score verwendet, im Gegensatz zu Protein Gene Product 9.5 und Tyrosinhydroxylase (jeweils 4-Punkte-Score).

Grad der pathologischen α -Synuclein Ablagerung	Färbemuster phosphoryliertes α -Synuclein
0	Fehlende Markierung
0,5	Geringe Markierung
1	Starke Markierung

Grad der Nervenfaserninnervation	Färbemuster Protein Gene Product 9.5
0	Fehlende Markierung
1	Geringe Markierung
2	Mittelstarke Markierung
3	Starke Markierung

Grad der sympathischen Innervation	Färbemuster Tyrosinhydroxylase
0	Fehlende Markierung
1	Geringe Markierung
2	Mittelstarke Markierung
3	Starke Markierung

Nervenfaszikel enthalten sensorische afferente und autonome efferente Nervenfasern. Da in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf der autonomen Innervation lag, wurden Nervenfaszikel nicht in die statistische Auswertung einbezogen. Weiterhin wurde versucht, das Färbemuster der drei autonomen Strukturen mit Hilfe eines Wertes zu charakterisieren und anhand dessen den Grad der Denervation autonomer Hautstrukturen zu bestimmen. Dazu wurde eine Ratio gebildet, die das Verhältnis aus der Summe der Scores der detektierten Strukturen an der insgesamt möglichen Anfärbbarkeit widerspiegelt (Total PSyn, Total PGP 9.5, Total TH; in Prozent):

$$\text{Total PSyn} = \frac{\sum \text{Score Anti - PSyn [ES + AG + Art + Map]}}{1 \times \text{Anzahl bewerteter Strukturen}} \times 100 \%$$

$$\text{Total PGP 9.5} = \frac{\sum \text{Score Anti - PGP9.5 [ES + AG + Art + Map]}}{3 \times \text{Anzahl bewerteter Strukturen}} \times 100 \%$$

$$\text{Total TH} = \frac{\sum \text{Score TH - PSyn [ES + AG + Art + Map]}}{3 \times \text{Anzahl bewerteter Strukturen}} \times 100 \%$$

2.3 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software IBM[®] SPSS[®] Statistics, Version 21.0.0.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) erstellt. Zur grafischen Darstellung wurden die Softwares Prism 5 for Windows, Version 5.02 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA, Microsoft[®] Office Excel[®] 2007 (©Microsoft Corporation 2008, Redmond, WA, USA) und Adobe[®] Photoshop[®] CS3 Extended Version 10.0 (Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA) genutzt.

Unter Verwendung der Analyse von Häufigkeiten wurde zunächst die Normalverteilung innerhalb der 3 Stichproben überprüft und im Falle eines Schiefegrades zwischen -1 und +1 die Normalverteilung angenommen. Lag der Wert der Schiefe außerhalb dieses Wertebereichs, wurden nachfolgende Tests für nichtparametrische Daten durchgeführt. Zur Überprüfung der Nullhypothese, dass sich die Gruppenmittelwerte/die mittleren Rangzahlen nicht unterscheiden, wurde für parametrische Daten (BMI, Follow-Up; Δ SBP; H/M-ratio; SR_{contra}) die einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) und für nichtparametrische Daten (Alter, CASSv; CASSa; PGP 9.5 und TH-Immunoreaktivität) der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Im Falle einer Ablehnung der Nullhypothese wurde ein Post-hoc Test (Tukey's Multiple Comparison Test für parametrische Daten, paarweise Vergleiche nach Dunn für nichtparametrische Daten) durchgeführt, um zu prüfen, welche Gruppen sich unterscheiden. Zum Vergleich der Erkrankungsdauer der neurodegenerativen Erkrankungen MSA und LBD wurde für nichtparametrische Daten der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Die klinischen Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) dargestellt. Bei den neuropathologischen Scores handelte es sich um ordinalskalierte Daten, weshalb Median und Interquartilsabstand angegeben sind. Um einen Vergleich der Daten zu vorhandenen Studien zu gewährleisten, wurden MW \pm SD für TH und PGP 9.5 zusätzlich dargestellt. Für die Auswertung der PSyn-Immunoreaktivität wurden in einem ersten Schritt die kategorisierten Ergebnisse verwendet (positiv \geq 0,5, negativ=0). Sobald eines der bewerteten autonomen Hautelemente (Schweißdrüse, Arterie oder Haarmuskel) eine positive Immunoreaktivität zeigte, wurde der Fall positiv bewertet. Zur Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen PSyn-Expression und Erkrankung wurde der Exakte Test nach Fischer ausgeführt. Wie beschrieben, wurde in einem zweiten Schritt manuell die Ratio für Total PSyn, Total PGP 9.5 und Total TH berechnet und die Daten aufgrund der Herkunft aus semiquantitativen Scores als Median mit Interquartilsabstand angegeben. Die Analyse der PGP 9.5-Immunoreaktivität der Schweißdrüsenanteile ES und AG innerhalb eines

Schnittbildes wurde mittels des Vorzeichenrangtests von Wilcoxon für verbundene Stichproben durchgeführt. Die Regressionsanalyse wurde zur Abschätzung des Einflusses des Alters auf die PGP 9.5-Immunoreaktivität der Haut eingesetzt. Mittels der Korrelationsanalyse nach Spearman für Rangdaten wurde die Wechselbeziehung zwischen den Antikörpern (anhand ihrer Totalwerte) sowie zu klinischen Parametern überprüft. Das Signifikanzniveau wurde wie üblich bei $\alpha=0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Patienten

Insgesamt wurden 31 Patienten rekrutiert, von denen 26 Patienten zur Entnahme der Hautbiopsie einwilligten. Bei 9 Patienten wurde klinisch die Diagnose eines IPS (LBD) gestellt. Von 11 eingeschlossenen Patienten mit MSA wurden 8 als MSA-P und 3 als MSA-C identifiziert. Ein Patient (#24) mit der initialen Diagnose einer möglichen MSA-P zeigte während der Studie eine grenzwertige autonome Dysfunktion, die im klinischen Follow-up nicht progredient war. In Zusammenschau der für ein IPS typischen nuklearmedizinischen Befunde, des gering progredienten klinischen Verlaufs und der fehlenden Progression autonomer Symptome wurde bei diesem Patienten die Diagnose MSA revidiert und die Diagnose einer LBD gestellt. Sechs Patienten mit der klinischen Diagnose eines ET willigten zur Hautbiopsie ein. Zwei Patienten führten in Folge der Untersuchung keinen DaTScan (#10 und #29) durch. Eine Nachbeobachtung war bei 3 ET-Patienten (#6, #9, #13) und 1 LBD-Patient (#12) nicht möglich.

3.2 Diagnostisch relevante Daten

Patienten mit LBD waren durchschnittlich älter als Patienten mit MSA und ET, wobei dieser Unterschied nicht signifikant war (siehe Tabelle 13). Die Krankheitsdauer betrug bei ET-Patienten im Mittel 14,7 Jahre. Die Erkrankungsdauer der neurodegenerativen Erkrankungen MSA und LBD war deutlich kürzer, jedoch untereinander nicht signifikant verschieden ($4,1 \pm 2,1$ Jahre vs. $5,9 \pm 4,3$ Jahre; $p=0,436$). Der klinische Schweregrad der LBD-Patienten lag bei einem Hoehn&Yahr Score von $2,0 \pm 0,9$ und einem UPDRS Teil III von $24,8 \pm 9,2$ von 108 möglichen Punkten. Der klinische Schweregrad von Patienten mit MSA betrug $33,0 \pm 7,4$ von 56 Punkten, gemessen anhand der UMSARS. Die funktionelle Untersuchung des autonomen Nervensystems war bei vier Patienten nur eingeschränkt auswertbar (#7: Ventrikuläre Extrasystolen; #15: Pacemaker; #27: tiefe Atmung unzureichend; #12: Valsalva-Manöver unzureichend). Die autonome Funktionstestung ergab, im Vergleich zu ET- und LBD-Patienten, bei Erkrankten mit MSA einen signifikant erhöhten adrenergen CASS (MSA 2,0; LBD und ET je 1,0 Punkt; Kruskal-Wallis-Test $p=0,001$; Paarweiser Vergleich: ET vs. MSA $p=0,005$ und LBD vs. MSA $p=0,008$) und einen signifikanten Blutdruckabfall in der Kipptischuntersuchung (MSA $-29,3 \pm 18,5$ mmHg; LBD $-3,5 \pm 13,5$ mmHg; ET $6,8 \pm 14,9$ mmHg; One-way ANOVA $p<0,001$; Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA $p=0,005$ und ET vs. LBD $p=0,008$). Mittels FP-CIT-SPECT war bei den neurodegenerativen Erkrankungen eine deutliche Affektion der

nigrostriatalen Transmission im kontralateralen Putamen, im Vergleich zu Patienten mit ET sichtbar (SR_{contra} MSA $0,56 \pm 0,29$; LBD $0,69 \pm 0,27$; ET $2,27 \pm 0,32$; One-way ANOVA $p < 0,001$, Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA und ET vs. LBD je $p < 0,001$). Die H/M-ratio 4 Stunden nach Injektion von ^{123}I -MIBG lag im Mittel bei Patienten mit ET mit $2,33 \pm 0,45$ im Normbereich, bei MSA im Grenzwertbereich ($1,65 \pm 0,32$) und war bei LBD ($1,54 \pm 0,69$) reduziert (One-way ANOVA $p = 0,002$, Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA $p = 0,009$ und ET vs. LBD $p = 0,002$).

Tabelle 13: Diagnostisch relevante klinische und nuklearmedizinische Daten der Patientenkollektive.

Parameter	Einheit	ET	MSA	LBD	p-Wert
Epidemiologische Daten					
Anzahl	-	6	10	10	
Alter	Jahre	$62,0 \pm 10,8$	$60,5 \pm 11,0$	$69,60 \pm 8,8$	0,252
Geschlechter	W:M	2:4	3:7	3:7	-
BMI	Kg/m^2	$25,89 \pm 4,50$	$24,13 \pm 4,45$	$24,74 \pm 4,43$	0,748
Krankheitsdauer	Jahre	$14,7 \pm 11,8$	$4,1 \pm 2,1$	$5,9 \pm 4,3$	$0,436^\dagger$
Follow-up ††	Monate	$35,3 \pm 4,0$	$22,8 \pm 15,5$	$26,4 \pm 13,1$	0,396
Klinische Scores					
UPDRS (III)	Punkte	-	-	$24,8 \pm 9,2$	-
Hoehn&Yahr	Punkte	-	-	$2,0 \pm 0,9$	-
UMSARS (II)	Punkte	-	$33,0 \pm 7,5$	-	-
Autonome Funktionstestung					
Median CASSv ‡	Punkte	0,0	0,0	0,0	0,262
Median CASSa ‡‡	Punkte	1,0	2,0	1,0	0,001**
ΔSBP	mmHg	$6,8 \pm 14,9$	$-29,3 \pm 18,5$	$-3,5 \pm 13,5$	$< 0,001^{***}$
Nuklearmedizin					
SR_{contra} ‡‡‡	-	$2,27 \pm 0,32$	$0,56 \pm 0,29$	$0,69 \pm 0,27$	$< 0,001^{***}$
H/M-ratio	-	$2,33 \pm 0,45$	$1,65 \pm 0,32$	$1,54 \pm 0,43$	0,002**
Post-hoc Analyse :					
CASSa : Paarweiser Vergleich : ET vs. MSA $p = 0,005^{**}$ und LBD vs. MSA $p = 0,008^{**}$					
SBP: Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA $p = 0,001^*$ und LBD vs. MSA $p = 0,004^{**}$					
SR_{contra} : Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA und ET vs. LBD je $p < 0,001^{***}$					
H/M-ratio: Tukey's post-Hoc Test: ET vs. MSA $p = 0,009^{**}$ und ET vs. LBD $p = 0,002^{**}$					
Mittelwert \pm Standardabweichung.					
†: Mann-Whitney-U Test (MSA vs. LBD). ††: n(ET)=3; n(LBD)=9.					
‡: n(MSA) =9; n(LBD)=8. ‡‡: n (LBD)=9. ‡‡‡: n(MSA)=8					
UPDRS (III) Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III; UMSARS (II) Unified Multiple System Atrophy Rating Scale part II; CASSv/a Composite Autonomic Scoring Scale vagal/adrenerg; SBP maximaler Blutdruckabfall innerhalb von 10 Minuten passiver Orthostase; SR_{contra} Specific Ratio des Putamen kontralateral zur klinisch stärker betroffenen Seite; H/M-ratio Heart-Mediastinum-ratio.					

3.3 Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein

PSyn imponierte als fein-körnige Markierung auf Nervenfasern. PSyn-Immunoreaktivität war im Nervengeflecht von LBD-Patienten bei 7 von 10 detektierten Endstücken (siehe Abb. 6), 3 von 3 detektierten *M. arrector pili* und 8 von 10 detektierten Arteriolen sichtbar (siehe Abb. 8 A und B). In den dermalen Nervenfaszikeln war die PSyn-Färbung bei 1 der 7 LBD-Patienten und 1 von 5 ET-Patienten vorhanden (Abb. 9). Im Nervenplexus der Ausführungsgänge war keine PSyn-Immunoreaktivität zu identifizieren. Die Nervenfasern der Schweißdrüse, des Haarmuskels und der Gefäßwand von Patienten mit ET und MSA zeigten keine PSyn-Markierung (siehe Abb. 7 und Abb. 8 C-F). Bei allen Patienten mit LBD wurde eine PSyn-Immunoreaktivität in den autonomen Nervenfasern in mindestens einem der sympathisch innervierten dermalen Hautgebilde (Schweißdrüse, Haarmuskel, Arteriole) belegt, wohingegen diese Zielstrukturen bei Patienten mit ET und MSA hinsichtlich der PSyn-Färbung unauffällig waren (siehe Abb. 10). Somit gibt es statistisch signifikante Anzeichen dafür, dass zwischen der zugrunde liegenden Erkrankung und dem Nachweis einer PSyn-Immunoreaktivität dermalen autonomer Nervenfasern ein Zusammenhang besteht (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Relation zwischen dem Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein und der zugrunde liegenden Erkrankung.

PSyn-Immunoreaktivität	ET n=6	MSA n=10	LBD n=10	Exakter Test nach Fischer
ES	0 [6]	0 [10]	7 [10]	13,66***
Map	0 [2]	0 [9]	3 [3]	10,33***
Art	0 [6]	0 [10]	8 [10]	17,19***
Anzahl der Strukturen mit positiver PSyn-Immunoreaktivität [Anzahl der Patienten mit Nachweis der Hautstruktur im Schnittbild]. <i>ET</i> Essenzieller Tremor; <i>MSA</i> Multisystematrophie; <i>LBD</i> Lewy body-Erkrankung ; <i>ES</i> Endstück; <i>Art</i> Arteriole; <i>Map</i> Musculus arrector pili. ***p<0,001.				

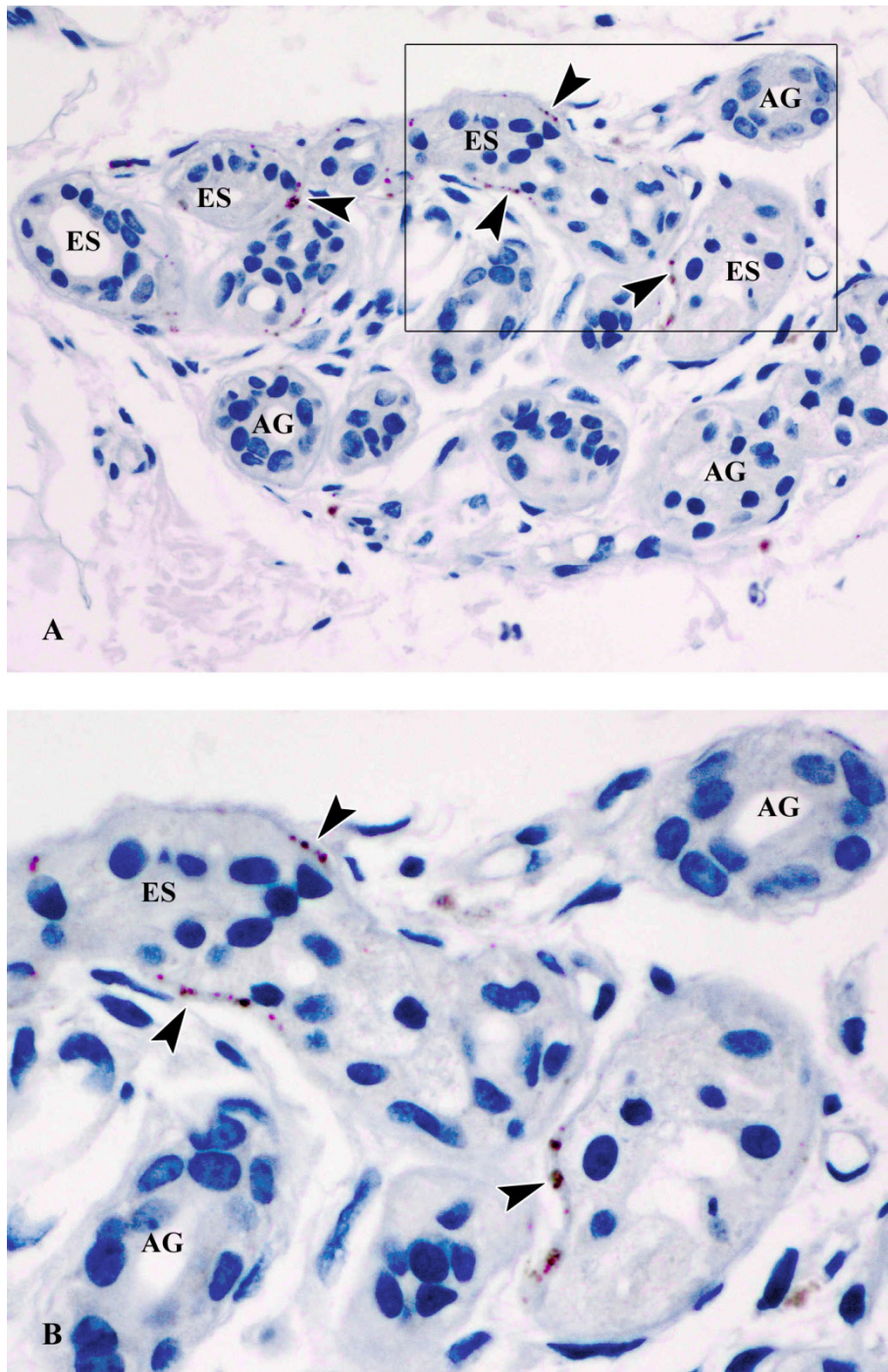


Abb. 6: Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in den sympathischen Nervenfasern der Schweißdrüsen bei Lewy body-Erkrankung. (A, B) An den Schweißdrüsen-Endstücken (ES) zeigt sich eine punktförmige Immunoreaktivität (braun-violett) für phosphoryliertes α -Synuclein in den versorgenden sympathischen Nervenfasern. An den Ausführungsgängen (AG) ist keine Immunoreaktivität sichtbar. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A) 200-fach, (B) Vergrößerung des Kastens aus (A) 400-fach.

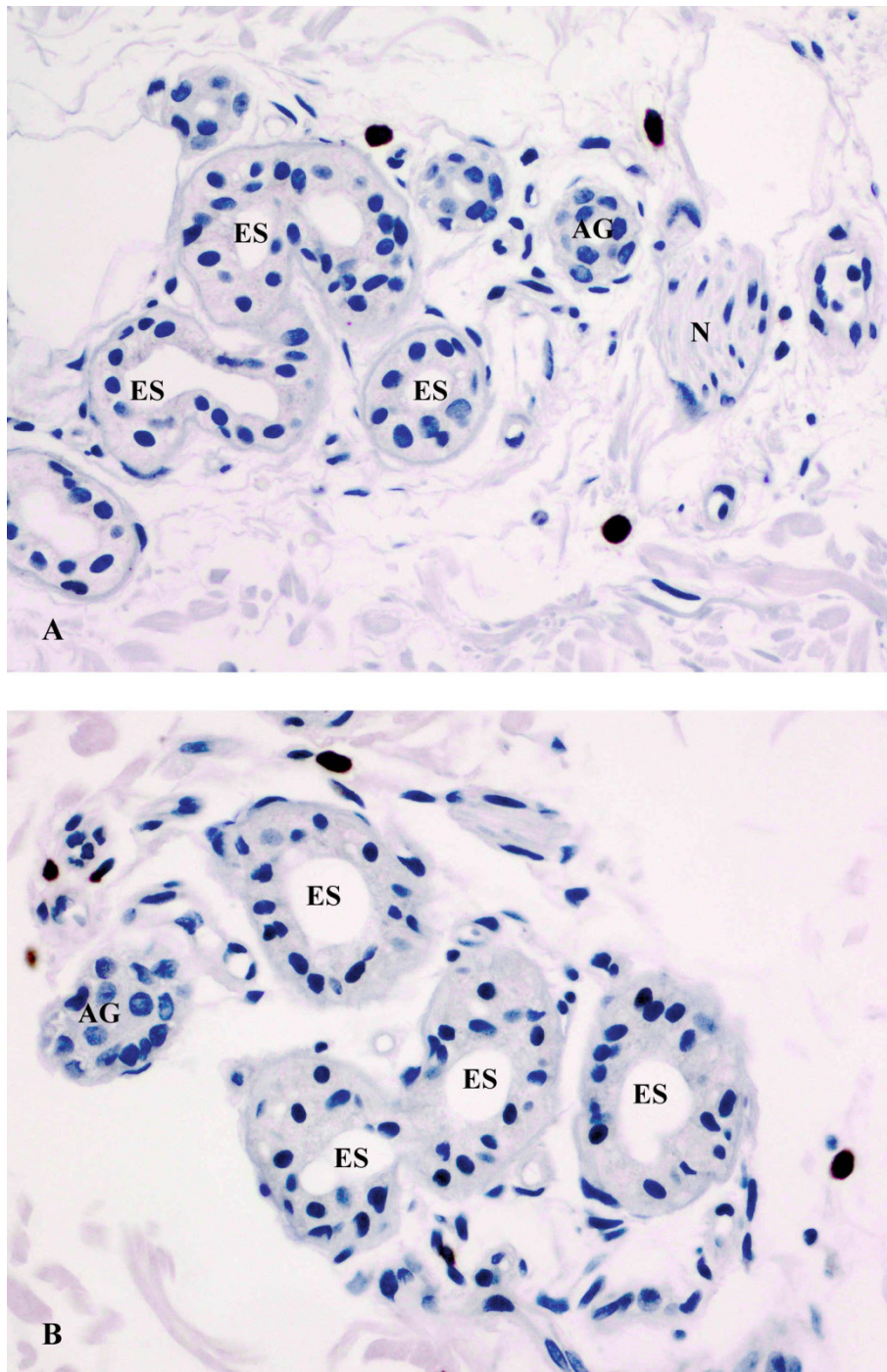


Abb. 7: Unauffällige immunhistochemische Färbung der Schweißdrüse mit phosphoryliertem α -Synuclein bei Multisystematrophie und essenziellem Tremor. Kein Nachweis einer Immunoreaktivität für phosphoryliertes α -Synuclein in den Endstücken (ES) und Ausführungsgängen (AG) bei Patienten mit Multisystematrophie (A) und essenziellem Tremor (B). Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: 400-fach.

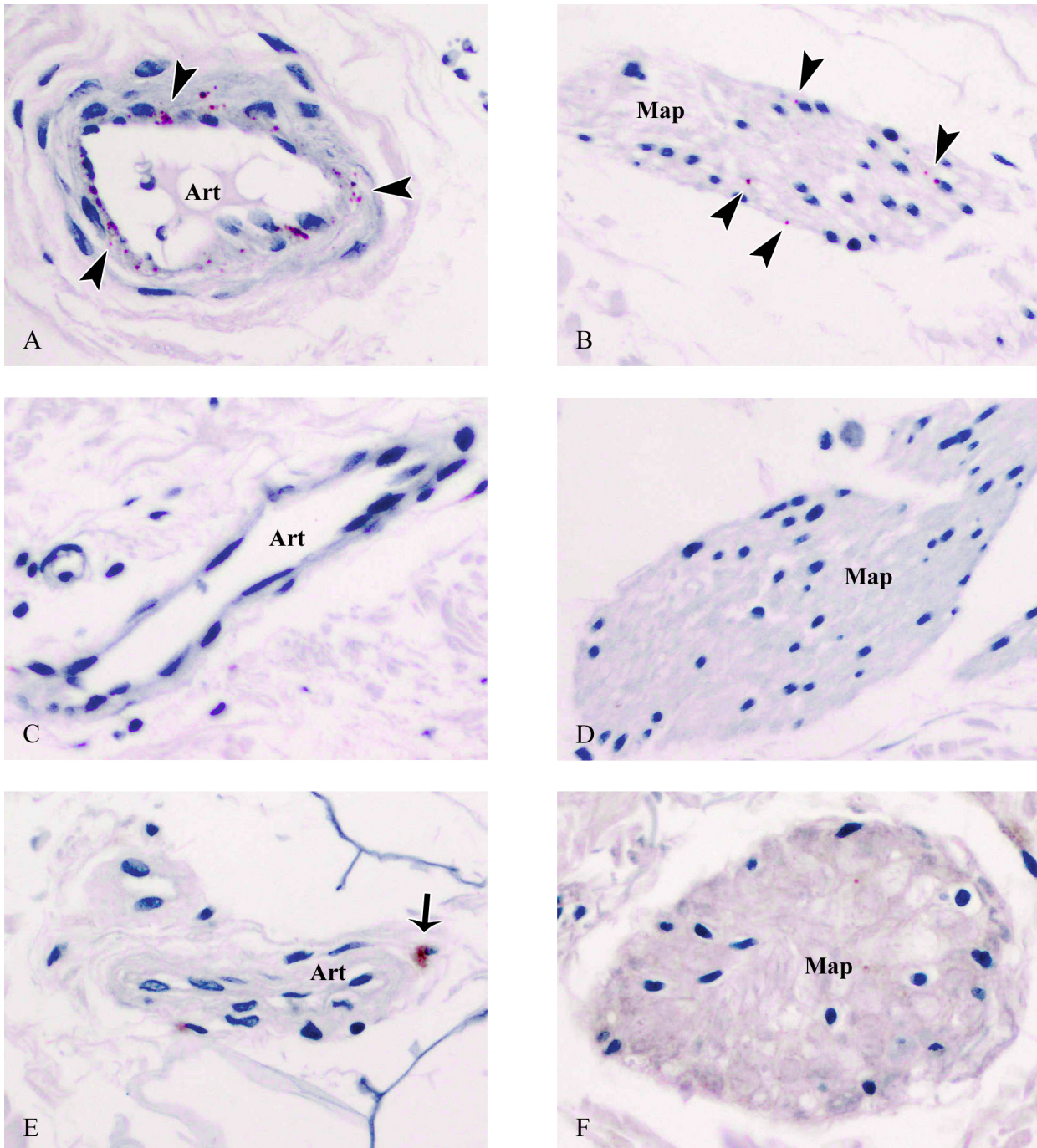


Abb. 8: Positive Immunoreaktivität für phosphoryliertes α -Synuclein in den Nervenfasern der Arteriolen und Musculi arrectores pilorum bei Lewy body-Erkrankten. (A, B) Punktförmige Ansammlungen (Pfeilspitzen) von phosphoryliertem α -Synuclein (braun-violett) in den Nervenfasern der arteriolen Gefäßwand (Art) (A) und des Musculus arrector pili (B) bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung. Die Arteriolen und Haarmuskeln von Patienten mit Multisystematrophie (C, D) und essenziellem Tremor (E, F) zeigen keine Immunoreaktivität. Der Pfeil in E markiert eine unspezifische Färbung, vermutlich eines Makrophagen. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A-F) 400-fach.

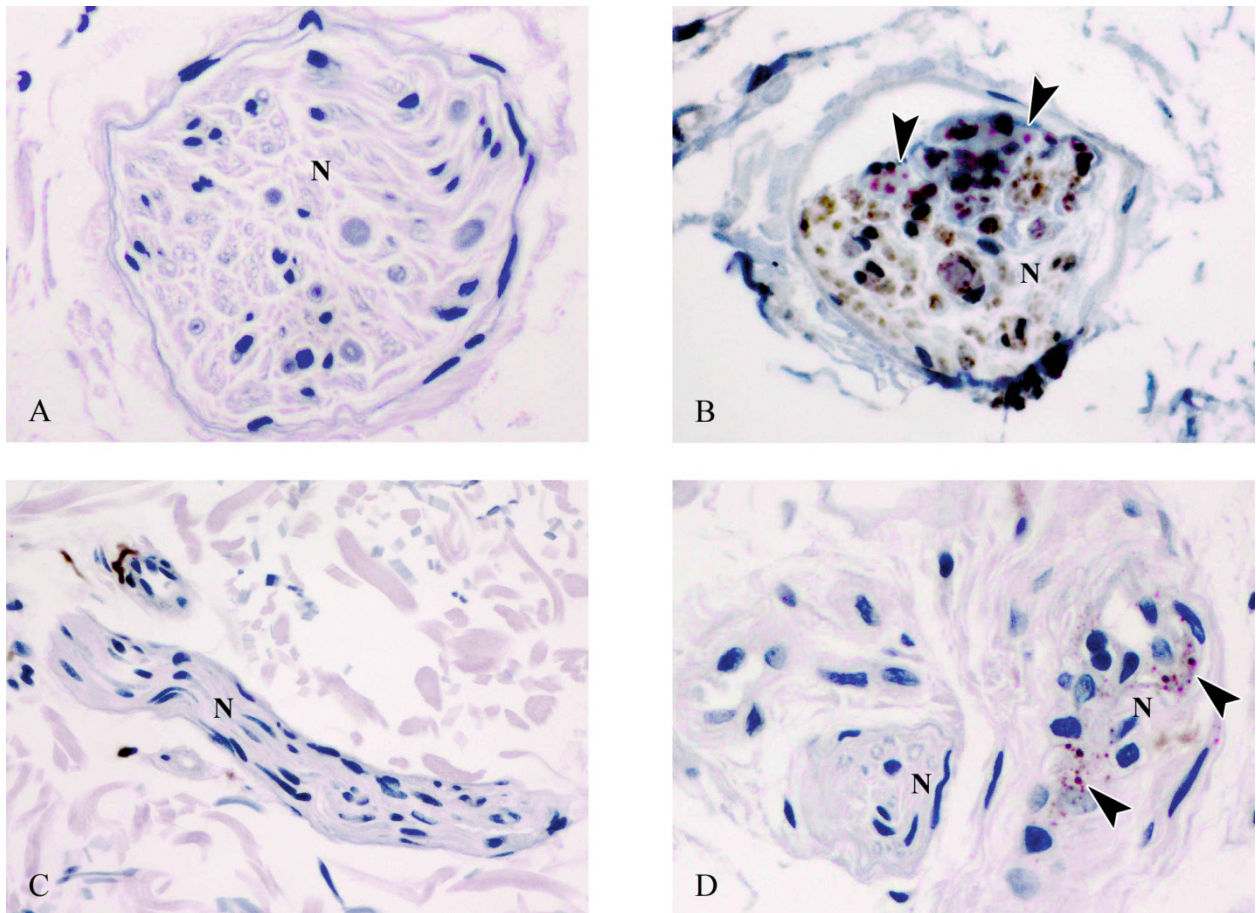


Abb. 9: Phospho- α -Synuclein-Immunoreaktivität in Nervenfaszikeln. Querschnitt eines Nervenfaszikels (N) mit negativer (A) und positiver (B) Immunoreaktivität bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung. Negative Immunoreaktivität (C) im Längsschnitt und positive Immunoreaktivität (D) im Querschnitt eines Nervenfaszikels bei essenziellem Tremor. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A, C) 200-fach, (B, D) 400-fach.

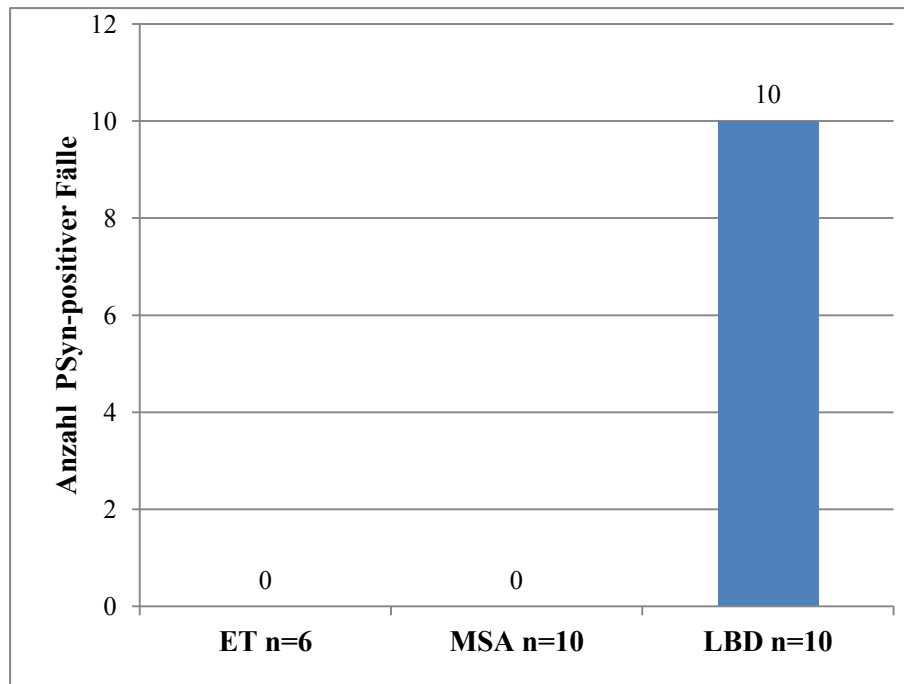


Abb. 10: Lewy body-Erkrankte exprimieren phosphoryliertes α -Synuclein in postganglionären sympathischen Nervenfasern der Haut. Anzahl der Fälle mit positiver Immunoreaktivität für phosphoryliertes α -Synuclein (PSyn) in mindestens einer der untersuchten autonomen Hautstrukturen (Schweißdrüse, Musculus arrector pili und Arteriole). Exakter Test nach Fischer $\chi^2=27,04^{***}$. *ET* Essenzieller Tremor; *MSA* Multisystematrophie; *LBD* Lewy body disorder.

3.4 Semiquantitative Bewertung

3.4.1 Phosphoryliertes α -Synuclein

Sieben von 10 LBD-Patienten zeigten eine positive Markierung für PSyn in den Nervenfasern des Schweißdrüsen-Endstückes, die bei 4 Patienten deutlich und bei 3 Patienten gering ausgeprägt war (siehe Tabelle 15). Im Nervenplexus der dermalen Arteriolen konnte bei 8 von 10 Patienten mit LBD eine ausgeprägte (n=5) und eine geringe (n=3) PSyn-Markierung dokumentiert werden. Bei 3 von 10 LBD-Patienten konnte der M. arrector pili detektiert werden. Davon war bei 2 Patienten eine geringe und bei 1 Patienten eine ausgeprägte Färbung mit PSyn sichtbar (siehe Abb. 11). Die PSyn-Färbung war im Nervenfaszikel eines LBD- und eines ET-Patienten ausgeprägt erkennbar (siehe Abb. 9).

Tabelle 15: Charakterisierung der dermalen Phospho- α -Synuclein-Immunfärbung.

Phospho- α -Synuclein							
		ES	AG	Art	Map	NeFa	
LBD	Median	0,50 [10]	0 [10]	0,75 [10]	0,50 [3]	0 [7]	
	Perzentile	25	0	0	0,38	0,50	0
		75	1,00	0	1,00	n.v.	0
MSA	Median	0 [10]	0 [10]	0 [10]	0 [9]	0 [9]	
	Perzentile	25	0	0	0	0	0
		75	0	0	0	0	0
ET	Median	0 [6]	0 [6]	0 [6]	0 [2]	0 [5]	
	Perzentile	25	0	0	0	0	0
		75	0	0	0	0	0,50

Median [Anzahl der Patienten mit nachweisbarer autonom-innervierter Struktur]. *n.v.* nicht verfügbar. *LBD* Lewy body-Erkrankung; *MSA* Multisystematrophie; *ET* Essenzieller Tremor; *ES* Endstück; *AG* Ausführungsgang; *Art* Arteriole; *Map* Musculus arrector pili; *NeFa* Nervenfaszikel.

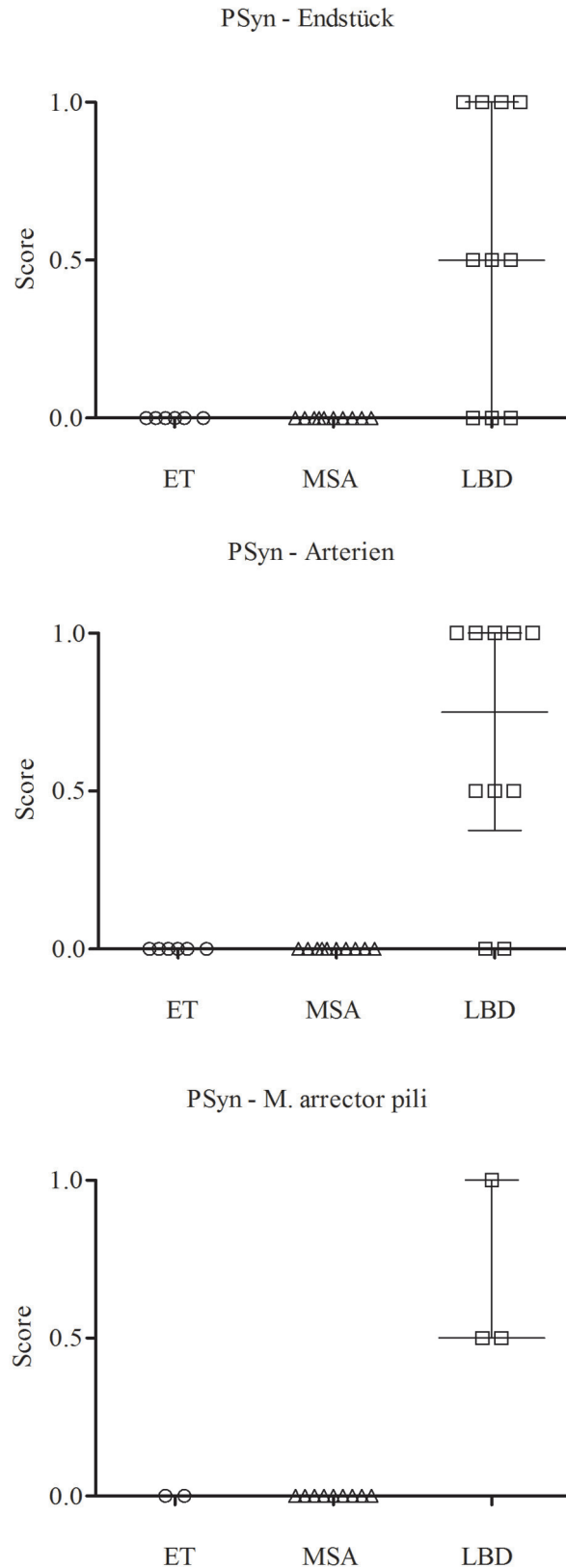


Abb. 11: Visualisierung der semiquantitativen Einzelscores für phosphoryliertes α -Synuclein. Positiver Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in den Schweißdrüsen-Endstücken, Arteriolen und Musculi arrectores pilorum bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung (LBD). Die Ergebnisse sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. *ET* Essenzieller Tremor; *MSA* Multisystematrophie.

3.4.2 Protein Gene Product 9.5

PGP 9.5-Immunoreaktivität erschien als punkt- oder faser-förmiges Färbemuster im Nervengeflecht des Schweißdrüsen-Endstückes, des Ausführungsganges, in der Tunica Media und Adventitia der arteriellen Gefäßwand sowie zwischen den Fasern glatter Muskulatur des *M. arrector pili* (siehe Abb. 12 und Abb. 13). Die Nervenfaszikel wiesen in allen 3 Gruppen eine starke Färbung für PGP 9.5 auf, ausgenommen 2 Patienten der LBD- und 1 Patient der MSA-Gruppe, die eine mittelstarke Markierung zeigten (siehe Abb. 14). Innerhalb eines Schnittpräparates war eine kräftigere PGP 9.5-Immunoreaktivität der Schweißdrüsen-Endstücke gegenüber der Ausführungsgänge zu verzeichnen (Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für verbundene Stichproben: ET $p=0,025$; MSA $p=0,059$; LBD $p=0,006$). Wie aus Abb. 15 hervorgeht, war die PGP 9.5-Immunfärbung der Schweißdrüsen-Endstücke deutlich reduziert bei LBD und leicht reduziert bei MSA verglichen mit der ET-Gruppe (Kruskal-Wallis-Test $p=0,032$; Post-hoc Analyse: LBD vs. ET $p=0,028$). Im Gegensatz dazu war die Immunoreaktivität für PGP 9.5 im Bereich der Ausführungsgänge von ET- und der LBD-Patienten gering, wohingegen in der MSA-Gruppe ($n=9$) ein ausgeprägtes ($n=4$), ein leicht reduziertes ($n=1$) und ein stark reduziertes ($n=4$) PGP 9.5 Färbemuster dokumentiert wurde (Kruskal-Wallis-Test $p=0,007$; Post-hoc Analyse: MSA vs. LBD $p=0,011$). Da der *M. arrector pili* in den Hautproben der Kontrollpersonen mit ET nur einmal erfasst wurde, wurden nur Patienten mit MSA und LBD verglichen. In der MSA-Gruppe zeigten 8 detektierte Haarmuskeln eine stärker positive Markierung für PGP 9.5 (stark $n=2$, mittelstark $n=1$, gering $n=5$) als 6 LBD-Patienten (gering $n=1$, kaum $n=5$; Mann-Whitney-U Test $p=0,003$). Die PGP 9.5-Immunoreaktivität der arteriellen Gefäße differierte nicht signifikant zwischen den 3 Stichproben (siehe Tabelle 16).

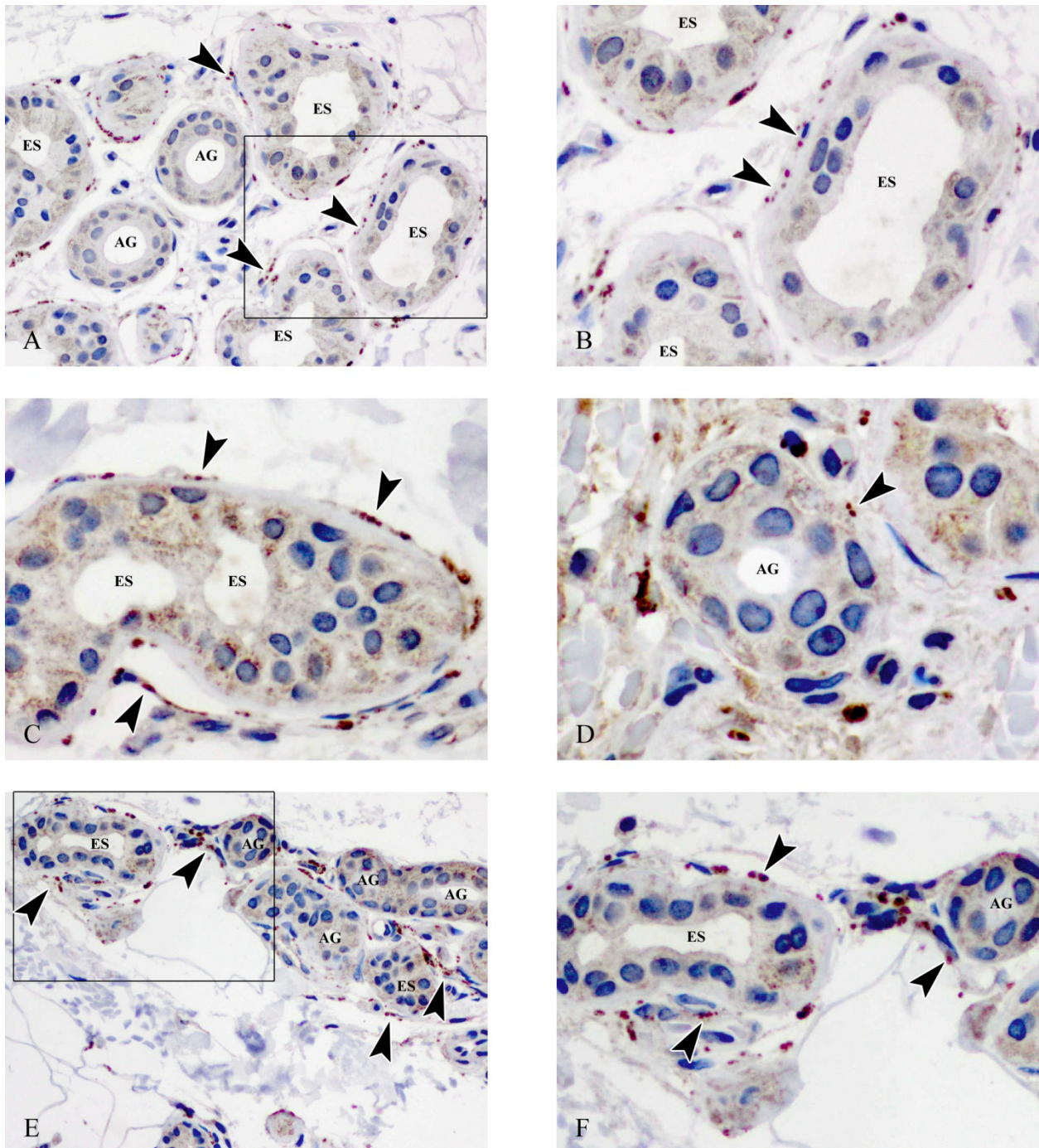


Abb. 12: Verminderte Protein Gene Product 9.5-Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Schweißdrüsen bei Patienten mit Lewy body-Erkrankungen. Mäßige Ablagerung punktförmiger und filiformer Immunoreaktivität (Pfeilspitzen) in den Nervenfasern der Endstücke (ES) bei Patienten mit Lewy body-Erkrankungen (A, B) und Patienten mit Multisystematrophie (C, D). Kräftige Protein Gene Product 9.5 Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Endstücke und Ausführungsgänge (AG) von Patienten mit essenziellem Tremor (E, F). Der Kasten in (A, E) ist jeweils in (B, F) vergrößert. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A, E) 200-fach, (B, C, F) 400-fach, (D) 600-fach.

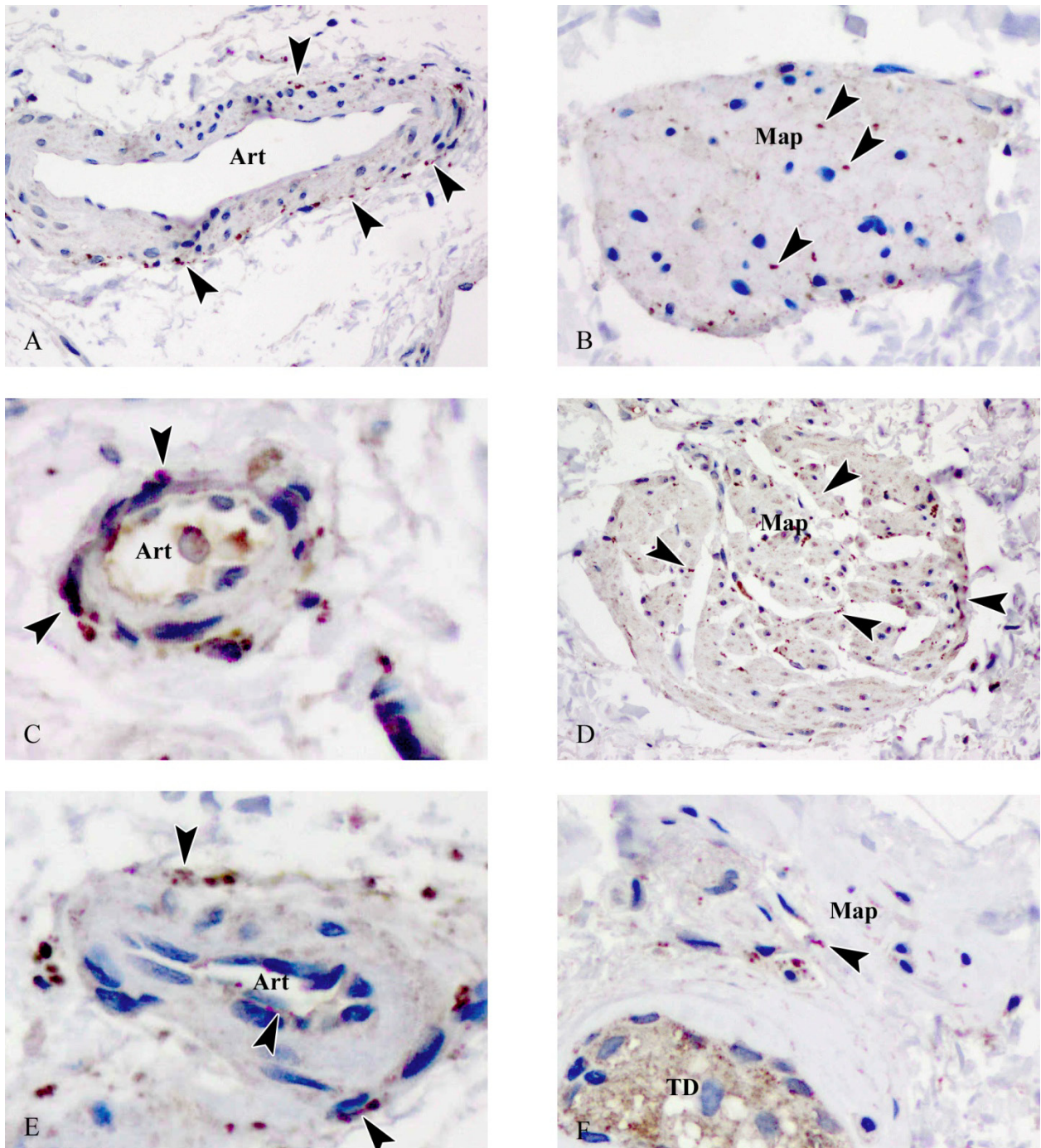


Abb. 13: Protein Gene Product 9.5-Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Arteriolen und Musculi arrectores pilorum. (A, C, E) Kein signifikanter Unterschied des Färbemusters (Pfeilspitzen) der Nervenfasern in Arteriolen (Art) und (B, D, F) Haarmuskeln (Map). (A, B) Lewy body-Erkrankung. (C, D) Multisystematrophie. (E, F) Essenzieller Tremor. TD Talgdrüse. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A) 200-fach, (B) 300-fach, (C) 600-fach, (D) 150-fach, (E, F) 400-fach.

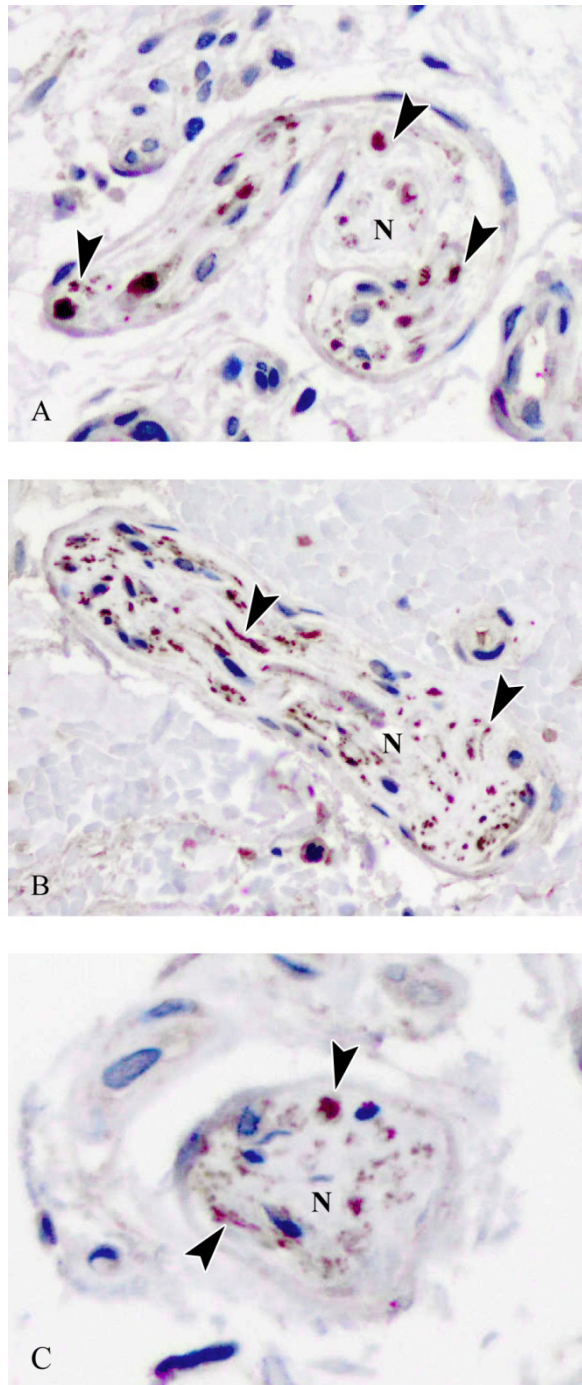


Abb. 14: Protein Gene Product 9.5-Immunoreaktivität in Nervenfaszikeln. Die Positiv-Kontrolle für Protein Gene Product 9.5 weist ein ähnliches immunhistochemisches Färbemuster (Pfeilspitzen) in den Nervenfaszikeln bei (A) Lewy body-Erkrankung, (B) Multisystematrophie und (C) essenziellem Tremor auf. Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A) 400-fach, (B) 600-fach, (C) 300-fach.

Tabelle 16: Charakterisierung der dermalen Protein Gene Product 9.5-Immunfärbung.

Protein Gene Product 9.5							
Erkrankung		ES	AG	Art	Map	NeFa	
LBD	Median	2,00 [10]	1,00 [10]	1,00 [10]	0,50 [6]	3,00 [10]	
	MW ±SD	2,20±0,63	1,00±0,0	1,20±0,42	0,58±0,20	2,85±0,34	
	Perzentile	25	2,00	1,00	1,00	0,50	2,88
		75	3,00	1,00	1,25	0,63	3,00
MSA	Median	3,0 [9]	2,00 [9]	1,50 [10]	1,00 [8]	3,00 [10]	
	MW ±SD	2,56±0,73	2,00±1,00	1,50±0,53	1,63±0,92	2,90±0,32	
	Perzentile	25	2,00	1,00	1,00	1,00	3,00
		75	3,00	3,00	2,00	2,75	3,00
ET	Median	3,00 [6]	1,00 [5]	2,50 [4]	2,00 [1]	3,00 [6]	
	MW ±SD	3,00±0,00	1,00±0,00	2,25±0,96	2,00	3,00±0,00	
	Perzentile	25	3,00	1,00	1,250	2,00	3,00
		75	3,00	1,00	3,00	2,00	3,00
p-Wert		0,032*	0,007**	0,62	0,003**†:	0,503	
Post-hoc Analyse: ES: ET vs. LBD p=0,028*; AG: LBD vs. MSA p=0,011*							
Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ES vs. AG: ET p=0,0025*; MSA p=0,059; LBD p=0,006*							
Median [Anzahl der Patienten mit nachweisbarer autonom-innervierter Struktur].							
†: Mann-Whitney-U Test (MSA vs. LBD)							
LBD Lewy body-Erkrankung; MSA Multisystematrophie; ET Essenzieller Tremor; ES Endstück;							
AG Ausführungsgang; Art Arteriole; Map Musculus arrector pili; NeFa Nervenfaszikel.							

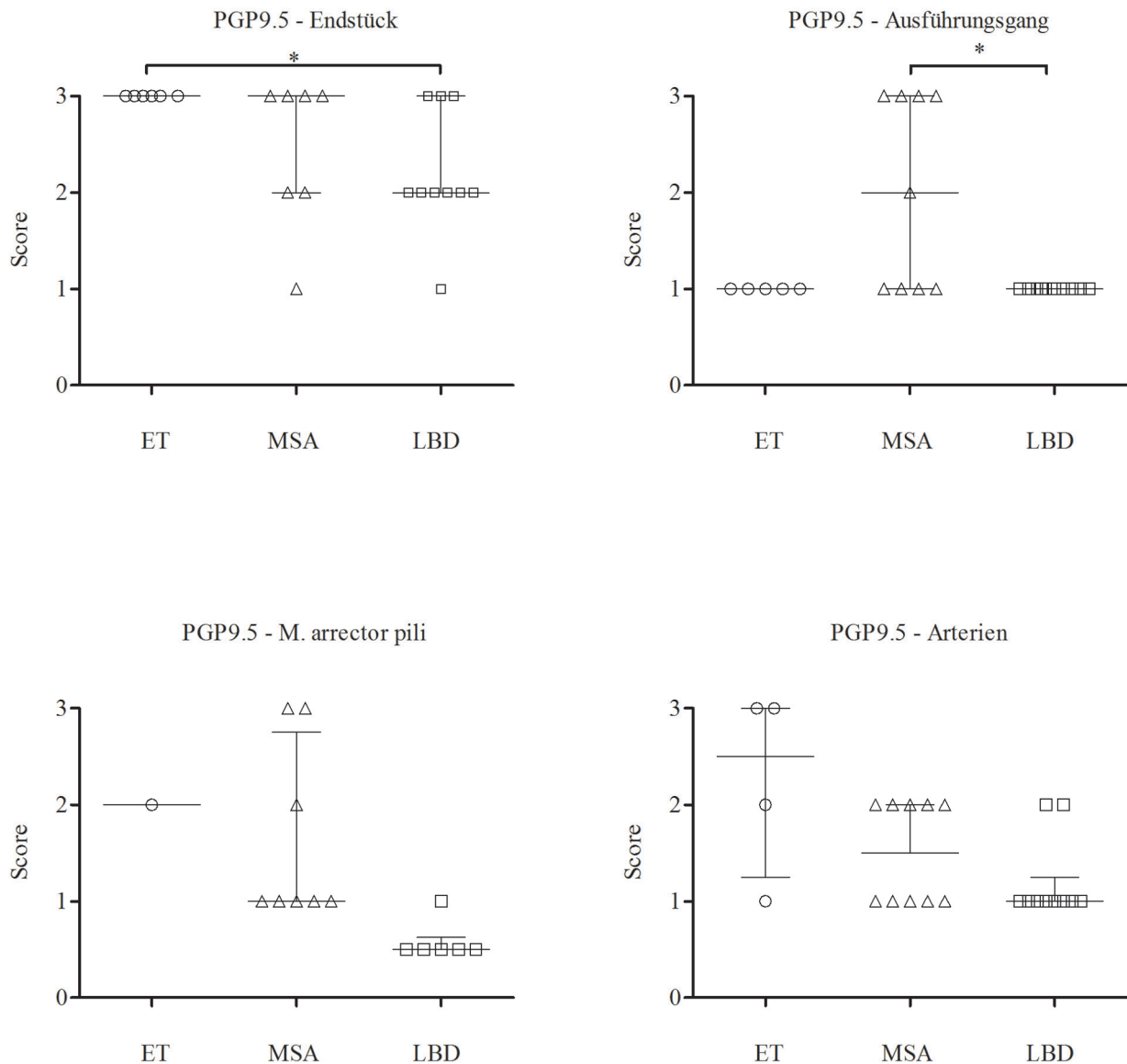


Abb. 15: Einzelvergleich der Protein Gene Product 9.5-Scores. Signifikante Verminderung der Immunoreaktivitäts-Scores im Schweißdrüsen-Endstück (links oben) und -Ausführungsgang (rechts oben) von Lewy body-Erkrankten (LBD) im Vergleich zu Patienten mit essenziellem Tremor (ET) und Multisystematrophie (MSA). Kein signifikanter Unterschied der Immunoreaktivität in den Musculi arrectores pilorum (links unten) und in Arteriolen (rechts unten) zwischen den Gruppen. Die Ergebnisse sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. * $p < 0,05$.

3.4.3 Tyrosinhydroxylase

Die TH-Immunoreaktivität war punkt- und faserförmig im Nervengeflecht der Schweißdrüsen-Endstücke und Ausführungsgänge, zwischen den glatten Muskelfasern des Haarmuskels und der Adventitia der Arteriolen sichtbar (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Nervenfaszikel waren bei 5 ET-Patienten, 10 MSA-Patienten und 8 LBD-Patienten zu detektieren. Davon zeigten die ET-Patienten eine geringe (n=4) bis keine Färbung (n=1), 9 MSA-Patienten eine geringe Färbung und 1 Patient keine Färbung für TH. LBD-Patienten wiesen eine mittelstarke (n=3) bis geringe (n=5) Markierung für TH auf. Wie aus Tabelle 17 hervorgeht, war die TH-Immunoreaktivität in den Nervenfasern der Schweißdrüsen-Endstücke der ET-Gruppe mit einer schwachen Intensität (n=5; keine Färbung n=1) im Vergleich zu Patienten mit MSA (stark bis mittelstark n=2, mittelstark n=3, mittelstark bis gering n=1, gering n=4) und Patienten mit LBD (stark n=2, mittelstark n=3, gering 5) ersichtlich. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,043$), jedoch konnte mittels Post-hoc-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen identifiziert werden. An den Ausführungsgängen zeigte sich bei ET- (n=5) und MSA-Patienten (n=8) keine TH-Markierung, wohingegen in 2 von 9 detektierten Schweißdrüsen mit Ausführungsgängen der LBD-Gruppe eine geringe Färbung zu verzeichnen war. Das Färbemuster der pilomotorischen und vasomotorischen Nervenfasern war zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden (siehe Abb. 18).

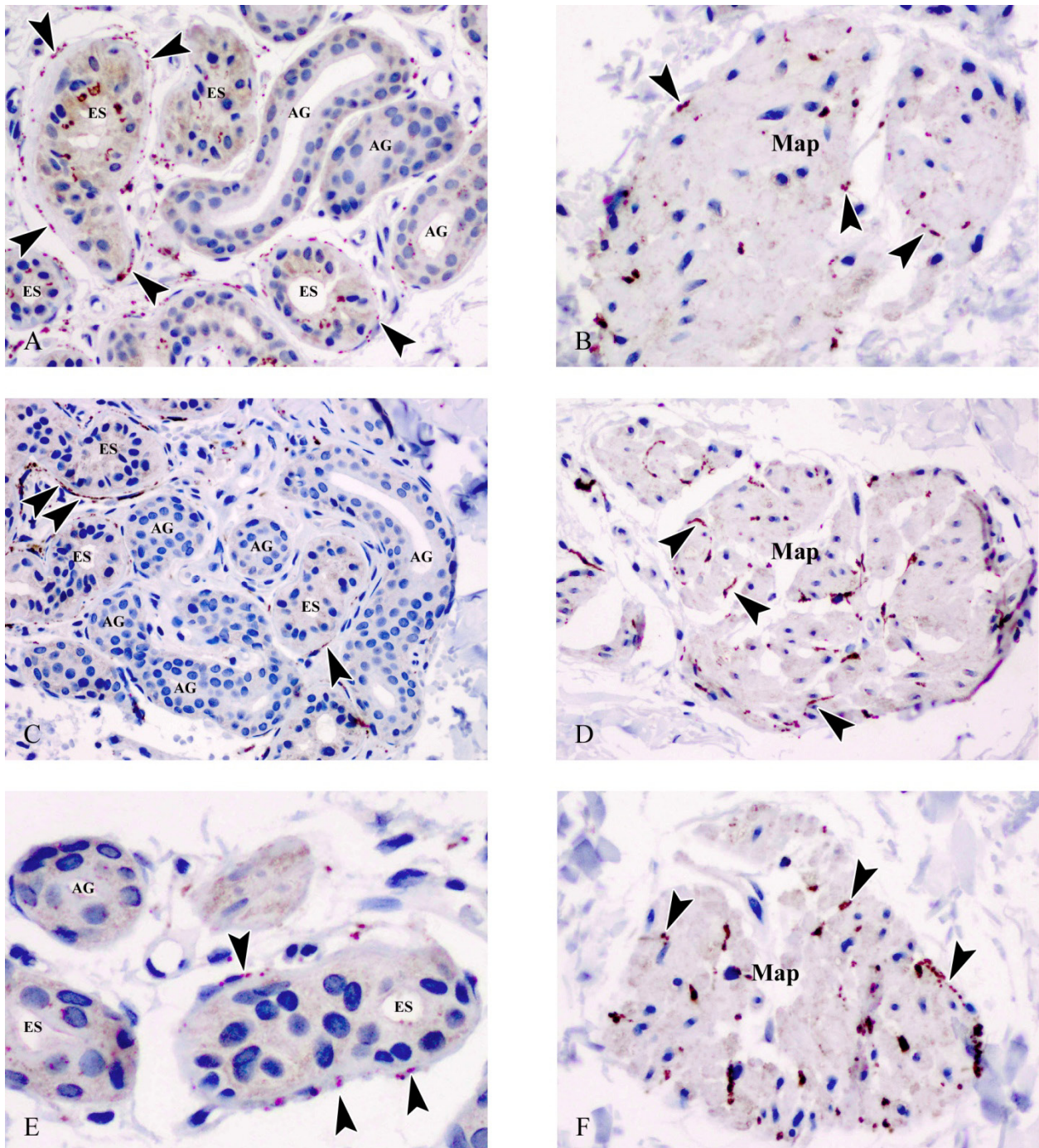


Abb. 16: Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung der Nervenfasern der Schweißdrüsen-Endstücke, -Ausführungsgänge und der Musculi arrectores pilorum. Punkt- und faserförmige Immunoreaktivität von Tyrosinhydroxylase (Pfeilspitzen) in den innervierenden Nervenfasern der Schweißdrüsen-Endstücke (ES) und -Ausführungsgänge (AG) (A, C, E) und der Musculi arrectores pilorum (Map) (B, D, F) bei Lewy body-Erkrankung (A, B), Multisystematrophie (C, D) und essenziellem Tremor (E, F). Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A, D) 200-fach, (B, F) 300-fach, (C) 150-fach, (E) 400-fach.

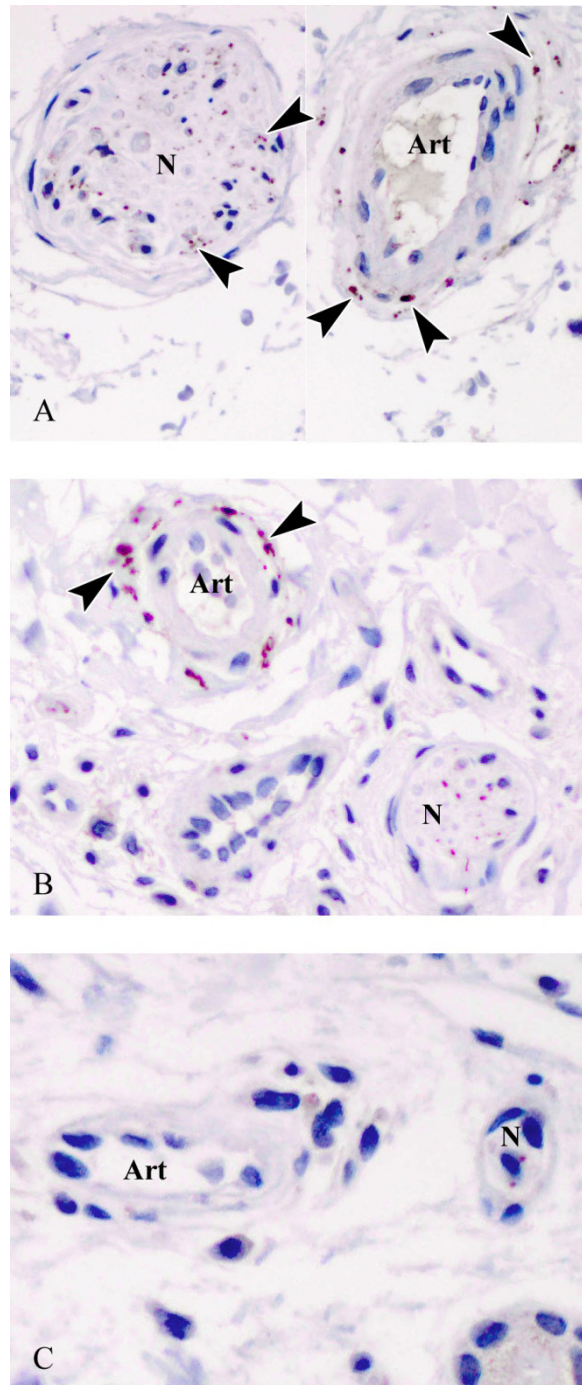


Abb. 17: Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung der Nervenfasern der dermalen Arteriolen und Nervenfaszikel. Kein signifikanter Unterschied des Färbemusters der Arteriolen (Art) und Nervenfaszikel (NeFa) bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung (A), Multisystematrophie (B) und essenziellem Tremor (C). Immunhistochemische Färbung: Labeled Streptavidin-Biotin Methode. Chromogen: Diaminobenzidin. Gegenfärbung: Bluing-Hematoxylin. Vergrößerung: (A) 250-fach, (B) 300-fach, (C) 500-fach.

Tabelle 17: Charakterisierung der dermalen Tyrosinhydroxylase-Immunfärbung.

Tyrosinhydroxylase							
Erkrankung		ES	AG	Art	Map	NeFa	
LBD	Median	1,50 [10]	0 [9]	1,50 [9]	1,50 [5]	1,00 [8]	
	MW \pm SD	1,70 \pm 0,82	0,22 \pm 0,44	1,17 \pm 1,17	1,50 \pm 0,35	1,19 \pm 0,59	
	Perzentile	25	1,00	0	0	1,25	0,63
		75	2,25	0,50	2,00	1,75	1,88
MSA	Median	1,75 [10]	0 [8]	1,00 [10]	1,75 [8]	1,00 [10]	
	MW \pm SD	1,65 \pm 0,63	0 \pm 0	1,10 \pm 0,74	1,75 \pm 0,76	0,90 \pm 0,32	
	Perzentile	25	1,00	0	1,00	1,00	1,00
		75	2,13	0	1,00	2,38	1,00
ET	Median	1,00 [6]	0 [5]	0 [5]	1,00 [3]	1,00 [5]	
	MW \pm SD	0,83 \pm 0,41	0,00 \pm 0,00	0,40 \pm 0,89	1,50 \pm 0,87	0,70 \pm 0,45	
	Perzentile	25	0,75	0	0	1,00	0,25
		75	1,00	0	1,00	n.v.	1,00
p-Wert	Kruskal-Wallis Test	0,043*	0,219	0,260	0,796	0,28	
Post-hoc-Analyse: ES: paarweiser Vergleich nicht signifikant.							
Median [Anzahl der Patienten mit nachweisbarer autonom-innervierter Struktur].							
<i>LBD</i> Lewy body-Erkrankung; <i>MSA</i> Multisystematrophie; <i>ET</i> Essenzieller Tremor; <i>ES</i> Endstück; <i>AG</i> Ausführungsgang; <i>Art</i> Arteriole; <i>Map</i> Musculus arrector pili; <i>NeFa</i> Nervenfaszike;. <i>n.v.</i> nicht verfügbar.							

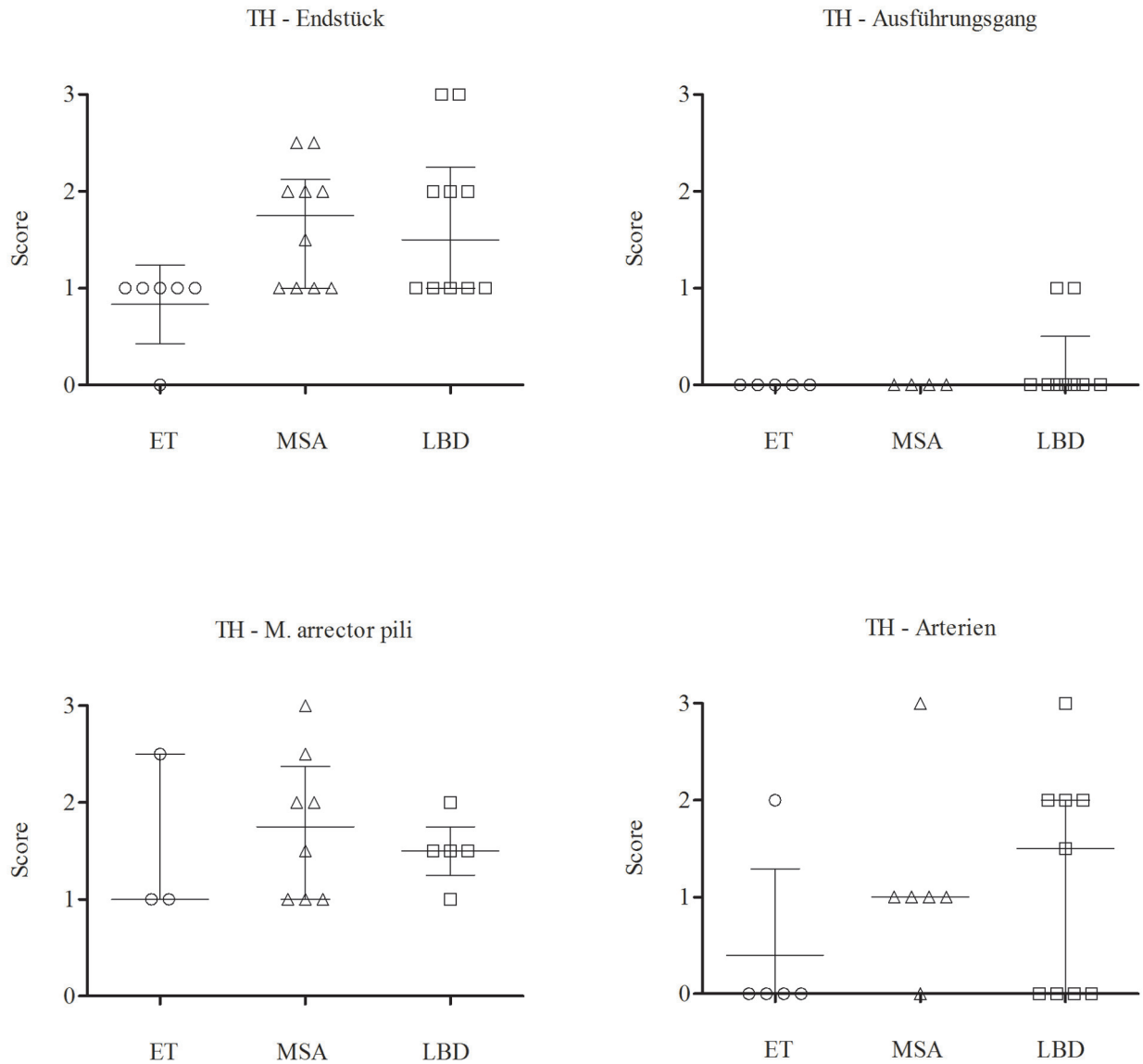


Abb. 18: Einzelvergleich der Tyrosinhydroxylase-Scores. Die Gruppen Lewy body-Erkrankung (LBD), Multisystematrophie (MSA) und essenzieller Tremor (ET) unterscheiden sich in den semiquantitativen Scores der Hautnervenfasern von Schweißdrüsen-Endstück, Schweißdrüsen-Ausführungsgang, M. arrector pili und Arteriolen nicht signifikant. Die Ergebnisse sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand.

3.5 Grad der Denervation der sympathisch innervierten Hautstrukturen

Der Anteil der PSyn-Immunoreaktivität an der maximal möglichen Immunoreaktivität ist als Ratio (Total PSyn) in Abb. 19 ersichtlich. Daraus geht hervor, dass die Ratio der PSyn-Immunoreaktivität der sympathisch innervierten Hautstrukturen Schweißdrüse, Haarmuskel und Arteriolen von LBD-Patienten zwischen 17% und 75% beträgt. Indessen konnte keine PSyn-Markierung in den autonomen Hautnervenzellen in der ET- und MSA-Gruppe nachgewiesen werden.

Der Anteil der PGP 9.5-Immunoreaktivität bezogen auf die detektierten autonomen Zielstrukturen war am höchsten bei ET-Patienten (72,5%), gefolgt von MSA-Patienten (67,0%) und signifikant weniger in der LBD-Stichprobe (43,0%) (Kruskal-Wallis-Test $p=0,004$, Post-hoc-Analyse LBD vs. ET $p=0,006$, LBD vs. MSA $p=0,046$).

Die Ratio der TH-Markierung in den detektierten autonomen Zielstrukturen war bei Patienten mit neurodegenerativer Erkrankung höher (MSA 37,5%, LBD 31%) als in der Kontrollgruppe (ET 20%), wobei sich der Unterschied als statistisch nicht signifikant erwies (Kruskal-Wallis-Test $p=0,112$, nicht dargestellt).

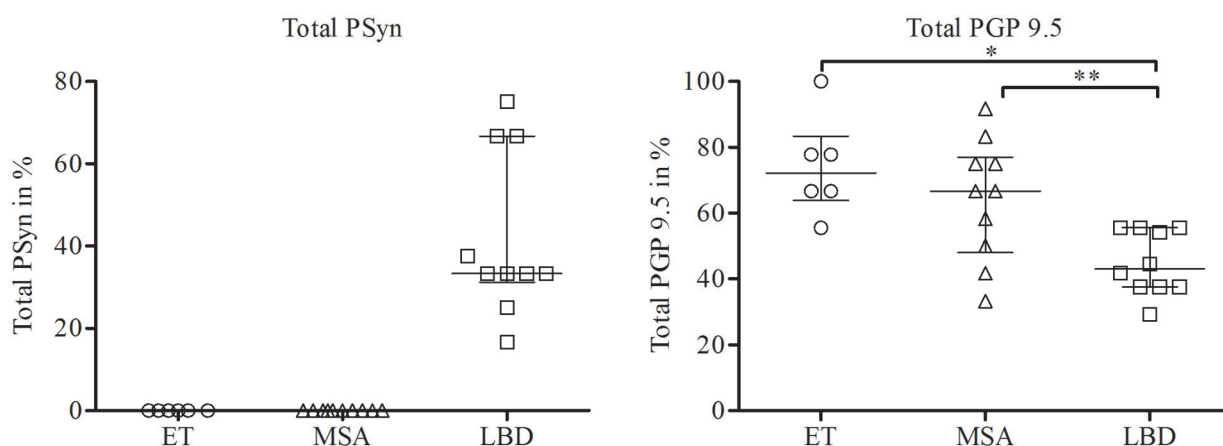


Abb. 19: Grad der Denervation der sympathisch innervierten Hautstrukturen. Dargestellt ist jeweils der prozentuale Anteil der Immunoreaktivität an der Summe der insgesamt erreichbaren Immunoreaktivität in Abhängigkeit der Anzahl der detektierten Hautelemente Schweißdrüsen (Endstück und Ausführungsgang), Musculi arrectores pilorum und Arteriolen. Links: Total PSyn bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung. Rechts: Total PGP 9.5 ist bei Lewy body-Erkrankungen (LBD) signifikant reduziert gegenüber Multisystematrophie (MSA) und essenziellem Tremor (ET). Die Ergebnisse sind dargestellt als Median mit Interquartilsabstand. * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

3.6 Korrelationsanalyse

3.6.1 Immunhistochemische Daten

In der Korrelationsanalyse wurde die Ratio der PGP 9.5-, TH- und PSyn-Immunoreaktivität an den autonomen Zielstrukturen der Dermis auf einen Zusammenhang überprüft (siehe Tabelle 18). Total PGP 9.5 korrelierte negativ mit Total PSyn (Spearman $\rho=-0,57$ $p=0,02$). Das heißt, je stärker die Immunoreaktivität für PSyn ist, desto geringer ist sie für PGP 9.5 und umgekehrt.

Tabelle 18: Inverse Korrelation von phosphoryliertem α -Synuclein und Protein Gene Product 9.5.

Spearman-Korrelation n=26	Total TH	Total PSyn
Total PGP 9.5	0,3	-0,57 *
Total TH		0,05

TH Tyrosinhydroxylase; *PSyn* phosphoryliertes α -Synuclein; *PGP 9.5* Protein Gene Product 9.5. * $p<0,05$.

3.6.2 Klinische Daten

Aus Abb. 20 geht hervor, dass LBD-Patienten unabhängig vom Alter eine deutlich verminderte Immunoreaktivität für PGP 9.5 aufweisen (LBD $r^2=0,01$; ET $r^2=0,00$; MSA $r^2=0,23$). Total PSyn, als Ausdruck der pathologischen α -Synuclein-Markierung in den Nervenfasern der autonomen Hautelemente, korrelierte nicht mit klinischen (Krankheitsdauer, UPDRS, Hoehn & Yahr), nuklearmedizinischen (H/M-ratio, SR_{contra}) oder funktionellen (Δ SBP, CASSv) Parametern bei LBD-Patienten (siehe Tabelle 19). Alle LBD-Patienten wiesen einheitlich einen CASSa-Subscore von 1 Punkt auf, weshalb keine Korrelationsanalyse möglich war.

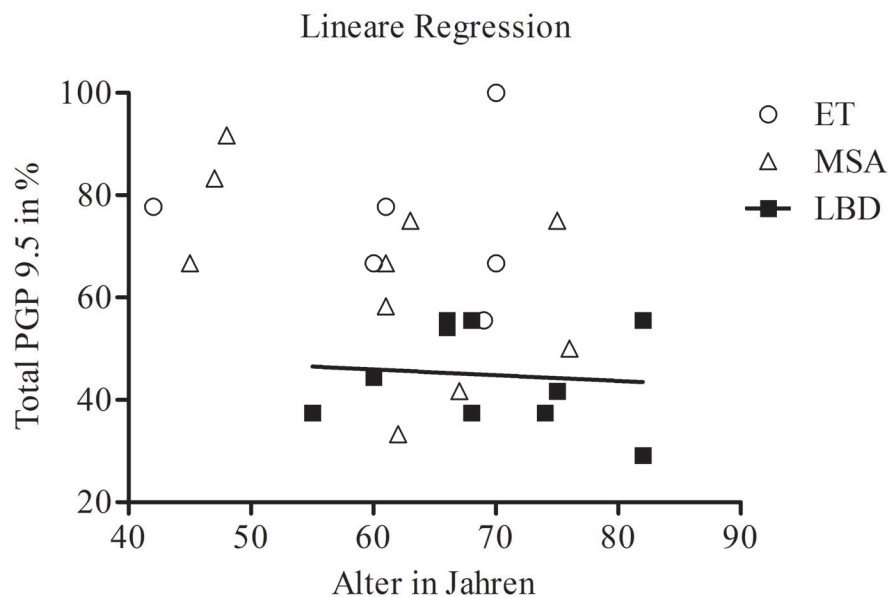


Abb. 20: Altersunabhängiger Verlust Protein Gene Product 9.5-positiver autonomer Nervenfasern bei Lewy body-Erkrankungen. Die Regressionsanalyse zeigt, dass die Verminderung von Total Protein Gene Product 9.5 bei LBD unabhängig vom Alter ist. Zur Veranschaulichung ist die Regressionsgerade für Alter versus LBD-Total PGP 9.5 eingezeichnet. *ET* Essenzieller Tremor; *MSA* Multisystematrophie; *LBD* Lewy body-Erkrankung.

Tabelle 19: Keine Korrelation zwischen Expression von phosphoryliertem α -Synuclein in postganglionären sympathischen Hautnervenfasern und klinischen Parametern bei Lewy body-Erkrankungen. Spearman-Korrelation von Total phosphoryliertem α -Synuclein und klinischen (Krankheitsdauer, UPDRS, Hoehn & Yahr), nuklearmedizinischen (*H/M-ratio*, *SR_{contra}*) und autonomen Parametern (*SBP*, *CASSv*) bei Patienten mit Lewy body-Erkrankung.

	Dauer	UPDRS	H&Y	H/M-ratio	SR _{contra}	Δ SBP	CASSv
Total PSyn	-0,57	-0,38	-0,25	0,29	0,18	0,4	0,2

Dargestellt ist Spearman's Rangkorrelationskoeffizient (ρ).

UPDRS (III) Unified Parkinson's Disease Rating Scale part III; *H&Y* Hoehn & Yahr Skala; *CASSv/a* Composite Autonomic Scoring Scale vagal/adrenerg; *SBP* maximaler Blutdruckabfall innerhalb von 10 Minuten passiver Orthostase; *SR_{contra}* Specific Ratio des Putamen kontralateral zur klinisch stärker betroffenen Seite; *H/M-ratio* Heart-Mediastinum-ratio.

4 Diskussion

Phospho- α -Synuclein ist die Hauptkomponente der LB und LN bei Lewy body-Erkrankungen sowie der GCI bei Multisystematrophie. Die Erkrankungen werden deshalb neuropathologisch als α -Synucleinopathien zusammengefasst. Obwohl der klinische Phänotyp dieser Erkrankungen insbesondere im Frühstadium eine weitreichende Überlappung zeigt, unterscheidet sich die Lokalisation des pathologischen Prozesses bei LBD und MSA deutlich. Bei der MSA betrifft die Neurodegeneration den zentralen Abschnitt des ANS, inklusive präganglionäre Neurone mit Ursprung im Nucleus intermediolateralis, wohingegen bei LBD sowohl zentrale als auch periphere Anteile des ANS involviert sind. Die postganglionären sympathischen Nervenfasern verlaufen von den Ganglien des Truncus sympathicus zusammen mit den Spinalnerven zu den Zielorganen, z. B. Schweißdrüsen, Haarmuskeln oder kutane arterielle Gefäße. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob anhand von immunhistochemischen Markern die Lewy-Pathologie und Neurodegeneration in den sympathischen postganglionären Nervenfasern der Haut von LBD-Patienten intravital nachweisbar sind und somit von denen der MSA-Patienten unterschieden werden können.

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der differenzielle Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in den dermalen sudomotorischen, pilomotorischen und vasomotorischen Nervenfasern bei Patienten mit LBD im Gegensatz zu Patienten mit MSA und ET. Damit gelang erstmals der intravitale Nachweis einer unterschiedlichen α -Synuclein-Pathologie in den dermalen autonomen Nervenfasern bei MSA- und LBD-Patienten. Darüber hinaus besteht eine altersunabhängige Verminderung PGP 9.5-immunoreaktiver autonomer Nervenfasern in der Dermis von LBD-Patienten im Vergleich zu MSA- und ET-Patienten. Das Ausmaß der Ablagerungen von PSyn in den sympathischen Nervenfasern von LBD-Patienten geht mit einem Verlust PGP 9.5-positiver dermalen Nervenfasern einher.

4.1 Expression von phosphoryliertem α -Synuclein in dermalen sympathischen Nervenfasern bei Patienten mit LBD

Bei LBD werden PSyn positive Aggregate in den Zellkörpern als LB und in den Nervenfasern als LN bezeichnet.⁶⁶ In dieser Arbeit waren LN, angezeigt durch die PSyn-Antikörperfärbung, bei klinisch diagnostizierter LBD in den autonomen Neuronen in unmittelbarer Nähe der

Schweißdrüsen-Endstücke, der Tunica Media arterieller Gefäße und zwischen den glatten Muskelfasern des M. arrector pili präsent. In der Literatur finden sich wenige und widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der immunhistochemischen Untersuchung der Haut auf phosphoryliertes α -Synuclein (siehe Tabelle 20), die nachfolgend beschrieben und diskutiert werden. Ikemura et al. bestätigten in ihrer post mortem Studie eine positive PSyn-Immunoreaktivität bei 20/85 LBD-Patienten, davon 11 in der Haut von Oberarm und Abdomen, 6 ausschließlich in der abdominellen und 3 ausschließlich in der Oberarmkutis.⁹⁹ Hingegen zeigten Miki et al. bei nur 2/20 lebenden Parkinson-Patienten die Lewy-Pathologie in unmyelinisierten Nervenfasern der Blutgefäße und Schweißdrüsen in der Haut der Brustwand, jedoch konnte dies nicht in der unteren Extremität nachgewiesen werden.¹¹⁸ In den postmortalen Untersuchungen der Arbeitsgruppen von Kawada et al. und Beach et al. blieb der Nachweis einer positiven Immunoreaktivität für phosphoryliertes α -Synuclein in der vollständig Haut aus.^{43, 119}

Die Arbeiten unterschieden sich methodisch hinsichtlich der Patientenauswahl, der Biopsieorte, des Fixiermediums sowie der Fixierdauer. Die Diagnose LBD wurde in den Arbeiten von Ikemura et al. und Beach et al. durch eine postmortale neuropathologische ZNS-Untersuchung gesichert.^{99, 119} Im Gegensatz dazu wurden von Miki et al. sowie in der vorliegenden Arbeit, die aktuell gültigen klinischen Diagnosekriterien der UKPDSBB verwendet.¹¹⁸ Trotz apparativer Zusatzdiagnostik sowie einer klinisch-neurologischen und vegetativ-autonomen Verlaufskontrolle kann somit eine fehlerhafte diagnostische Zuordnung in der vorliegenden in vivo-Studie nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Trotzdem zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit signifikante Ergebnisse entsprechend eines Nachweises der Lewy-Pathologie in den dermalen Nervenfasern mindestens einer autonomen Zielstruktur bei allen LBD-Patienten im Gegensatz zu MSA- und ET-Patienten. Diese homogenen Ergebnisse bezüglich des Phospho- α -Synuclein-Nachweises sprechen dagegen, dass die, im Vergleich zur neuropathologischen Untersuchung, weniger genaue klinische Diagnose ursächlich für den Unterschied zu den Ergebnissen der genannten Studien mit einem geringeren Phospho- α -Synuclein-Nachweis ist. In den nachfolgenden Abschnitten sollen deshalb weitere mögliche Gründe für die Diskrepanzen diskutiert werden.

Als Biopsieareal wurde in der vorliegenden Arbeit eine distale Hautregion gewählt, vergleichbar zu der intravitalen Studie von Kawada et al.⁴³ Die Flexorenseite des Unterarms ist eine von außen gut zugängliche Region behaarter Haut, für die eine auffällig hohe Schweißdrüsendichte beschrieben wurde.¹²⁶ Dagegen weisen die Biopsieorte der zu vergleichenden Studien

(Abdomen^{99, 119}, Oberarm⁹⁹, Brustwand und Bein¹¹⁸), mit Ausnahme des Skalps¹¹⁹, eine geringere Dichte an Schweißdrüsen und somit autonomer sudomotorischer Nervenfasern auf.¹²⁶ Die von Ikemura et al. untersuchten Patienten waren mit durchschnittlich 80,8 Jahren deutlich älter als die in der vorliegenden Arbeit. Aufgrund der Annahme, dass bei älteren Patienten die distalen Extremitäten häufig von ischämischen Veränderungen betroffen sind, wählten sie weiter proximal gelegene Biopsieorte und konnten PSyn häufiger in der Haut des Abdomens als in der des Oberarms nachweisen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass die Hautprobe des Abdomens im Gegensatz zu der des Oberarms mit Paraformaldehyd fixiert wurde. In paraformaldehydfixiertem Gewebe sind LN optimal visualisierbar, wobei sie ansonsten in neutral gepuffertem Formalin ebenfalls detektiert werden können.¹²⁹ In der vorliegenden Arbeit wurde ein in der Routinediagnostik übliches Fixiermedium, nämlich 4 % gepuffertes Formalin, verwendet. Infolgedessen wird gezielt die Struktur der Probe im Sinne einer Protein-Vernetzung verändert, um das Gewebe vor Zersetzung zu schützen.¹²⁷ Dauert die Fixierung zu lange, kann das Antigen destruiert oder nicht mehr demaskiert werden. Jedoch besteht bei zu kurzer Dauer die Gefahr der unvollständigen Antigenfixierung. Dadurch kann das Antigen durch die Zelle oder das Gewebe diffundieren, durch Autolyse zerstört werden, oder es resultiert durch die koagulative Fixierung eine unregelmäßige Antikörperfärbung.¹⁴³ In der vorliegenden Arbeit betrug die Fixierdauer zwischen 24 Stunden und 2 Wochen, in der postmortem Untersuchung von Ikemura et al. 48 Stunden für die Paraformaldehydfixierung der Abdomenhaut und mindestens eine Woche für die Formalinfixierung der Armhaut. Demgegenüber fixierten Miki et al. das Gewebe für 48 Stunden deutlich kürzer.¹¹⁸ Für die sogenannte Antigenmaskierung nutzten Ikemura et al. Ameisensäure und Beach et al. Proteinase K. Die Vorbehandlung durch Ameisensäure verstärkt die Immunfärbung von α -Synuclein.¹⁰⁷ Vermutlich ist Ameisensäure dafür verantwortlich, unlösliches Phospho- α -Synuclein in pathologischer β -Faltblattstruktur in seine lösliche Form zu überführen, wodurch es immunhistochemischen Färbemechanismen zugänglicher wird.¹⁰⁸ Ameisensäure entsteht aus einer langsamen Reaktion zweier Formaldehyd-Moleküle, wie sie in Formalinlösungen vorkommen.¹⁴⁴ Daraus ergibt sich: Je länger die Hautproben in Formalin fixiert sind, desto größer wird die Konzentration an Ameisensäure und desto besser lässt sich phosphoryliertes α -Synuclein immunhistochemisch anfärben. Paraformaldehyd, das Polymer von Formaldehyd, ist dagegen säurefrei, wodurch die notwendige Antigenmaskierung mit Ameisensäure in der Studie von Ikemura et al. erklärt wird.¹⁴⁵ Insofern könnte die Fixierdauer in Formalin die entscheidende Komponente für den Erfolg der PSyn Färbung darstellen und die im Vergleich zur vorliegenden Arbeit kürzere Fixierdauer von Miki et al. dessen geringe Anzahl PSyn-positiv gefärbter Hautproben begründen.¹¹⁸

Tabelle 20: Gegenüberstellung der Studien zur Untersuchung von phosphoryliertem α -Synuclein in der Haut.

	Ikemura et al. 2008 ⁹⁹	Beach et al. 2010 ¹¹⁹	Kawada et al. 2009 ⁴³	Miki et al. 2010 ¹¹⁸	Vorliegende Arbeit
	Postmortal		Intravital		
Probanden [Anzahl Diagnose]	<u>Prospektiv</u> : 279, davon 85 LBD <u>Retrospektiv</u> : 142 LBD	2 ILBD 8 IPS 3 DLB 9 ADLB	11 IPS	20 IPS	10 LBD, 10 MSA, 6 ET
Diagnosestellung	Neuropathologie: LB-Nachweis im ZNS		Klinisch	Klinisch nach UKPDSBB	
Biopsie-Lokalisation	A: Flexorseite des Oberarms, B: Abdomen	Abdomen, Skalp	Flexorseite des Unterarms	Brustwand, distale untere Extremität	Flexorseite des Unterarms
Fixiermedium	A: Formalin 10%ig gepuffert, B: Paraformaldehyd 4%ig	Formalin 3,75%ig gepuffert	Formalin	Formalin 10%ig gepuffert	Formalin 4%ig gepuffert
Fixierdauer	A: >1Woche B: 48 h	k.A.	k.A.	48 h	24 h – 2 Wochen
Einbettmedium	Paraffin	Paraffin	k.A.	Paraffin	Paraffin
Schnittdicke	6 μ m	k.A.	4 μ m	6 μ m	3 μ m
Anzahl der Schnitte	1 Schnitt pro Antikörper	k.A.	k.A.	3 je Region (je 30 μ m Abstand)	1 Schnitt pro Antikörper
Antikörper (Verdünnung)	Anti-Pser129, polyklonal (1:100) ; <u>Anti-PSyn*</u> , monoklonal (1:10.000)	Anti-Pser, polyklonal (k.A.)	<u>Anti-PSyn*</u> , monoklonal (1:2000)	<u>Anti-PSyn*</u> , monoklonal (1:5000)	<u>Anti-PSyn*</u> , monoklonal (1:1000)
Demaskierung	Ameisensäure	Proteinase K	k.A.	k.A.	keine
LBD Phospho-α-Synuclein	<u>Prospektiv</u> : 20/85 LBD + (inkl. 2/2 IPS + \pm . 100% Spezifität. <u>Retrospektiv</u> : Sensitivität IPS=70%, DLB=40%.	Kein Nachweis	Kein Nachweis	2/20 IPS +	10/10 LBD +
MSA Phospho-α-Synuclein	0/3 MSA	n.d.	n.d.	n.d.	0/10 MSA

* Hersteller identisch: Wako, Tokyo, Japan.
(+) positiv. *ADLB* Alzheimer Demenz mit Lewy bodies; *DLB* Demenz mit Lewy bodies; *ET* Essenzieller Tremor; *ILBD* Inzidentelle Lewy body-Erkrankung; *IPS* Idiopathisches Parkinson-Syndrom; *IR* Immunoreaktivität; *LBD* Lewy body-Erkrankung; *MSA* Multisystematrophie; *UKPDSBB* UK Parkinson's Disease Society Brain Bank Criteria; *ZNS* Zentrales Nervensystem; *k.A.* keine Angabe; *n.d.* nicht durchgeführt.

Der wesentliche Aspekt der „Positiv-Kontrolle“ wurde bisher noch nicht diskutiert, weshalb in diesem Abschnitt darauf eingegangen werden soll. Positiv-Kontrollen dienen der Bestätigung der spezifischen Funktionalität des Antikörpers und somit der Qualitätssicherung. Im Vorfeld dieser Studie wurde die immunhistochemische Färbemethode mit Anti-PSyn an Hirngewebsproben einer klinisch und neuropathologisch diagnostizierten MSA-Patientin etabliert. In dieser Studie wurde das Funktionieren der Antikörperfärbung mit PSyn anhand von Positiv-Kontrollen jenes MSA-Falls verifiziert. Somit steht mit der beschriebenen Anwendung des Antikörpers gegen PSyn eine immunhistochemische Färbemethode zur Verfügung, die selektiv phosphoryliertes α -Synuclein in sympathischen dermalen Nervenfasern markiert und unspezifische Hintergrundfärbungen vermeidet. In drei Publikationen wurde für die Färbung dermalen Hautproben der gleiche monoklonale Antikörper (PSyn) wie in der vorliegenden Arbeit angewandt, jedoch, im Gegensatz dazu, ohne auf eine Positiv-Kontrolle dieses Antikörpers zu verweisen.^{43, 99, 118} Folglich bleibt unklar, ob die Verdünnung des PSyn-Antikörpers optimal für diese Untersuchungen waren. Hervorzuheben ist, dass die Antikörper-Konzentration in diesen Arbeiten geringer waren, d. h. die Verdünnungsfaktoren höher waren (vgl. Miki et al. 1:5000; Kawada et al. 1:2000; Ikemura et al. 1:10.000), als in der vorliegenden Studie (1:1000).^{43, 99, 118} Miki et al. und Kawada et al. konnten in ihrer Studie keine positive Anti-PSyn Immunoreaktivität nachweisen, wohingegen Ikemura et al. ein positiver Nachweis einer Phospho- α -Synuclein-Expression in den kleinen Nervenfasern bei 20/85 LBD-Patienten in der Oberarm- und / oder Bauchhaut gelang. Dabei muss erwähnt werden, dass Letztere für die jeweilige Lokalisation von 2 Serienschnitten je einer mit dem polyklonalen Antikörper PSer129 und einer mit monoklonalem Anti-PSyn gefärbt wurde. Ausgewählte Schnitte wurden außerdem mit einer Doppel-Immunfärbung gegen PSer129 und TH gefärbt. Aus den Ergebnissen geht nicht hervor, welcher Antikörper nun den Nachweis einer Phospho- α -Synuclein Expression bei den LBD-Patienten erbracht hat. In jedem Fall zeigte sich durch die Co-Färbung, dass insbesondere pilomotorische und vasomotorische Nervenfasern positiv für polyklonales Anti-PSer129 waren. Ein expliziter Verweis auf die Immunoreaktivität von monoklonalem Anti-PSyn, wie in der vorliegenden Untersuchung verwendet, findet sich in der Publikation von Ikemura et al. nicht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die verwendete Konzentration des PSyn-Antikörpers unzureichend für den Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in den sympathischen dermalen Nervenfasern war. Letztlich könnten dadurch die abweichenden Ergebnisse bzw. der fehlende Nachweis von PSyn-Immunoreaktivität in den sympathischen Nervenfasern der Haut der publizierten Arbeiten im Vergleich zu denen in der vorliegenden begründet sein.

Kürzlich untersuchten Wang et al. mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen physiologisches α -Synuclein 50 μm dicke Gefrierschnitt-Hautproben des distalen Beins und proximalen und distalen Oberschenkels von 20 klinisch diagnostizierten Parkinson-Patienten und 14 gesunden Kontroll-Personen.¹⁴⁶ Obwohl der verwendete Antikörper nicht spezifisch für pathologisches α -Synuclein war, konnte signifikant mehr α -Synuclein in den kutanen sympathischen adrenergen und cholinergen Nervenfasern des Haarmuskels und der Schweißdrüse bei Patienten mit Morbus Parkinson im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine zunehmende α -Synuclein Ablagerung mit einem höheren Grad autonomer Dysfunktion assoziiert ist. Dieser Zusammenhang war in den erhobenen Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung nicht vorhanden. Wang et al. verwendeten eine 3D-gestützte Technik und Doppel-Immunfärbung für die Detektion und Quantifizierung der α -Synuclein positiven Nervenfasern. Dabei ist die zahlenmäßige Erfassung gegenüber der vorliegenden Studie zwar akkurater, jedoch ist α -Synuclein physiologischerweise ebenfalls bei Gesunden nachweisbar, so dass die Trennschärfe zwischen gesund und krank gemindert wird.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in autonomen Nervenfasern der Haut des volaren Unterarms mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode spezifisch für Patienten mit LBD ist. Der unzureichende Nachweis von Phospho- α -Synuclein in der Dermis in den vorangegangenen Studien ist möglicherweise auf eine zu kurze Fixierdauer in Formalin, einen Biopsieort mit einer geringeren Dichte autonomer Nervenfasern und eine insuffiziente Sensitivität des immunhistochemischen Verfahrens zurückzuführen.

Mit Hilfe der vorliegenden Untersuchung wurden erstmals intravital gewonnene Hautbiopsien von MSA-Patienten auf eine PSyn-Immunreaktivität untersucht. In Übereinstimmung mit der „postmortem“ Arbeit von Ikemura et al. war in den autonomen Nervenfasern der Haut von MSA-Patienten kein phosphoryliertes α -Synuclein nachweisbar.⁹⁹ Die autonome Dysfunktion der MSA beruht auf einer Degeneration präganglionärer Strukturen des autonomen Nervensystems.⁹¹⁻⁹³ Die negative PSyn-Immunreaktivität in der Hautbiopsie von MSA-Patienten stützt die These der Involvierung des zentralen autonomen Nervensystems in den Krankheitsprozess der MSA.¹²⁰ Jedoch besteht ein Widerspruch zu den Forschungsergebnissen von Nishie et al., die filamentöse α -Synuclein-Aggregate in 2/8 peripheren sympathischen Ganglien von MSA-Patienten nachwiesen.⁹⁵ In gleicher Weise zeigten Sone et al. in 11/26 sympathischen Ganglien von MSA-Patienten pathologische neuronale α -Synuclein-Einschlüsse,

die zum Teil als LB-Strukturen imponierten.⁹⁴ Bei genauerer Betrachtung der Krankheitsdauer ist festzustellen, dass 9/11 Patienten zwischen 10 und 25 Jahren untypisch lange krank waren, sodass hier einerseits ein spezieller Phänotyp der MSA oder eine Überlappung aus MSA / LBD untersucht wurde.⁹⁴ In der vorliegenden Arbeit war der Krankheitsverlauf der MSA-Patienten mit 1,5 bis 7 Jahren deutlich kürzer und entsprach damit den Daten zur mittleren Überlebenszeit nach Diagnosestellung (5 bis 8 Jahre) wie sie in der entsprechenden Literatur angegeben wird.^{10, 12} Die Forscher kommen zu dem Schluss, dass mit zunehmender Krankheitsdauer neuronale pathologische α -Synuclein-Einschlüsse im PNS bei MSA, einer im ZNS durch GCI gekennzeichnete Erkrankung, entstehen können.⁹⁴ Inwiefern die sympathischen Nervenfasern an den Zielorganen bei MSA-Patienten involviert sind, wurde bisher nicht untersucht und bietet einen Ansatz für weiterführende Studien. Zusammengefasst ist festzuhalten, dass bei MSA-Patienten mit einer Erkrankungsdauer von bis zu 7 Jahren, keine Phospho- α -Synuclein-Ablagerungen in den sympathischen kutanen Nervenfasern nachweisbar sind.

Bemerkenswerterweise fiel im Nervenfaszikel eines Patienten mit ET eine positive PSyn-Immunoreaktivität auf. Differenzialdiagnostisch ist dabei an Makrophagen zu denken, die eine positive Immunoreaktivität zeigten. Arvidson zeigte 1977 eine Anfärbung der endoneuralen Makrophagen durch die Meerettich-Peroxidase (HRP).¹⁴⁷ In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde in gleicher Weise HRP als Enzym der Substrat-Chromogen-Reaktion zur indirekten Visualisierung des Primärantikörpers PSyn verwendet. Gegen den Verdacht eines Makrophagen spricht jedoch das charakteristische feingepunktete Färbemuster von PSyn, zumal Makrophagen typischerweise größer sind. Nach einer weiteren Hypothese ist die möglicherweise frühe Form der LBD, die sogenannte inzidentelle LBD (ILBD), verantwortlich. Denn auch Ikemura et al. zeigten bei Patienten mit LB-Stadium 0,5-II in bis zu 33% der Fälle die Lewy-Pathologie in der Haut auf.⁹⁹ Weitere Beispiele liefern die Ergebnisse von Bloch et al., die bei 98 zufälligen post mortalen ZNS-Untersuchungen 17 Fälle von ILBD identifizierten. Bei allen 17 Patienten konnte die α -Synuclein-Pathologie in den autonomen Kernen des thorakalen Rückenmarks, Hirnstamms und olfaktorischen Nerven, sowie bei 14 Patienten in den sympathischen Ganglien detektiert werden.¹⁴⁸ Letztlich kann zum jetzigen Zeitpunkt die positive PSyn-Immunoreaktivität im Nervenfaszikel eines Kontroll-Patienten mit ET nicht sicher zugeordnet werden. In Zukunft sind deshalb weiterführende Untersuchungen wünschenswert, die die sympathischen Nervenfasern der Haut bei Patienten mit LBD und der (bisher klinisch nicht identifizierbaren) ILBD, prä mortal auf eine α -Synuclein-Pathologie und postmortal das ZNS zur Diagnosesicherung überprüfen.

4.2 Reduktion kutaner sympathischer Nervenfasern bei LBD

Die PGP 9.5-Antikörperfärbung demonstrierte bei Patienten mit LBD eine generelle Reduktion kutaner Nervenfasern der autonom innervierten Hautstrukturen, insbesondere am Schweißdrüsen-Endstück. Ein abnormales Innervationsmuster in der Dermis von IPS fanden auch Nolano et al.¹⁴⁹ Sie untersuchten vor dem Hintergrund sensorischer Beeinträchtigungen bei Morbus Parkinson die Innervation behaarter und unbehaarter Haut und stellten mittels des neuronalen Markers PGP 9.5 einen signifikanten Verlust epidermaler Nervenfasern sowie Hinweise auf einen regenerativen Prozess von epidermalen und dermalen Nervenfasern fest.¹⁴⁹ Dabei wurden autonome von sensorischen kutanen Neuronen nicht differenziert. Ein solches differenziertes Vorgehen praktizierten Dabby et al. und untersuchten mittels PGP 9.5 die Beinhaut von 22 Parkinson-Patienten und 19 gesunden Kontrollen.¹⁵⁰ Das Resultat der qualitativ-subjektiven Bewertung der paraffineingebetteten Proben zeigte bei Parkinson-Patienten einen Verlust der Nervenfasern der Blutgefäße und der Mm. arrectores pilorum und gegensätzlich zur vorliegenden Studie keinen Unterschied in der Schweißdrüsen-Innervation. Offensichtlich wurde die differenzierte Innervation der anatomischen Anteile der Schweißdrüse nicht berücksichtigt, wodurch die Diskrepanz zu erklären wäre. Denn bereits Kennedy et al. wiesen auf eine verminderte Innervation der Schweißdrüsen-Ausführungsgänge im Vergleich zu der von Endstücken hin.¹³⁸ Diese Beobachtung konnte auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Gegensatz zu den genannten Studien konnten Kawada et al. keinen Unterschied des Innervationsmusters der Schweißdrüsen zwischen Parkinson-Patienten und Kontrollen feststellen.⁴³ Methodisch bleibt allerdings unklar, ob es sich um Gefrierschnitt- oder Paraffinschnittproben handelte und ob anhand von Positiv-Kontrollen zuvor das korrekte Bindungsverhalten der Antikörper überprüft wurde.

Bei Patienten mit MSA konstatierten Donadio et al. ein erhaltenes cholinerges und adrenerges Innervationsmuster der Kutis.¹⁵¹ Novak et al. verglichen die Hautinnervation zwischen IPS und MSA und bemerkten bei IPS-Patienten eine quantitative Verminderung der dermalen Nervenfaserdichte, wobei sie ebenso nicht nach Faserqualitäten (sensorisch und autonom) unterschieden. Die Arbeitsgruppe quantifizierte die Nervenfasern nach Separation der Dermis von der Epidermis (dermal sheet preparations) und anschließend anhand einer dreidimensionalen Darstellung der dermalen Nervenfasern mittels Anti-p75 (ein panaxonaler Marker, ähnlich Anti-PGP 9.5).¹⁵² Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigten bei Nutzung

einer weniger zeit- und materialaufwendigen semiquantitativen Methode analog zu Novak et al. eine verminderte dermale Innervation bei Patienten mit LBD im Vergleich zu MSA-Patienten.

Eine Denervation autonomer kutaner Strukturen kann prinzipiell durch Einflussfaktoren wie Alter oder Begleiterkrankungen hervorgerufen werden. Um eine derartige Einwirkung zu vermeiden, wurden Patienten mit Erkrankungen, die potenziell das autonome Nervensystem betreffen (z. B. ein manifester Diabetes mellitus) von der Studienteilnahme ausgeschlossen. Das Alter hatte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die kutane Denervierung bei Patienten mit LBD. Im Einklang dazu konnten auch Dabby et al. keinen Zusammenhang zwischen Nervenfaserverlust und Alter bei IPS-Patienten feststellen. Folglich liegt es nahe, dass die Neurodegeneration sympathischer Hautnerven bei Patienten mit LBD die Konsequenz eines anderen Sachverhalts darstellt, worauf im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

4.3 Relation von kutaner sympathischer Neurodegeneration und Lewy-Pathologie

Die Stärke der dermalen Immunoreaktivität für PSyn in sympathischen Nervenfasern korreliert mit einer Minderung dieser für PGP 9.5. Daraus folgt, dass in den wenigen noch vorhandenen Nervenfasern ein höherer Gehalt an phosphoryliertem α -Synuclein vorliegt. Somit liegt die Vermutung nahe, dass der Nervenfaserverlust als Folge der Ablagerung des pathologischen α -Synucleins auftritt. Orimo et al. untersuchten diesen Sachverhalt an myokardialen sympathischen Nervenfasern und stellten die Hypothese einer zentripetalen Degeneration auf (siehe Tabelle 21).¹⁵³ Demnach weisen frühe LBD-Krankheitsstadien, wie die ILBD, den höchsten Schweregrad an α -Synuclein-Aggregaten bei erhaltenen sympathischen myokardialen Nervenfasern auf.¹⁵³ Weiterhin wurde gezeigt, dass mit Zunahme der α -Synuclein-Ablagerungen die Anzahl der Nervenfasern reduziert wird und die α -Synuclein-Aggregate zusammen mit den absterbenden Axonen verschwinden. Erst mit fortschreitendem Krankheitsverlauf und zunehmender Reduktion der distalen Fasern werden die Somata in den paravertebralen sympathischen Ganglien in die pathologische Aggregation einbezogen.^{153, 154} Anders verhält es sich bei Patienten mit MSA. Zum einen sind bei der MSA im peripheren Nervensystem in der Regel keine α -Synuclein-Aggregate nachweisbar, selten (1/15) wiesen Patienten eine konkurrierende LB-Pathologie im sympathischen Ganglion auf.¹⁵³ Zum anderen besteht bei MSA keine ausgeprägte, sondern allenfalls eine milde Degeneration kardialer autonomer Neurone.⁹⁶ Diese wurde neuropathologisch und nuklearmedizinisch durch die ¹²³I-MIBG

Myokard-Szintigraphie bestätigt. Orimo et al. erklären die verminderte Traceraufnahme bei MSA dadurch, dass ausgehend von der präganglionären sympathischen Affektion ein transsynaptischer Mechanismus sekundär eine Degeneration postganglionärer Neurone hervorruft beziehungsweise eine konkurrierende LB-Pathologie in den sympathischen Ganglien vorliegt, die den Degenerationsprozess akzeleriert.^{96, 155}

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Degeneration kutaner sympathischer Nervenfasern spezifisch für Patienten mit LBD ist und durch die pathologische Akkumulierung von phosphoryliertem α -Synuclein induziert sein könnte. In der vorliegenden Arbeit waren MSA-Erkrankte nicht von der kutanen sympathischen Neurodegeneration betroffen, obwohl nuklearmedizinisch zum Teil eine Verminderung der kardialen noradrenergen Neurone vorlag. Inwiefern sich die Theorie der distal beginnenden neuronalen Degeneration praktisch auf die Degeneration dermalen sympathischer Nerven übertragen lässt, kann durch die vorliegende Studie nicht beurteilt werden und obliegt weiterführenden Studien mit einer größeren Patientenanzahl und ausgedehnteren Biopsielokalisationen in heterogenen Erkrankungsstadien.

Tabelle 21: Vergleich der Degenerationsmarker an kardialen sympathischen Nervenfasern bei α -Synucleinopathien. Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf der LBD kommt es zu einer Zunahme der kardialen Denervierung und Abnahme der α -Synuclein-Aggregate. Bei Patienten mit MSA besteht primär kein kardialer Nervenfaserverlust und α -Synuclein ist nicht nachweisbar. Unauffällige kardiale postganglionäre Neurone finden sich bei gesunden Kontrollen (eigene Darstellung nach Orimo et al.¹⁵³).

	Gesunde	ILBD früh	ILBD spät	LBD	MSA
Axon	- / -	+ / +++	++ / ++	+++ / +	- / -
Perikaryon	- / -	- / +	- / ++	+ / +++	- / -

Grad der Denervierung / Grad der α -Synuclein-Aggregate.
 (-) keine; (+) wenig; (++) mäßig; (+++) viel.
ILBD Inzidentelle Lewy body-Erkrankung; *LBD* Lewy body-Erkrankung; *MSA* Multisystematrophie.

4.4 Diskussion der Tyrosinhydroxylase-Immunoreaktivität

In der Haut werden sympathische, adrenerge Neuropeptid Y (NPY) enthaltende Neurone und cholinerge, vasoactive intestinale Polypeptid / Calcitonin gene related peptide (VIP / CGRP) Neurone unterschieden.¹¹⁷ Demgegenüber besitzen sensorische Fasern eine Vielfalt an peptidergen Neurotransmittern.¹¹⁷ Aufgrund dessen wurde neben der PGP 9.5-Antikörperfärbung eine spezifische Färbung für die TH der sympathische Nervenfasern durchgeführt. Obwohl TH-positive dermale Nervenfasern - anders als erwartet - reichlicher bei Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen (Total TH MSA 37,5%, LBD 31%) im Vergleich zu Patienten

mit ET (20%) vorhanden waren, waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Bei näherer Betrachtung der Einzelscores fällt dagegen auf, dass sich die TH-Expression in den Schweißdrüsen-Endstücken zwar (knapp) signifikant ($p=0,043$) zwischen den Erkrankungen unterschied, jedoch in den Einzelvergleichen nicht ermittelt werden konnte, zwischen welchen Gruppen ein Unterschied hervorgerufen wurde. Dabei ist zu beachten, dass die Fallzahlen der detektierten Hautelemente in der vorliegenden Untersuchung gering ausfielen, wodurch die Stärke statistischer Tests gemindert wird. Ebenso konnten Donadio et al. in ihrer vorangegangenen Studie keinen Unterschied in der adrenergen dermalen Innervation zwischen MSA- und gesunden Kontroll-Patienten feststellen.¹⁵¹ Dagegen zeigten Orimo et al. an Myokardgewebe eine Reduktion TH-positiver Nervenfasern bei gleichzeitigem Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein bei Patienten mit LBD Stadium III.¹⁵⁴ Die Nervenfasern der Schweißdrüse stellen eine Besonderheit im sympathischen Nervensystem dar, weil sie nicht Noradrenalin, sondern Acetylcholin als Transmitter verwenden. Daneben exprimieren sie jedoch auch alle Proteine für eine vollständige noradrenerge Funktion, inklusive Tyrosinhydroxylase, Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase, Dopamin- β -Hydroxylase und den vesikulären Monoamin Transporter (VMAT 2). Im Zuge der Nervenfasern-Regenerierung zeichnet sich eine Veränderung der Neuropeptid- und Neurotransmitter-Zusammensetzung in den Neuronen ab.^{149, 156, 157} Bei sensorischen Nervenfasern wird davon ausgegangen, dass die veränderte Peptid-Expression eine Adaption des Organismus zum Fortbestehen der Neurone und deren Regeneration darstellt.¹⁵⁸ Tierexperimentelle Studien zeigten eine Reinnervation der Schweißdrüse mit verändertem Immunoreaktivitätsprofil nach einer Nervendurchtrennung.^{157, 159} Obwohl eine Reduktion sudomotorischer Axone vorliegt, kann bei normaler Schweißdrüsenzahl die gleiche Sekretionsmenge erreicht werden, nicht zuletzt aufgrund ihres hohen Potenzials kollaterale Aussprossungen zu bilden.^{160, 161} Es kommt dabei nicht zu einer Denervierungs-Hypersensitivität der Schweißdrüsen.¹⁶¹ Unter diesen Erkenntnissen wäre theoretisch eine vermehrte Expression der TH zur Hochregulierung der Transmittersynthese im Zuge der Reinnervation der Zielorgane als Antwort auf die verminderte Anzahl intakter Nervenfasern denkbar. Inwiefern diese Hypothese bei neurodegenerativen Erkrankungen wie LBD und MSA zutrifft, könnte in zukünftigen Studien experimentell geprüft werden.

4.5 Diskussion der Methode

Die Hautbiopsie stellt eine etablierte Methode zur Diagnostik peripherer Neuropathien, speziell der kleinen Nervenfasern, dar. In der vorliegenden Arbeit wurde sie durchgeführt, um die gewonnenen Proben mittels zweidimensionaler Schnittbilder immunhistochemisch und mikroskopisch zu untersuchen. Bei den Ziel-Hautstrukturen handelt es sich um dreidimensionale Gebilde, so dass mittels Schnittbild lediglich ein Ausschnitt des komplexen Hautplexus erfasst werden kann.¹⁶² Dies hat den Nachteil, dass außerhalb der Schnittebene gelegene Hautnervenfasern und Hautstrukturen nicht zur Darstellung kommen, wodurch eine quantifizierbare Bewertung nur eingeschränkt möglich ist. Weiterhin bietet die Verwendung eines semiquantitativen Scores als subjektive Methode eine gewisse Ungenauigkeit. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Anteil der Innervation der sympathisch innervierten Hautelemente (Schweißdrüsen, Haarmuskeln und Arteriolen) an der Gesamtnervation bestimmt, um den Grad der Denervation zu bemessen. In der Neuropathie-Diagnostik begegnete man diesem Problem, indem man in mehreren Schnittproben die Überkreuzungen von immunhistochemisch dargestellten Nervenfasern an der dermal-epidermalen Grenzzone auszählte und somit die intraepidermale Nervenfaserdichte pro Millimeter Schnittbildoberfläche berechnete.¹¹⁶ Referenzwerte sind für verschiedene Körperregionen erfasst worden.¹¹⁵ Im Gegensatz dazu blieb die morphometrische Analyse der subepidermalen Innervation, insbesondere der autonomen Nervenfasern, lange Zeit unbeachtet und auf qualitative Einschätzungen beschränkt.¹¹⁶ Einige Autoren quantifizierten die Innervationsdichte der Schweißdrüsen anhand der Faserlänge, andere bezogen die Anzahl der Nervenfasern auf die Größe des Innervationsgebietes oder auf die Anzahl der Zellkerne der innervierten Hautstruktur, oder es wurden semiquantitative Scores angewandt.^{150, 163-165} In speziellen Laboren mit entsprechenden Ausrüstungen wurden bereits dreidimensionale Verfahren zur Quantifizierung der autonomen Hautinnervation erprobt. Beispielsweise nutzten Gibbons et al. für die Erfassung der Schweißdrüsen-Innervation serielle 50µm Gefrierschnitte, die sie nach Färbung mit Anti-PGP 9.5 durch ein konfokales Mikroskop untersuchten, digital identifizierten und auf ein Punkt-Gitternetz projizierten.¹⁶⁶ Die Kreuzungen von Nervenfasern mit einem Punkt wurden stufenweisen in einem drei-dimensionalen Bild als sweat gland nerve fiber density (SGNFD) erfasst und die Faserlänge ermittelt. In einer kürzlich publizierten Studie wurde, neben dem beschriebenen Verfahren, die Dichte der pilomotorischen Fasern als Mittelwert der Nervenfasern (dargestellt mittels Anti-PGP 9.5) untersucht, die 5 horizontale Linien im Querschnitt eines Haarmuskels kreuzen.¹⁴⁶ Darüber hinaus gelang durch eine zweite immunhistochemische

Färbung die Berechnung des Anteils der Nervenfasern, die PSyn enthielten. Novak et al. verfolgten den Ansatz der räumlichen Darstellung der Haut.¹⁵² Mithilfe der „dermal sheet preparations“ nach Tschachler et al. und der „phase-symmetry method“ (zur Verstärkung der Nervenfaserdarstellung) untersuchten sie 1 mm große Hautproben von MSA- und IPS-Patienten.^{152, 162} Der Vorteil dreidimensionaler Methoden besteht darin, dass die Ausdehnung der Hautstruktur und die Komplexität des dermalen Plexus räumlich erfasst werden kann. Derzeitig limitieren die Notwendigkeit spezieller Geräte und Zeitintensität der Methoden (z.B. 30-40 Stunden für die SGNFD) ihren Einsatz in der Standard-Praxis.

Zusammengefasst gelingt die Quantifizierung autonomer dermalen Nervenfasern an großen Gefrierschnitten bzw. der gesamten Dermis genauer, als an dünnen Paraffinschnitten. Dagegen sind strukturelle Nervenfaserveränderungen, insbesondere im Sinne von pathologischen α -Synuclein-Ablagerungen, aufgrund ihrer geringen Größe anhand von (3 μ m) dünnen Paraffinschnitten gut detektierbar. Der Biopsieort zur Untersuchung der dermalen sympathischen Nervenfasern auf phosphoryliertes α -Synuclein sollte in Abhängigkeit der Lokalisation autonom innervierter Hautelemente gewählt werden.

4.6 Fazit

In dieser Studie wurden erstmals intravital gewonnene Hautproben von LBD- und MSA-Patienten hinsichtlich der Phospho- α -Synuclein-Expression in den autonomen Nervenfasern untersucht und direkt miteinander verglichen. Durch den Nachweis einer pathologischen Akkumulierung von phosphoryliertem α -Synuclein in den sympathischen, dermalen Nervenfasern bei Patienten mit LBD gelang neuropathologisch eine optimale Abgrenzung gegenüber Patienten mit MSA oder ET bei Lebenden. Anhand der immunhistochemischen Untersuchung der Haut scheint gegenüber der klinischen und apparativen Zusatzdiagnostik die Diagnosestellung frühzeitiger und genauer zu gelingen.

Die Korrelation von neuronaler Degeneration - angezeigt durch PGP 9.5 - und dem Nachweis von phosphoryliertem α -Synuclein in sympathischen dermalen Nervenfasern bei Patienten mit LBD stützt die Annahme, dass die Neurodegeneration im PNS von LBD-Patienten durch den mangelhaften intrazellulären Abbau von modifiziertem α -Synuclein hervorgerufen wird. In Zukunft ist es wünschenswert, in weiterführenden Studien mit einer größeren Anzahl an Patienten in unterschiedlichen Erkrankungsstadien und verschiedenen Biopsielokalisationen, prä- und postmortal das Vorkommen und die intraneuronale Ausbreitung von pathologischem α -Synuclein im ZNS und PNS zu untersuchen und damit den pathophysiologischen Zusammenhang von phosphoryliertem α -Synuclein und der Neurodegeneration zu klären.

Am volaren Unterarm befindet sich behaarte Haut mit einer auffällig hohen Dichte ekkriner Schweißdrüsen, weshalb diese Region für die Untersuchung sympathischer Hautnervenfasern sehr gut geeignet ist. Mittels der bereits in der klinischen Routinediagnostik etablierten Technik, bestehend aus Hautbiopsie und immunhistochemischer Untersuchung sympathischer Nervenfasern anhand des Biomarkers phosphoryliertes α -Synuclein am Färbeautomaten, resultiert eine einfach durchführbare, zeitrationalisierende und kostenüberschaubare morphologische Methode, die Synucleinopathien LBD und MSA künftig sicherer voneinander unterscheiden zu können.

5 Literaturverzeichnis

1. *de Lau LML, Breteler MMB.* Epidemiology of Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 2006;5:525-535.
2. *Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, et al.* Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology* 2000;55:1358-1363.
3. *Goedert M, Spillantini MG, Del Tredici K, Braak H.* 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol* 2013;9:13-24.
4. *Albin RL, Young AB, Penney JB.* The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 1989;12:366-375.
5. *Gibb WR, Lees AJ.* The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988;51:745-752.
6. *Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ.* Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992;55:181-184.
7. *Hughes AJ, Daniel SE, Lees AJ.* Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:1497-1499.
8. *Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ.* The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 2002;125:861-870.
9. *Gilman S, Wenning GK, Low PA, et al.* Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 2008;71:670-676.
10. *Bjornsdottir A, Gudmundsson G, Blondal H, Olafsson E.* Incidence and prevalence of multiple system atrophy: a nationwide study in Iceland. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2013;84:136-140.
11. *Linder J, Stenlund H, Forsgren L.* Incidence of Parkinson's disease and parkinsonism in northern Sweden: A population-based study. *Mov Disord* 2010;25:341-348.
12. *Schrag A, Wenning GK, Quinn N, Ben-Shlomo Y.* Survival in multiple system atrophy. *Mov Disord* 2008;23:294-296.
13. *Diem-Zangerl A, Seppi K, Wenning GK, et al.* Mortality in Parkinson's disease: A 20-year follow-up study. *Mov Disord* 2009;24:819-825.
14. *Lees AJ, Hardy J, Revesz T.* Parkinson's disease. *Lancet* 2009;373:2055-2066.
15. *Fahn S, Oakes D, Shoulson I, et al.* Levodopa and the Progression of Parkinson's Disease. *N Engl J Med* 2004;351:2498-2508.
16. *Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W.* Multiple system atrophy. *Lancet Neurol* 2004;3:93-103.
17. *Storch A, Schneider CB, Wolz M, et al.* Nonmotor fluctuations in Parkinson disease: severity and correlation with motor complications. *Neurology* 2013;80:800-809.
18. *Khoo TK, Yarnall AJ, Duncan GW, et al.* The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology* 2013;80:276-281.
19. *Abbott RD, Petrovitch H, White LR, et al.* Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 2001;57:456-462.
20. *Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, et al.* Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PloS One* 2010;5:e12728.
21. *Muller B, Larsen JP, Wentzel-Larsen T, Skeie GO, Tysnes OB.* Autonomic and sensory symptoms and signs in incident, untreated Parkinson's disease: frequent but mild. *Mov Disord* 2011;26:65-72.

22. *Wenning GK, Geser F, Krismer F, et al.* The natural history of multiple system atrophy: a prospective European cohort study. *Lancet Neurol* 2013;12:264-274.
23. *Barone P, Antonini A, Colosimo C, et al.* The PRIAMO study: A multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24:1641-1649.
24. *Reimann M, Schmidt C, Herting B, et al.* Comprehensive autonomic assessment does not differentiate between Parkinson's disease, multiple system atrophy and progressive supranuclear palsy. *J Neural Transm* 2010;117:69-76.
25. *Benarroch EE.* The central autonomic network: functional organization, dysfunction, and perspective. *Mayo Clin Proc* 1993;68:988-1001.
26. *Brooks DJ, Seppi K.* Proposed neuroimaging criteria for the diagnosis of multiple system atrophy. *Mov Disord* 2009;24:949-964.
27. *Plotkin M, Amthauer H, Klaffke S, et al.* Combined 123I-FP-CIT and 123I-IBZM SPECT for the diagnosis of parkinsonian syndromes: study on 72 patients. *J Neural Transm* 2005;112:677-692.
28. *Mantysaari M, Kuikka J, Mustonen J, et al.* Noninvasive detection of cardiac sympathetic nervous dysfunction in diabetic patients using [123I]metaiodobenzylguanidine. *Diabetes* 1992;41:1069-1075.
29. *Merlet P, Valette H, Dubois-Rande JL, et al.* Prognostic value of cardiac metaiodobenzylguanidine imaging in patients with heart failure. *J Nucl Med* 1992;33:471-477.
30. *Yoshita M.* Differentiation of idiopathic Parkinson's disease from striatonigral degeneration and progressive supranuclear palsy using iodine-123 metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy. *J Neurol Sci* 1998;155:60-67.
31. *Orimo S, Ozawa E, Nakade S, Sugimoto T, Mizusawa H.* (123)I-metaiodobenzylguanidine myocardial scintigraphy in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999;67:189-194.
32. *Hirayama M, Hakusui S, Koike Y, et al.* A scintigraphical qualitative analysis of peripheral vascular sympathetic function with meta-[123I]iodobenzylguanidine in neurological patients with autonomic failure. *J Auton Nerv Syst* 1995;53:230-234.
33. *Courbon F, Brefel-Courbon C, Thalamas C, et al.* Cardiac MIBG scintigraphy is a sensitive tool for detecting cardiac sympathetic denervation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2003;18:890-897.
34. *Kollensperger M, Seppi K, Liener C, et al.* Diffusion weighted imaging best discriminates PD from MSA-P: A comparison with tilt table testing and heart MIBG scintigraphy. *Mov Disord* 2007;22:1771-1776.
35. *Chung EJ, Lee WY, Yoon WT, Kim BJ, Lee GH.* MIBG scintigraphy for differentiating Parkinson's disease with autonomic dysfunction from Parkinsonism-predominant multiple system atrophy. *Mov Disord* 2009;24:1650-1655.
36. *Treglia G, Cason E, Stefanelli A, et al.* MIBG scintigraphy in differential diagnosis of Parkinsonism: a meta-analysis. *Clin Auton Res* 2012;22:43-55.
37. *Katzenschlager R, Head J, Schrag A, Ben-Shlomo Y, Evans A, Lees AJ.* Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology* 2008;71:474-480.
38. *Bouwman AE, Vlaar AM, Srujijes K, Mess WH, Weber WE.* Transcranial sonography for the discrimination of idiopathic Parkinson's disease from the atypical parkinsonian syndromes. *Int Rev Neurobiol* 2010;90:121-146.
39. *Sandroni P, Ahlskog JE, Fealey RD, Low PA.* Autonomic involvement in extrapyramidal and cerebellar disorders. *Clin Auton Res* 1991;1:147-155.

40. *Kimpinski K, Iodice V, Burton DD, et al.* The role of autonomic testing in the differentiation of Parkinson's disease from multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 2012;317:92-96.
41. *Low PA.* Composite autonomic scoring scale for laboratory quantification of generalized autonomic failure. *Mayo Clin Proc* 1993;68:748-752.
42. *Low PA.* Evaluation of sudomotor function. *Clin Neurophysiol* 2004;115:1506-1513.
43. *Kawada M, Tamada Y, Simizu H, et al.* Reduction in QSART and vasoactive intestinal polypeptide expression in the skin of Parkinson's disease patients and its relation to dyshidrosis. *J Cutan Pathol* 2009;36:517-521.
44. *Lipp A, Sandroni P, Ahlskog JE, et al.* Prospective differentiation of multiple system atrophy from Parkinson disease, with and without autonomic failure. *Arch Neurol* 2009;66:742-750.
45. *Riley DE, Chelimsky TC.* Autonomic nervous system testing may not distinguish multiple system atrophy from Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:56-60.
46. *Furness JB.* The organisation of the autonomic nervous system: Peripheral connections. *Auton Neurosci* 2006;130:1-5.
47. *Parkinson J.* An Essay on the Shaking Palsy. London: Sherwood, Neely, and Jones, 1817.
48. *Lewy FH.* Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In: Springer, ed. *Handbuch der Neurologie*. Berlin, 1912: 920-933.
49. *Lewy FH.* Die Lehre vom Tonus und der Bewegung: zugleich systematische Untersuchungen zur Klinik, Physiologie, Pathologie und Pathogenese der Paralysis Agitans. Berlin: Springer, 1923.
50. *Bellucci A, Zaltieri M, Navarria L, Grigoletto J, Missale C, Spano P.* From α -synuclein to synaptic dysfunctions: New insights into the pathophysiology of Parkinson's disease. *Brain Res* 2012;1476:183-202.
51. *Holdorff B.* Friedrich Heinrich Lewy (1885–1950) and His Work. *J Hist Neurosci* 2002;11:19-28.
52. *Goldman JE, Yen SH, Chui FC, Peress NS.* Lewy bodies of Parkinson's disease contain neurofilament antigens. *Science* 1983;221:1082-1084.
53. *Kuzuhara S, Mori H, Izumiyama N, Yoshimura M, Ihara Y.* Lewy bodies are ubiquitinated. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Acta Neuropathol* 1988;75:345-353.
54. *Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997;276:2045-2047.
55. *Kruger R, Kuhn W, Muller T, et al.* Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet* 1998;18:106-108.
56. *Zarranz JJ, Alegre J, Gomez-Esteban JC, et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol* 2004;55:164-173.
57. *Singleton AB, Farrer M, Johnson J, et al.* Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003;302:841.
58. *Miller DW, Hague SM, Clarimon J, et al.* Alpha-synuclein in blood and brain from familial Parkinson disease with SNCA locus triplication. *Neurology* 2004;62:1835-1838.
59. *Chartier-Harlin MC, Kachergus J, Roumier C, et al.* Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease. *Lancet* 2004;364:1167-1169.
60. *Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VMY, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.* α -synuclein in Lewy bodies. *Nature* 1997;388:839-840.
61. *Baba M, Nakajo S, Tu PH, et al.* Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 1998;152:879-884.

62. *Duffy PE, Tennyson VM.* Phase and Electron Microscopic Observations of Lewy Bodies and Melanin Granules in the Substantia Nigra and Locus Caeruleus in Parkinson's Disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 1965;24:398-414.
63. *Roy S, Wolman L.* Ultrastructural observations in Parkinsonism. *J Pathol* 1969;99:39-44.
64. *Okazaki H, Lipkin LE, Aronson SM.* Diffuse Intracytoplasmic Ganglionic Inclusions (Lewy Type) Associated With Progressive Dementia and Quadriparesis in Flexion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1961;20:237-244.
65. *Kosaka K, Oyanagi S, Matsushita M, Hori A, Iwase S.* Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. *Acta Neuropathol* 1976;36:221-233.
66. *Braak H, Braak E, Yilmazer D, et al.* Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 1994;88:493-500.
67. *Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M.* α -Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6469-6473.
68. *Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RAI, Jansen Steur ENH, Braak E.* Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2003;24:197-211.
69. *Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM.* The substantia nigra of the human brain: II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain* 1999;122:1437-1448.
70. *Braak H, Braak E.* Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol* 2000;247(Suppl 2):II3-10.
71. *Jellinger KA.* Neuropathological spectrum of synucleinopathies. *Mov Disord* 2003;18(Suppl 6):S2-12.
72. *Braak H, Bohl JR, Müller CM, Rüb U, de Vos RAI, Del Tredici K.* Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 2006;21:2042-2051.
73. *Jellinger KA.* Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: Evaluation and changes of concepts. *Mov Disord* 2012;27:8-30.
74. *Braak H, de Vos RAI, Bohl J, Del Tredici K.* Gastric α -synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 2006;396:67-72.
75. *Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K.* Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm* 2003;110:517-536.
76. *Orimo S, Uchihara T, Kanazawa T, et al.* Unmyelinated axons are more vulnerable to degeneration than myelinated axons of the cardiac nerve in Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011;37:791-802.
77. *Wakabayashi K, Mori F, Tanji K, Orimo S, Takahashi H.* Involvement of the peripheral nervous system in synucleinopathies, tauopathies and other neurodegenerative proteinopathies of the brain. *Acta Neuropathol* 2010;120:1-12.
78. *Jellinger KA.* A critical evaluation of current staging of α -synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792:730-740.
79. *Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttila T, Autere JM, Alafuzoff I.* Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* 2005;57:82-91.
80. *Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K.* Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 2004;318:121-134.
81. *Wakabayashi K, Takahashi H.* The intermediolateral nucleus and Clarke's column in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 1997;94:287-289.
82. *Wakabayashi K, Takahashi H.* Neuropathology of autonomic nervous system in Parkinson's disease. *Eur Neurol* 1997;38 Suppl 2:2-7.

83. *Graham JG, Oppenheimer DR.* Orthostatic hypotension and nicotine sensitivity in a case of multiple system atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1969;32:28-34.
84. *Papp MI, Kahn JE, Lantos PL.* Glial cytoplasmic inclusions in the CNS of patients with multiple system atrophy (striatonigral degeneration, olivopontocerebellar atrophy and Shy-Drager syndrome). *J Neurol Sci* 1989;94:79-100.
85. *Wakabayashi K, Yoshimoto M, Tsuji S, Takahashi H.* α -Synuclein immunoreactivity in glial cytoplasmic inclusions in multiple system atrophy. *Neurosci Lett* 1998;249:180-182.
86. *Trojanowski JQ, Revesz T.* Proposed neuropathological criteria for the post mortem diagnosis of multiple system atrophy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2007;33:615-620.
87. *Mori F, Inenaga C, Yoshimoto M, et al.* Alpha-synuclein immunoreactivity in normal and neoplastic Schwann cells. *Acta Neuropathol* 2002;103:145-151.
88. *Kato S, Nakamura H.* Cytoplasmic argyrophilic inclusions in neurons of pontine nuclei in patients with olivopontocerebellar atrophy: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Acta Neuropathol* 1990;79:584-594.
89. *Papp MI, Lantos PL.* The distribution of oligodendroglial inclusions in multiple system atrophy and its relevance to clinical symptomatology. *Brain* 1994;117:235-243.
90. *Jellinger KA, Seppi K, Wenning GK.* Grading of neuropathology in multiple system atrophy: proposal for a novel scale. *Mov Disord* 2005;20 Suppl 12:S29-36.
91. *Sung JH, Mastri AR, Segal E.* Pathology of Shy-Drager syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 1979;38:353-368.
92. *Wenning GK, Tison F, Elliott L, Quinn NP, Daniel SE.* Olivopontocerebellar pathology in multiple system atrophy. *Mov Disord* 1996;11:157-162.
93. *Benarroch EE, Smithson IL, Low PA, Parisi JE.* Depletion of catecholaminergic neurons of the rostral ventrolateral medulla in multiple systems atrophy with autonomic failure. *Ann Neurol* 1998;43:156-163.
94. *Sone M, Yoshida M, Hashizume Y, Hishikawa N, Sobue G.* alpha-Synuclein-immunoreactive structure formation is enhanced in sympathetic ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2005;110:19-26.
95. *Nishie M, Mori F, Fujiwara H, et al.* Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in the brain and peripheral ganglia of patients with multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2004;107:292-298.
96. *Orimo S, Kanazawa T, Nakamura A, et al.* Degeneration of cardiac sympathetic nerve can occur in multiple system atrophy. *Acta Neuropathol* 2007;113:81-86.
97. *Jellinger KA.* A critical reappraisal of current staging of Lewy-related pathology in human brain. *Acta Neuropathol* 2008;116:1-16.
98. *Donadio V, Nolano M, Elam M, et al.* Anhidrosis in multiple system atrophy: A preganglionic sudomotor dysfunction? *Mov Disord* 2008;23:885-888.
99. *Ikemura M, Saito Y, Sengoku R, et al.* Lewy Body Pathology Involves Cutaneous Nerves. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;72:945-953.
100. *Goedert M, Spillantini MG.* Lewy body diseases and multiple system atrophy as alpha-synucleinopathies. *Mol Psychiatry* 1998;3:462-465.
101. *Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Cairns NJ, Lantos PL, Goedert M.* Filamentous α -synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurosci Lett* 1998;251:205-208.
102. *Jakes R, Spillantini MG, Goedert M.* Identification of two distinct synucleins from human brain. *FEBS Lett* 1994;345:27-32.
103. *Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, et al.* The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 1995;14:467-475.

104. *Nemani VM, Lu W, Berge V, et al.* Increased expression of alpha-synuclein reduces neurotransmitter release by inhibiting synaptic vesicle reclustering after endocytosis. *Neuron* 2010;65:66-79.
105. *Bendor Jacob T, Logan Todd P, Edwards Robert H.* The Function of α -Synuclein. *Neuron* 2013;79:1044-1066.
106. *Lotharius J, Brundin P.* Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and [alpha]-synuclein. *Nat Rev Neurol* 2002;3:932-942.
107. *Mori F, Tanji K, Yoshimoto M, Takahashi H, Wakabayashi K.* Demonstration of alpha-synuclein immunoreactivity in neuronal and glial cytoplasm in normal human brain tissue using proteinase K and formic acid pretreatment. *Exp Neurol* 2002;176:98-104.
108. *Takeda A, Hashimoto M, Mallory M, et al.* Abnormal distribution of the non-Abeta component of Alzheimer's disease amyloid precursor/alpha-synuclein in Lewy body disease as revealed by proteinase K and formic acid pretreatment. *Lab Invest* 1998;78:1169-1177.
109. *Ueda K, Fukushima H, Masliah E, et al.* Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:11282-11286.
110. *Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, et al.* [alpha]-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 2002;4:160-164.
111. *Smith WW, Margolis RL, Li X, et al.* Alpha-synuclein phosphorylation enhances eosinophilic cytoplasmic inclusion formation in SH-SY5Y cells. *J Neurosci* 2005;25:5544-5552.
112. *Stefanis L.* alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012;2:a009399.
113. *Azeredo da Silveira S, Schneider BL, Cifuentes-Diaz C, et al.* Phosphorylation does not prompt, nor prevent, the formation of α -synuclein toxic species in a rat model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2009;18:872-887.
114. *Chen L, Feany MB.* [alpha]-Synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease. *Nat Neurosci* 2005;8:657-663.
115. *Lauria G, Hsieh ST, Johansson O, et al.* European Federation of Neurological Societies/Peripheral Nerve Society Guideline on the use of skin biopsy in the diagnosis of small fiber neuropathy. Report of a joint task force of the European Federation of Neurological Societies and the Peripheral Nerve Society. *Eur J Neurol* 2010;17:903-912, e944-949.
116. *Lauria G, Lombardi R, Camozzi F, Devigili G.* Skin biopsy for the diagnosis of peripheral neuropathy. *Histopathology* 2009;54:273-285.
117. *Dalsgaard CJ, Rydh M, Hægerstrand A.* Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibodies. *Histochem Cell Biol* 1989;92:385-390.
118. *Miki Y, Tomiyama M, Ueno T, et al.* Clinical availability of skin biopsy in the diagnosis of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2010;469:357-359.
119. *Beach TG, Adler CH, Sue LI, et al.* Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 2010;119:689-702.
120. *Gilman S, Low PA, Quinn N, et al.* Consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *J Neurol Sci* 1999;163:94-98.
121. *Oertel WH.* Parkinson-Syndrom und andere Bewegungsstörungen: Georg Thieme-Verlag KG, 2012.
122. *Rascol O, Schelosky L.* 123I-metaiodobenzylguanidine scintigraphy in Parkinson's disease and related disorders. *Mov Disord* 2009;24:S732-S741.

123. *Deuschl G, Bain P, Brin M.* Consensus statement of the Movement Disorder Society on Tremor. Ad Hoc Scientific Committee. *Mov Disord* 1998;13 Suppl 3:2-23.
124. *Schrezenmaier C, Gehrking JA, Hines SM, Low PA, Benrud-Larson LM, Sandroni P.* Evaluation of orthostatic hypotension: relationship of a new self-report instrument to laboratory-based measures. *Mayo Clin Proc* 2005;80:330-334.
125. *Low PA, Opfer-Gehrking TL, Proper CJ, Zimmerman I.* The effect of aging on cardiac autonomic and postganglionic sudomotor function. *Muscle Nerve* 1990;13:152-157.
126. *Taylor N, Machado-Moreira C.* Regional variations in transepidermal water loss, eccrine sweat gland density, sweat secretion rates and electrolyte composition in resting and exercising humans. *Extrem Physiol Med* 2013;2:4.
127. *Kumar GL, Rudbeck L.* Education Guide. Immunohistochemical Staining Methods. Fifth Edition, 2009.
128. *Brozman M.* Immunohistochemical analysis of formaldehyde- and trypsin- or pepsin-treated material. *Acta Histochem* 1978;63:251-260.
129. *Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, et al.* Accumulation of Phosphorylated [alpha]-Synuclein in Aging Human Brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:644-654.
130. SNCA synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) [Homo sapiens (human)] [online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6622>. Accessed 30.09.2013.
131. *Jackson P, Thompson RJ.* The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol Sci* 1981;49:429-438.
132. UCHL1 ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 (ubiquitin thiolesterase) [Homo sapiens (human)] [online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=7345>. Accessed 19.10.2013.
133. *Karanth SS, Springall DR, Kuhn DM, Levene MM, Polak JM.* An immunocytochemical study of cutaneous innervation and the distribution of neuropeptides and protein gene product 9.5 in man and commonly employed laboratory animals. *Am J Anat* 1991;191:369-383.
134. TH tyrosine hydroxylase [Homo sapiens (human)] [online]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7054#reference-sequences>. Accessed 19.10.2013.
135. *Tainio H, Vaalasti A, Rechart L.* The distribution of sympathetic adrenergic, tyrosine hydroxylase- and neuropeptide Y-immunoreactive nerves in human axillary sweat glands. *Histochemistry* 1986;85:117-120.
136. *Björklund H, Dalsgaard CJ, Jonsson CE, Hermansson A.* Sensory and autonomic innervation of non-hairy and hairy human skin. *Cell Tissue Res* 1986;243:51-57.
137. *Kanitakis J.* Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 2002;12:390-399.
138. *Kennedy WR, Wendelschafer-Crabb G, Brelje TC.* Innervation and vasculature of human sweat glands: an immunohistochemistry-laser scanning confocal fluorescence microscopy study. *J Neurosci* 1994;14:6825-6833.
139. *Sonnenschein RR.* Local Sweating in Man Induced by Intradermal Epinephrine. *Exp Biol Med* 1949;71:654-656.
140. *Haimovici H.* Evidence for Adrenergic Sweating in Man. *J Appl Physiol* 1950;2:512-521.
141. *Weihe E, Schütz B, Hartschuh W, Anlauf M, Schäfer MK, Eiden LE.* Coexpression of cholinergic and noradrenergic phenotypes in human and nonhuman autonomic nervous system. *J Comp Neurol* 2005;492:370-379.
142. *Gibbins I.* Functional organization of autonomic neural pathways. *Organogenesis* 2013;9:169-175.

143. *Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H.* Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1016-1019.
144. *Walker J.* Formaldehyde, 3 ed. Reinhold, New York: Am Chem Soc Monograph Series, 1964.
145. *Kiernan J.* Formaldehyde, formalin, paraformaldehyde and glutaraldehyde: What they are and what they do. *Micros Today* 2000;1 8-12.
146. *Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R.* α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81:1604-1610.
147. *Arvidson B.* Cellular uptake of exogenous horseradish peroxidase in mouse peripheral nerve. *Acta Neuropathol* 1977;37:35-41.
148. *Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M.* Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2006;32:284-295.
149. *Nolano M, Provitera V, Estraneo A, et al.* Sensory deficit in Parkinson's disease: evidence of a cutaneous denervation. *Brain* 2008;131:1903-1911.
150. *Dabby R, Djaldetti R, Shahmurov M, et al.* Skin biopsy for assessment of autonomic denervation in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 2006;113:1169-1176.
151. *Donadio V, Cortelli P, Elam M, et al.* Autonomic innervation in multiple system atrophy and pure autonomic failure. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:1327-1335.
152. *Novak P, Marya NB, Whren K, Bhawan J.* Dermal sheet preparations in the evaluation of dermal innervation in Parkinson's disease and multiple system atrophy. *J Cutan Pathol* 2009;36:296-301.
153. *Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, et al.* Axonal-synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 2008;131:642-650.
154. *Orimo S, Amino T, Itoh Y, et al.* Cardiac sympathetic denervation precedes neuronal loss in the sympathetic ganglia in Lewy body disease. *Acta Neuropathol* 2005;109:583-588.
155. *Daniel S.* The neuropathology and neurochemistry of multiple system atrophy. In: Mathias C, Bannister, SR, ed. *Autonomic failure*. Oxford: Oxford University Press, 1999: 321-328.
156. *Ramien M, Ruocco I, Cuello AC, St-Louis M, Ribeiro-Da-Silva A.* Parasympathetic nerve fibers invade the upper dermis following sensory denervation of the rat lower lip skin. *J Comp Neurol* 2004;469:83-95.
157. *Navarro X, Verdu E, Wendelschafer-Crabb G, Kennedy WR.* Immunohistochemical study of skin reinnervation by regenerative axons. *J Comp Neurol* 1997;380:164-174.
158. *Hokfelt T, Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z.* Messenger plasticity in primary sensory neurons following axotomy and its functional implications. *Trends Neurosci* 1994;17:22-30.
159. *Verdu E, Navarro X.* Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve injury. *Exp Neurol* 1997;146:187-198.
160. *Kennedy WR, Sakuta M.* Collateral reinnervation of sweat glands. *Ann Neurol* 1984;15:73-78.
161. *Kennedy WR, Sakuta M, Quick DC.* Rodent eccrine sweat glands: a case of multiple efferent innervation. *Neuroscience* 1984;11:741-749.
162. *Tschachler E, Reinisch CM, Mayer C, Paiha K, Lassmann H, Weninger W.* Sheet Preparations Expose the Dermal Nerve Plexus of Human Skin and Render the Dermal Nerve End Organ Accessible to Extensive Analysis. *J Invest Dermatol* 2004;122:177-182.
163. *Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R.* Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. *J Neurol Sci* 2000;172:55-62.

164. *Dabby R, Vaknine H, Gilad R, Djaldetti R, Sadeh M.* Evaluation of cutaneous autonomic innervation in idiopathic sensory small-fiber neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2007;12:98-101.
165. *Sommer C, Lindenlaub T, Zillikens D, Toyka KV, Naumann M.* Selective loss of cholinergic sudomotor fibers causes anhidrosis in Ross syndrome. *Ann Neurol* 2002;52:247-250.
166. *Gibbons CH, Illigens BMW, Wang N, Freeman R.* Quantification of sweat gland innervation: A clinical-pathologic correlation. *Neurology* 2009;72:1479-1486.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leonora Zange, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Phosphoryliertes α -Synuclein als diagnostischer Marker für eine dermale sympathische Neurodegeneration bei Lewy body-Erkrankungen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE –www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Leonora Zange hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Posterbeitrag: Zange L, Noack C, Rukwied R, Schmelz M, Hahn K, Lipp A. Postganglionic sympathetic function in Parkinson´s Disease and Multiple System Atrophy. 21st International Symposium on the Autonomic Nervous System, Florida, USA 2010.

Beitrag im Einzelnen: Patientenrekrutierung, Betreuung der Messungen zur autonomen Funktionstestung und Auswertung der Primärdaten, Recherche der nuklearmedizinischen Daten, Mitwirkung an der statistischen Auswertung, Literaturrecherche, wesentliche Beteiligung an der Erstellung des Posters sowie eigenständige Präsentation.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste (Stand 05/2014)

Posterbeitrag: Zange L, Noack C, Rukwied R, Schmelz M, Hahn K, Lipp A. Postganglionic sympathetic function in Parkinson's Disease and Multiple System Atrophy. 21st International Symposium on the Autonomic Nervous System, Florida, USA 2010.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zur Entstehung und dem Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Werner Stenzel, der freundlicherweise die fachkundige und konstruktive Betreuung als Doktorvater übernommen hat, für seine allzeitige, umfassende Unterstützung sowie aufschlussreichen wissenschaftlichen Hinweise; Herrn Dr. med. Axel Lipp für die Überlassung des Themas und die wissenschaftliche und klinische Ausbildung, die mir durch ihn zuteil wurde; Frau Dr. med. Cornelia Noack für die praktische Einführung in die autonome Funktionstestung und die vielen wertvollen Ratschläge; Frau Dr. med. Kathrin Hahn für die Entnahme der Hautbiopsien; Frau Petra Matylewski und den Mitarbeiterinnen des Instituts für Neuropathologie für die außerordentlich freundliche und geduldige Einarbeitung in die Laborarbeit und technische Unterstützung; Herrn Prof. Dr. med. Michail Plotkin, Herrn Dr. med. Sebastian Mehl und sowie allen beteiligten Mitarbeitern des Instituts für Nuklearmedizin für die Bereitstellung der nuklearmedizinischen Daten und fachlichen Auskunft; Herrn Dipl.-Math. Klaus Lenz für die anregenden Diskussionen und hilfreichen Hinweise bei der statistischen Auswertung; dem gesamten Team der Ambulanz für Bewegungsstörungen für das freundliche Engagement bei der Beschaffung der Patientenakten; Frau Marret Heinold für ihre Hilfsbereitschaft während der Arbeit am NCRC.

Meiner Familie, allen voran meinen Eltern, Marion und Uwe Zange sowie meinem Bruder Clemens Zange, gilt mein aufrichtiger Dank für ihre fortwährende Unterstützung. Matthias Neef danke ich herzlichst für die stärkenden Worte und Taten.

Mein besonderer Dank gilt allen Patienten, die durch ihre Teilnahme an der Untersuchung diese Arbeit überhaupt erst ermöglichten.