

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

**Die enterische Diagnostik
der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten:**

**Eine morphologische und semiquantitative Autopsiestudie
mittels Immunhistochemie und PET Blot**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2026

vorgelegt von: Julius Friedrich Wilhelm Schulten
geb. am: 01.11.1995 in Schwalmstadt, StT Ziegenhain

Gewidmet meinen Eltern
Renate und Dirk Schulten,
meiner Frau Sophia
und Leonhard Udo

INHALTSVERZEICHNIS

<u>1</u>	<u>ABSTRACT – THE ENTERIC DIAGNOSIS OF A-SYNUKLEIN AGGREGATE DISEASES</u>	<u>6</u>
<u>2</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>7</u>
<u>3</u>	<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</u>	<u>8</u>
<u>4</u>	<u>EINLEITUNG.....</u>	<u>9</u>
4.1	NEURODEGENERATIVE KRANKHEITEN	9
4.2	EPIDEMIOLOGIE UND RISIKOFAKTOREN.....	10
4.3	DEFINITION DER A-SYNUKLEIN-AGGREGATIONSKRANKHEITEN	11
4.3.1	KLINIK	11
4.3.2	ZENTRALE HISTOPATHOLOGIE	15
4.3.3	MOLEKULARPATHOLOGIE	19
4.4	WEGE IN DAS ZENTRALNERNVENSYSTEM	23
4.4.1	DIE PRION-HYPOTHESE	23
4.4.2	STAGING-SYSTEME	24
4.4.3	DIE DUAL-HIT-HYPOTHESE.....	27
4.5	DER DARM ALS MITTELPUNKT DER PATHOGENESE	28
4.5.1	NEUROANATOMISCHE GRUNDLAGEN	28
4.5.2	DIE DARM-HIRN-ACHSE.....	31
4.5.3	PERIPHERE HISTOPATHOLOGIE	32
4.6	FRAGESTELLUNG	34
<u>5</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN.....</u>	<u>35</u>
5.1	MATERIALIEN	35
5.1.1	FORSCHUNGSETHISCHE ASPEKTE.....	35
5.1.2	PATIENTENPROBEN	36
5.1.3	ANTIKÖRPER	41
5.1.4	GERÄTE.....	43
5.2	METHODEN	44
5.2.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	45
5.2.2	IMMUNHISTOCHEMIE	47
5.2.3	PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE BLOT	55
5.2.4	STAGING NACH BRAAK UND McKEITH	62
5.2.5	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	62
5.2.6	INFORMATIONSVERRARBEITUNG UND STATISTIK	65

<u>6</u>	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>68</u>
6.1	QUALITATIVE AUSWERTUNG	69
6.1.1	HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG	69
6.1.2	POSITIVKONTROLLEN	71
6.1.3	IMMUNHISTOCHEMIE	75
6.1.4	PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE BLOT	83
6.2	QUANTITATIVE AUSWERTUNG	91
6.2.1	BESTIMMUNG DES A-SYNUKLEIN-GRADIENTEN	91
6.2.2	EINZELFALLANALYSE	96
6.2.3	KORRELATIONSANALYSE	98
6.2.4	VERGLEICH ZWISCHEN DEN PROTOKOLLEN	101
6.2.5	SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT DER PROTOKOLLE	105
6.2.6	BERECHNUNG EINER MINDESTBIOPSIEGRÖßE	110
6.3	STAGING	112
<u>7</u>	<u>DISKUSSION</u>	<u>114</u>
7.1	UMFANG DER ARBEIT UND VERGLEICH ZU PUBLIZIERTEN STUDIEN	114
7.2	DISKUSSION DER FORSCHUNGSFRAGEN.....	115
7.2.1	WELCHE REAKTIVITÄTSMUSTER FINDEN SICH IM GASTROINTESTINALTRAKT?	115
7.2.2	FOLGT DAS A-SYNUKLEIN-VERTEILUNGSMUSTER EINEM GRADIENTEN?.....	120
7.2.3	KORRELIERT DAS AUSMAß AN A-SYNUKLEIN-PATHOLOGIE MIT DER ERKRANKUNGSDAUER?	124
7.2.4	WIE GROß MUSS EINE BIOPSIE MINDESTENS SEIN?	125
7.2.5	WELCHES IST DAS NEUROPATHOLOGISCHE DIAGNOSTIKVERFAHREN DER WAHL?	127
7.3	ZUSAMMENFASSUNG: GASTROINTESTINALE BIOPSIEN ALS BIOMARKER?.....	130
7.4	LIMITATIONEN	132
7.5	AUSBLICK	133
<u>8</u>	<u>ANHANG.....</u>	<u>136</u>
8.1	ABBILDUNGEN.....	136
8.2	TABELLEN.....	138
<u>9</u>	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>158</u>
<u>10</u>	<u>TABELLENVERZEICHNIS</u>	<u>160</u>
<u>11</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>163</u>

<u>12</u>	<u>PUBLIKATIONEN</u>	<u>181</u>
<u>13</u>	<u>DANK.....</u>	<u>181</u>
<u>14</u>	<u>FINANZIERUNG/INTERESSENSKONFLIKTE</u>	<u>181</u>
<u>15</u>	<u>WERDEGANG JULIUS F. W. SCHULTEN</u>	<u>FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.</u>

1 Abstract – The enteric diagnosis of α -Synuclein aggregate diseases

Objective

Since differential diagnostic of synuclein aggregation diseases like Parkinson's disease remains a challenge, further diagnostic tools are needed. According to Braak's hypothesis, Parkinson's disease manifests itself early inside the gut through aggregated α -synuclein, spreading to the central nervous system in a prionoid fashion. We thus examined whether enteric biopsies might aid clinicians as biomarkers. We address the following main questions: Which immunoreactive patterns are found inside the gastrointestinal tract? Which sections show the highest density of α -synuclein aggregates? Does the distribution follow a gradient? Is there a difference in prevalence between the submucosa and the muscular layer? Do immunoreactivity and disease duration correlate? What is the diagnostical protocol of choice? And which size should a diagnostic biopsy have?

Methods

The author of this dissertation prepared, stained, and analyzed microscopically human tissue to answer the above-mentioned questions. Autopsy tissue was acquired beforehand from the esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, colon, appendix, and rectum. 20 patients with either Parkinson's disease, Parkinson's disease dementia or Dementia with Lewy bodies were compared to 15 control subjects with a differential diagnosis. Immunohistochemistry, the current gold standard for histopathological diagnostic of synuclein aggregation diseases, was compared against a highly sensitive method for aggregate detection called Paraffin-Embedded Tissue Blot. Using these methods, the antibodies pSer129 and 10D2 were tested with and without proteinase pretreatment. Each section was then evaluated in ten high-power fields. For Paraffin-Embedded Tissue Blot, an additional whole section analysis was performed.

Results

Several sparsely described immunoreactive patterns were found. Stomach and ileum in particular showed elevated prevalence of aggregated α -synuclein while the appendix and rectum showed lowest. This indicates a non-linear gradient. The submucosa showed more immunoreactivity than the muscular layer. No correlation between reactivity and disease duration was seen. In most protocols, pSer129 reached highest overall reactivity. A Paraffin-Embedded Tissue Blot protocol with pSer129 and whole-slide evaluation on stomach sections scored 68.8 % sensitivity and 100 % specificity. No minimal size for biopsy could be determined.

Conclusion

This case-control study contributes to the pathophysiological understanding of synuclein aggregation diseases as well as to their clinical differential diagnosis. Accumulation of α -synuclein inside the stomach and ileum supports the hypothesis that Parkinson's disease may spread in a prionoid fashion starting in the gut. Our findings strongly discourage minimally invasive biopsies as potential diagnostic tools, thus shifting the focus to surgical gut resections as promising objects of investigation. Paraffin-Embedded Tissue Blot in whole-slide evaluation with pSer129 antibody proved to be the method of choice, which provides a biomarker with reasonable sensitivity and excellent specificity. The stomach and ileum seem to be a particularly suitable targets for this purpose. Now, prospective clinical studies are needed to validate these findings in patients.

2 Zusammenfassung

Fragestellung

Da die Differentialdiagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten bis heute herausfordernd ist, sind weitere Diagnostika notwendig. Der Braak-Hypothese zufolge wird Morbus Parkinson als prominenter Vertreter dieser Krankheiten ausgelöst durch aggregiertes α -Synuklein im Magen-Darm-Trakt und breitet sich prionoid bis in das zentrale Nervensystem aus. Die vorliegende Arbeit untersucht daher, ob sich Darmbiopsate zur Diagnostik eignen. Die Fragestellungen umfassen: Welche Färbemuster finden sich im Magen-Darm-Trakt? Welche Abschnitte zeigen die höchste α -Synuklein-Prävalenz? Folgt das Verteilungsmuster einem Gradienten? Findet sich ein Unterschied zwischen Submukosa und Muskularis? Korreliert das Ausmaß der Immunreaktivität mit der Erkrankungsdauer? Welches ist das diagnostische Verfahren der Wahl? Und wie groß sollte eine diagnostische Biopsie sein?

Methoden

Der Doktorand war damit betraut, die Proben zu färben und mikroskopisch anhand eigens erstellter Protokolle auszuwerten. Zur Verfügung standen Proben aus Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Appendix und Rektum. Diese wurden zuvor in Autopsien aus 20 Patienten mit Morbus Parkinson, Parkinson-Demenz und Demenz mit Lewy-Körperchen sowie 15 differentialdiagnostischen Kontrollfällen gewonnen. Die Immunhistochemie wurde verglichen mit dem Paraffin-Embedded Tissue Blot, einer hochsensitiven Methode zur Detektion von α -Synuklein-Aggregaten. Die Antikörper pSer129 und 10D2 wurden in Protokollen mit unterschiedlicher Proteinase-Vorbehandlung getestet. Zur Auswertung wurde ein Score anhand der Immunreaktivität in je zehn mikroskopischen Gesichtsfeldern erfasst. Die mit Paraffin-Embedded Tissue Blot gefärbten Präparate wurden auch in toto ausgewertet.

Ergebnisse

Es fanden sich diverse bisher spärlich beschriebene Färbemuster. Eine erhöhte Dichte an aggregiertem α -Synuklein fand sich im Magen und Ileum, kaum in der Appendix und dem Rektum. In der Submukosa ergab sich eine höhere Dichte immunreaktiver Strukturen als in der Muskularis. Zwischen Immunreaktivität und Krankheitsdauer, Alter sowie Demenz ließen sich keine statistisch signifikanten Korrelationen finden. pSer129 zeigte in allen Protokollen die höchste Dichte an Immunreaktivität. Ein Protokoll mittels Paraffin-Embedded Tissue Blot und Antikörper 10D2 im Magen erreichte 68,8 % Sensitivität bei 100 % Spezifität.

Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie liefert somit Beiträge zur Differentialdiagnostik sowie auch Pathophysiologie der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Der Paraffin-Embedded Tissue Blot war der Immunhistochemie in Sensitivität und besonders Spezifität überlegen. Neben der Glandula submandibularis, die bereits ein vielversprechendes Ziel darstellt, liefert unser Protokoll die weitere Option, Resektate des Magen-Darm-Traktes diagnostisch zu nutzen. Magen und Ileum scheinen hierfür besonders geeignet. Wir empfehlen nun eine prospektiv-klinische Studie, um die Ergebnisse dieser Pilotstudie zu validieren.

3 Abkürzungsverzeichnis

α Syn	α -Synuklein
AD	Alzheimer's Disease (Morbus Alzheimer)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
CBD	Corticobasal degeneration (Kortikobasale Degeneration)
DLB	Dementia with Lewy bodies (Demenz mit Lewy-Körperchen)
ENS	Enterisches Nervensystem
GIT	Gastrointestinaltrakt
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin(-Färbung)
HPF	High Power Field (hier: Gesichtsfeld in 200-facher Vergrößerung)
LB	Lewy body (Lewy-Körperchen)
LE	Lymphatische Enzephalopathie
LN	Lewy-Neurit
M.	Morbus (Krankheit)
mk	monoklonaler Antikörper
MSA	Multisystematrophie
N.	Nervus (Nerv)
Ncl.	Nucleus (Kern)
p- α Syn	(Antikörper gegen) phosphoryliertes α -Synuklein
PET Blot	Paraffin-Embedded Tissue Blot
PD	Parkinson's Disease (Morbus Parkinson)
PDD	Parkinson's Disease with Dementia (Parkinson-Demenz)
pk	polyklonaler Antikörper
PK	Proteinase K
PrP ^{Sc}	Prion-Protein Scrapie
Prion	Proteinaceous infectious particle
PSP	Progressive Supranuclear Palsy (Supranukleäre Blickparese)
vPD	vaskuläres Parkinsonoid
ZNS	Zentrales Nervensystem

4 Einleitung

4.1 Neurodegenerative Krankheiten

„Neurodegenerativ“ sind Krankheiten, wenn sie mit dem Funktionsverlust spezifischer Neuronenpopulationen einhergehen. Eine selektive Vulnerabilität führt zu typischen pathologischen Mustern innerhalb des Nervensystems (PRZEDBORSKI et al., 2003). Entsprechend der spezifischen Symptome lässt sich somit die Unterscheidung in verschiedene Krankheiten, wie z. B. die Frontotemporale Demenz oder die Kortikobasale Degeneration, vornehmen (DICKSON, WELLER, 2011). Eine Form der neurodegenerativen Krankheiten sind die Protein-Aggregationskrankheiten, welche durch Konformationsänderung (Aggregation) charakteristischer Proteine verursacht werden. So ist z. B. das Scrapie-Prionprotein (PrP^{Sc}) typisch für bestimmte Prionenerkrankungen, wohingegen das tau-Protein eine Rolle in der Pathogenese vielfältiger neurodegenerativer Krankheiten zu spielen scheint (TAYLOR et al., 2002). Durch diese Proteine kommt es zunächst zum Funktionsverlust (der Neurodegeneration sensu stricto) und schließlich zum Zelltod (der Apoptose) der Nervenzellen.

Es finden sich zahlreiche Überschneidungen zwischen neurodegenerativen Krankheiten, weshalb immer häufiger von einem Kontinuum (ARMSTRONG, 2012) ausgegangen wird. Eindrücklich zeigt sich dies bei einer Subgruppe der Protein-Aggregationskrankheiten: So lassen sich bei den α -Synuklein-Aggregationskrankheiten (auch „Lewy-Körperchen-Krankheiten“ oder „Synukleinopathien“) klinisch wie auch neuropathologisch Überschneidungen zwischen dem Morbus Parkinson (Parkinson's Disease, PD), der Parkinson-Demenz (Parkinson's Disease with Dementia, PDD) und der Demenz mit Lewy-Körperchen (Dementia with Lewy Bodies, DLB) feststellen (JELLINGER, KORCZYN, 2018; MCKEITH et al., 2005). Andere Krankheiten lassen sich trotz klinischer Ähnlichkeit neuropathologisch gut unterscheiden: Sie werden daher als „Parkinson-Plus-Syndrome“ (auch „atypische Parkinson-Syndrome“) zusammengefasst, so z. B. die Progressive Supranukleäre Blickparese und die Kortikobasale Degeneration (LEVIN et al., 2016). Die Multisystematrophie nimmt eine Sonderstellung ein, da sie mit extraneuronalen (astrozytären) α -Synuklein-Aggregaten einhergeht und sei im Rahmen dieser Arbeit klinisch-pragmatisch zu den Parkinson-Plus-Syndromen gezählt. Diverse Studien haben eine Progredienz von Inzidenteller Lewy-Körperchen-Krankheit und der REM-Schlaf-Verhaltensstörung zu klinisch schwerwiegenderen neurodegenerativen Erkrankungen wie PD feststellen können, weshalb diese beiden Syndrome auch als prodromale „Vorboten“ neurodegenerativer Krankheiten bezeichnet werden (BARONE, HENCHCLIFFE, 2018; DICKSON et al., 2008; FRIGERIO et al., 2011; POSTUMA et al., 2015b).

In der vorliegenden Arbeit sollen die neuronalen α -Synuklein-Aggregationskrankheiten – genauer PD, PDD und DLB – als klinisch-neuropathologisch definiertes Spektrum verstanden werden (DODEL et al., 2023; JELLINGER, KORCZYN, 2018; MCKEITH et al., 2005). Dementsprechend wurden PD-, PDD- und DLB-Fälle in unsere Diagnosegruppe eingeschlossen und neuropathologisch klar abgrenzbaren Differenzialdiagnosen gegenübergestellt. Im Folgenden wird, sofern nicht anders angegeben, insbesondere auf PD eingegangen, um eine Einführung in das Gebiet der neurodegenerativen Krankheiten im Allgemeinen und der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten im Speziellen zu vermitteln.

4.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Bei PD handelt es sich um die zweithäufigste neurodegenerative Krankheit nach Morbus Alzheimer. Immerhin weist sie in den Industrienationen eine im Alter zunehmende Prävalenz von hin zu 3 % in der Altersgruppe über 80 auf und geht mit einer altersabhängigen Inzidenzrate von 8-18 pro 100.000 Personenjahren einher (LEE, GILBERT, 2016). Männer sind statistisch häufiger betroffen als Frauen (ASCHERIO, SCHWARZSCHILD, 2016) – wenngleich dieser Effekt je nach Ethnie unterschiedlich ausgeprägt und scheinbar rückläufig ist (ZIRRA et al., 2023). Patienten sind zu Krankheitsbeginn durchschnittlich 60 Jahre alt und erwarten einen Krankheits-verlauf von etwa 15 Jahren mit jedoch erheblichen interindividuellen Unterschieden (LEE, GILBERT, 2016). Die Lebenserwartung vermindert sich um durchschnittlich 4-11 Jahre (ISHIHARA et al., 2007), wobei Pneumonie einer der bedeutendsten Faktoren hinsichtlich der Mortalität ist (LEES et al., 2009). Für Privatpersonen wie auch für die Gesellschaft insgesamt entsteht somit eine relevante Krankheitslast.

Diese spiegelt sich einerseits in gesamtgesellschaftlichen Kosten, andererseits auch in erniedrigter Lebensqualität wider. So werden ca. 29 % der Betroffenen durch die Krankheit zur Aufgabe ihrer Arbeit gezwungen (WINTER et al., 2010). Dies führt nicht nur zur erheblichen psychosozialen Belastung, sondern verursacht auch 20.095 € pro Patienten und Jahr an direkten und indirekten Kosten (WINTER et al., 2010). Somit ist PD vergleichbar mit anderen Krankheiten, welche langfristiger (Nach-)Behandlung bedürfen, wie z. B. Herzinsuffizienz, Diabetes oder Schlaganfall (CHAUDHURI et al., 2006a). Bezüglich Lebensqualität, Hospitalisierungsrate und ökonomischer Faktoren stellen die nicht-motorischen Symptome, zu denen unter anderem Demenz, Dysphagie und Obstipation zählen, den bedeutendsten Faktor dar (CHAUDHURI et al., 2006a). Entsprechend diesen Belastungen wurde PD auch als unabhängiger Risikofaktor für einen Suizid identifiziert; Betroffene sehen sich teils gezwungen, auf Programme zur Sterbehilfe zurückzugreifen (CHEN et al., 2021; NUEBLING et al., 2021). Nicht zuletzt findet sich auch eine negative Auswirkung auf die Lebensqualität der Angehörigen, die ihre erkrankten Partner oder Verwandten häufig ohne spezifische Fachkenntnisse pflegen (MARTÍNEZ-MARTÍN et al., 2007).

Obwohl die kausale Wirkung unklar ist, wurde eine Vielzahl risikomodifizierender Elemente identifiziert. So fanden sich als Risikofaktoren für die Entwicklung von PD der Konsum von Molkereiprodukten, Pestizide, Herbizide, Metalle, Methamphetamin, Melanome, traumatische Hirnschädigung, Alkoholabusus und postmenopausale Östrogeneinnahme. Als protektiv angenommen werden hingegen Tabak, Coffein, Epigallocatechingallat aus Grüntee-Extrakt, Harnsäure, physische Aktivität, nichtsteroidale Antirheumatika, Kalziumkanalblocker und Statine (ASCHERIO, SCHWARZSCHILD, 2016).

Zusammenfassend stellt PD eine mit steigendem Alter zunehmend relevante Krankheit dar, die für Hausärzte und Neurologen nicht zuletzt aufgrund des demographischen Wandels zunehmend an Bedeutung gewinnen wird. Es handelt sich um eine häufige und volkswirtschaftlich relevante neurodegenerative Erkrankung, welche die Lebenserwartung verringert und die Lebensqualität der Betroffenen wie auch ihrer Angehörigen im Verlauf zunehmend einschränkt. Eine Fülle risikomodifizierender Umweltfaktoren wurde in den letzten Jahren identifiziert, was auf therapeutische und schließlich präventive Erfolge hoffen lässt.

4.3 Definition der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten

Whether Parkinson's Disease is one disease or several depends upon how one defines a disease. (CALNE, MIZUNO, 2004)

4.3.1 Klinik

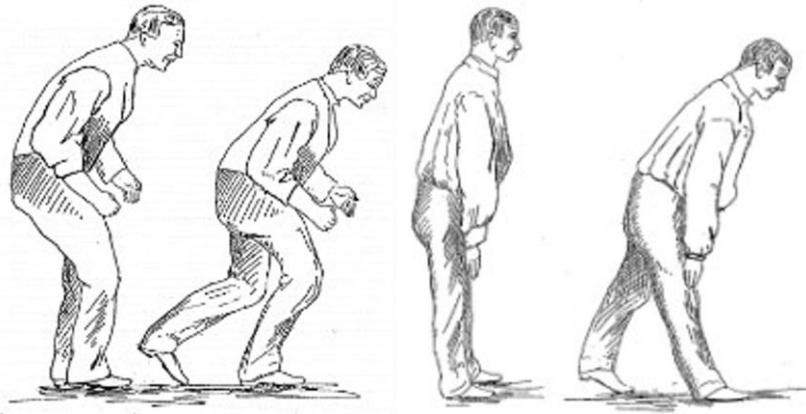


Abbildung 1: Zeichnungen stereotyper Patienten mit Parkinson-Syndrom. Eine pathognomonische Flexionshaltung (linke zwei) steht im Kontrast zur „atypischen“ Variante in extendierter Haltung (rechte zwei) (CHARCOT, 1888).

Im Folgenden wird zunächst auf den M. Parkinson als wohl prominentesten Vertreter der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten eingegangen, bevor weitere Entitäten dieser Gruppe diskutiert werden. Die ersten Erwähnungen parkinsonoider Symptome finden sich bereits ca. 2500 v. Chr. in der arjuvedischen Literatur (MANYAM, 1990) sowie in diversen westlichen Werken vor 1817 (CALNE et al., 1989; STERN, 1989). Nichtsdestotrotz wird die Synthese vom Symptom zum Syndrom und letztlich die Erstbeschreibung des zunächst noch rein klinisch definierten „Morbus Parkinson“ (je nach Nomenklatur teils synonym „idiopathischer“, „sporadischer“ oder „klassischer“; auch „Parkinson-Krankheit“) James Parkinson zugeschrieben. Dieser formulierte anschaulich die Symptome der zunächst als „Shaking Palsy“ (Schüttellähmung) bezeichneten Krankheit (siehe auch Abbildung 1):

Involuntary tremulous motion, with lessened muscular power, in parts not in action and even when supported; with a propensity to bend the trunk forwards, and to pass from a walking to a running pace [...]. (PARKINSON, 1817, Reprint 2002)

In dieser Beschreibung finden sich neben Weiteren auch zwei oftmals als (Kardinal-)Symptome zitierte klinische Phänomene: Der charakteristische Tremor sowie eine (meist erst im Verlauf hinzutretende) posturale Instabilität. James Parkinsons Diagnosekriterien wurden in den folgenden über 200 Jahren vielfach ergänzt (Review siehe MARSILI et al., 2018). Zunächst geschah dies durch Charcot, der sie um die Symptome „Bradykinese“ und „Rigor“ erweiterte und der Krankheit den Namen Parkinsons verlieh (CHARCOT und VULPIAN, 1862, zitiert nach ENGELHARDT, 2017). Entsprechend der aktuellen S2k-Leitlinie (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023) soll demnach auch im Folgenden vom „Morbus Parkinson“ gesprochen werden. Dies entspricht der Rede vom „idiopathischen Morbus Parkinson“ der

vorangegangenen Leitlinie (DEUSCHL et al., 2016), ohne jedoch ätiologische Annahmen über das klinisch-neurologisch definierte Krankheitsbild zu treffen. Aus Charcots Beschreibung entwickelten sich die Kardinalsymptome, welche das zur Diagnose der Krankheit notwendige „Parkinson-Syndrom“ definieren (GIBB, LEES, 1988; HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023; MOVEMENT DISORDER SOCIETY TASK FORCE ON RATING SCALES FOR PARKINSON'S, 2003): (I) Bradykinese (teils synonym auch „Akinese“ oder „Hypokinese“, siehe SCHILDER et al. 2017) in Verbindung mit entweder (II) Rigor, häufig mit charakteristischem „Zahnradphänomen“, (III) niederfrequentem „Pillendreher“-Ruhetremor, oder beidem. Teils wird auch (IV) eine im Verlauf auftretende posturale Instabilität zu diesen Kardinalsymptomen gezählt (SHAHED, JANKOVIC, 2007). Diese „klassischen motorischen Symptome“ präsentieren sich typischerweise asymmetrisch und sprechen initial gut auf eine Behandlung mit Levodopa an (GELB et al., 1999). Daneben gibt es fakultative motorische Symptome, die sich teils von den Kardinalsymptomen ableiten, teils eigene Entitäten darstellen (Review siehe SHAHED und JANKOVIC, 2007). Nach Einbeziehung von „red flags“ und supportiven Symptomen kann so schließlich die endgültige Diagnose eines „Morbus Parkinson“ gestellt werden (GIBB, LEES, 1988; HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023).

Klinisch kann anhand der Hoehn-und-Yahr-Skala ein Staging vorgenommen werden, welches mit Bildgebung, Beeinträchtigungsgrad und Lebensqualität korreliert (GOETZ et al., 2004). Es erfasst in seiner ursprünglichen Form die klinische Entwicklung des PD in fünf Stadien anhand der Dimensionen „unilaterale versus bilaterale Symptomatik“, „axiale Symptome und Gangschwierigkeiten“ und „funktionelle Einschränkungen“ (HOEHN, YAHR, 1967). Die Hoehn-Yahr-Skala findet sich auch im Anhang der – in den 1980er Jahren konzipierten und 2008 durch die Movement Disorder Society (MDS) revidierten – „Unified Parkinson's Disease Rating Scale“ (MDS-UPDRS), welche den longitudinalen Krankheitsverlauf klinisch erfasst. Hierbei handelt es sich um eine Skala hoher Reliabilität, welche 42 Items entlang von vier (I-IV) Dimensionen bewertet: (I) nicht-motorische Symptome, (II) motorische Aspekte des täglichen Lebens (Activities of daily living), (III) eine standardisierte motorische Untersuchung und (IV) motorische Komplikationen, z. B. Off-Zustände oder Dyskinesien (GOETZ et al., 2008; MOVEMENT DISORDER SOCIETY TASK FORCE ON RATING SCALES FOR PARKINSON'S, 2003). Nach aktueller S2k-Leitlinie formen diese Kriterien in ihrer Fassung von 2015 den Goldstandard klinischer Diagnostik und sollen im klinischen Alltag die UK-Brain-Bank-Kriterien ablösen (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023; POSTUMA et al., 2015a). Anhand des UPDRS inklusive Hoehn-Yahr-Staging ist somit eine Einschätzung des klinischen Schweregrades und Verlaufs bei Patienten mit PD möglich. Insbesondere Teil III der UPDRS-Skala hat hierzu im klinischen Alltag weite Verbreitung gefunden.

Ähnlich wie das vorwiegend durch die motorischen Kardinalsymptome definierte Parkinson-Syndrom ist auch das Phänomen der nicht-motorischen Symptome seit langem bekannt. So bringt die arjuvedische Literatur schon parkinsonoide Symptomatik mit cittanasa und buddi pramaha (Demenz und Verwirrung) in Verbindung (GOLDMAN, GOETZ, 2007; MANYAM, 1990). James Parkinson stellte weiterhin Beobachtungen zu Verstopfung, stockender Sprache sowie Beschwerden mit Speichel und Schluckakt an (HURWITZ, 2017; PARKINSON, 1817). Mögliche Assoziationen mit dem Darm-Mikrobiom (FITZGERALD et al., 2019) und der „Darm-Hirn-Achse“ (KLINGELHOEFER, REICHMANN, 2015) sowie das Einfließen der nicht-

motorischen Symptome in neuere Diagnostiksysteme (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023; POSTUMA et al., 2015a) zeigen heute deren zunehmende Bedeutung in der Forschung und dem klinischen Alltag. Dieses neugefundene Interesse lässt sich dadurch begründen, dass nicht-motorische Symptome der klinischen Diagnose im Mittel 10,2 Jahre vorausgehen und 98,8 % aller Parkinson-Patienten betreffen (GAENSLER et al., 2011). Zu ihnen zählen neuropsychiatrische, autonome, gastrointestinale, sensorische, schlafbezogene und weitere Probleme (CHAUDHURI et al., 2005). Insbesondere Hyposmie, Verstopfung, Depression und REM-Schlaf-Verhaltensstörung sind auch als relevante Risikofaktoren zur Entwicklung eines PD bekannt (MAHLKNECHT et al., 2015). Für Patienten ergibt sich hieraus ein überaus langer Krankheitsverlauf (mit zunächst als unspezifisch wahrgenommenen Symptomen), welcher Jahre bis Jahrzehnte vor der klinischen Diagnose beginnt (siehe Abbildung 2). Diese Phase wird auch als „prodromaler PD“ („Pre-motor PD“) bezeichnet (MAHLKNECHT et al., 2015). Der klinisch definierten Prodromalphase kann wiederum eine rein neuropathologisch definierte, präklinische Latenzphase vorangestellt werden: Einige Autoren diskutieren, ob schon zwischen dem 25. Bis 35. Lebensjahr klinisch unbemerkt die ersten Veränderungen des zentralen Nervensystems im Sinne eines Incidental Lewy Body Disease auftreten (GIBB, LEES, 1988; SANDMANN-KEIL, BRAAK, 2005; VINGERHOETS et al., 1994). Die präklinische Phase und Prodromalphase sind Gegenstand aktueller Forschung hinsichtlich potentieller Frühdiagnostik und verlaufsmodifizierender Therapien (MAHLKNECHT et al., 2015).

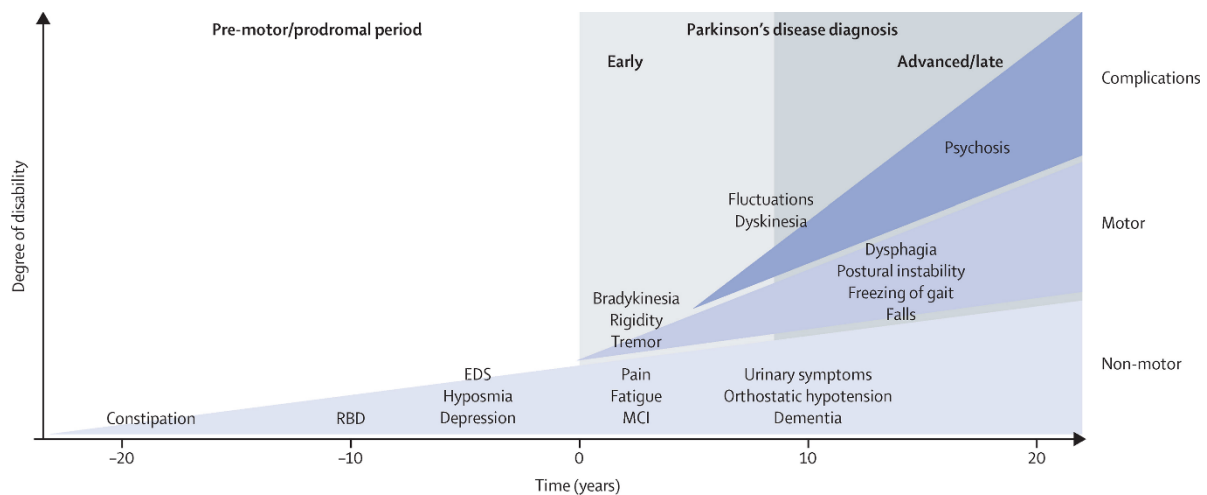


Abbildung 2: Prodromaler (prämotorischer) und klinischer Verlauf (KALIA, LANG, 2015). Die nicht-motorischen Symptome treten Jahrzehnte vor den klassischen Motorsymptomen auf und nehmen in Qualität und Quantität kontinuierlich zu.

Zu den häufigsten Symptomen des prodromalen PD zählen die gastrointestinalen, weshalb diese im Folgenden exemplarisch dargestellt werden. Unter PD-Patienten beträgt die Prävalenz allein für Obstipation bis zu 80 % (CHAUDHURI et al., 2006b; MARTINEZ-MARTIN et al., 2007; RODRÍGUEZ-VIOLANTE et al., 2010; WANG et al., 1993) bei jedoch hoher Dunkelziffer je nach Datenerhebung (KAYE et al., 2006; KNUDSEN et al., 2017). Die Odds Ratio, ausgehend von Obstipation PD zu entwickeln, lag gegenüber Kontrollen bei 2,48 (SAVICA et al., 2009), wobei das relative Risiko, an PD zu erkranken, in einer prospektiven Studie invers mit der Frequenz der Stuhlgänge korrelierte (ABBOTT et al., 2001). Der definitiven Diagnose geht Obstipation im Durchschnitt 18 Jahre voraus (GAIG, TOLOSA, 2009). Aufgrund der hohen Prävalenz, der Korrelation mit

späterer Parkinson-Diagnose und des außergewöhnlich langen prodromalen Verlaufs verdienen die gastrointestinalen Symptome somit unter den nicht-motorischen Symptomen besondere Beachtung.

Der hier exemplarisch für die α -Synuklein-Aggregationskrankheiten dargestellte PD ist wie dargestellt durch spezifische Diagnose- und Staging-Kriterien und unter Beachtung motorischer und nicht-motorischer Symptome gut definiert. Die klinisch-neuropathologisch definierte Krankheit muss jedoch abgegrenzt werden vom rein klinisch verstandenen „Parkinson-Syndrom“ oder „Parkinsonismus“ (DEUSCHL et al., 2016). Das Syndrom fasst Symptome zusammen, die nicht nur für den idiopathischen Morbus Parkinson typisch sind, sondern auch für „familiäre“ (hereditäre), „Parkinson-Plus-“ (atypische) und „sekundäre“ (symptomatische) Varianten (MCFARLAND, 2016). Die Feststellung eines Parkinson-Syndroms stellt somit die Basis weiterer Differenzialdiagnostik dar (POSTUMA et al., 2015a). Diese mündet schließlich in konkreten Therapiekonsequenzen, z. B. welche pharmakologische Therapie primär indiziert ist und ob neurochirurgische Verfahren wie die Tiefe Hirnstimulation in Betracht kommen (MCFARLAND, 2016).

Zu den α -Synuklein-Aggregationskrankheiten zählen auch DLB und PDD (SEZGIN et al., 2019) sowie im weiteren Sinne die Incidental Lewy Body Disease (FORNO, 1969), welche möglicherweise präsyndromale Bedeutung hat (DELLEDONNE et al., 2008; DICKSON et al., 2008). DLB unterscheidet sich vom PD durch das zentrale Merkmal eines progredienten demenziellen Syndroms und ist durch die folgenden drei Kernmerkmale charakterisiert: (I) delir-ähnliche kognitive Fluktuationen, (II) „szenische“ visuelle Halluzinationen und (III) Parkinsonismus. Im Vergleich mit der PDD überwiegen die klinischen Gemeinsamkeiten etwaige Unterschiede – die klinische Unterscheidung erfolgt anhand des Verlaufs: eine DLB wird diagnostiziert, wenn die dementielle Entwicklung dem Parkinson-Syndrom vorangeht oder innerhalb des ersten Jahres nach klinischer Diagnose auftritt (Einjahresregel); die Diagnose einer PDD ist angezeigt, wo die Demenz zu einem etablierten Parkinson-Syndrom hinzutritt, frühestens aber ab dem zweiten Jahr des klinischen Verlaufs (DODEL et al., 2023; MCKEITH et al., 2017; MCKEITH et al., 2005).

Wie die vorangehend beschriebenen nosologischen Schwierigkeiten erahnen lassen, stellt auch die Differentialdiagnostik zwischen α -Synuklein-Aggregationskrankheiten wie PD einerseits und Parkinson-Plus-Syndromen andererseits im klinischen Alltag eine Herausforderung dar. Anekdotisch sei hierfür auf James Parkinson verwiesen, der in seiner Arbeit zur „Paralysis agitans“ mindestens drei seiner sechs Patienten nach heutigem Verständnis falsch-positiv als PD-Erkrankte fehldiagnostiziert hätte (WEINER, 2008). Und auch in der Gegenwart stehen Kliniker Schwierigkeiten gegenüber: In einer Metastudie wurden 11 Studien einbezogen, welche die Genauigkeit der klinischen Diagnose mit dem neuropathologischen Goldstandard post-mortem verglichen. Im Ergebnis wurde die gepoolte Genauigkeit der klinischen Diagnose mit 80,6 % angegeben. Der positiv prädiktive Wert einer frühen Diagnostik lag mit 53 % bei < 5 Jahren Erkrankungsdauer knapp über Münzwurf-Niveau und sank auf 26 % bei < 3 Jahren (RIZZO et al.). Der positiv prädiktive Wert nimmt erst zum Zeitpunkt der endgültigen Diagnosestellung Werte zwischen 75 % und 99 % an, jedoch mit erheblichen Unterschieden je nach Expertise (POSTUMA, BERG, 2017). Eine genauere Diagnostik, unterstützt durch Biomarker, ist somit dringend anzustreben, um die Früh- und Differentialdiagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten im Allgemeinen und des PD im speziellen zu verbessern.

Zusammenfassend handelt es sich bei PD als Hauptvertreter der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten um ein seit langem bekanntes und in den letzten Jahrzehnten durch motorische und non-motorische klinische Kriterien zunehmend besser definiertes Krankheitsbild. Die Kardinalsymptome sowie eine Vielzahl motorischer und nicht-motorischer Symptome ergeben ein individuelles Krankheitsbild, welches einen progredienten Verlauf von präklinischer über Prodromal- bis Endphase der Erkrankung vollzieht. Insbesondere die Prodromalphase gewinnt aufgrund häufiger und beeinträchtigender Symptome zunehmende Aufmerksamkeit. Zum Staging stehen mit der Skala nach Hoehn und Yahr sowie der UPDRS klinisch etablierte und reliable Werkzeuge zur Verfügung. Angesichts differentialdiagnostischer Schwierigkeiten gewinnen die non-motorischen Symptome zunehmende Aufmerksamkeit und können folglich ein Schritt auf dem Pfad zur Früherkennung und Prävention vor Einsetzen der klassisch-motorischen Symptomatik sein. Dass eine solche konzeptionell möglich und für Proben des Gastrointestinaltraktes sinnvoll ist, soll im Folgenden anhand der pathophysiologischen Grundlagen der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten erklärt werden.

4.3.2 Zentrale Histopathologie

Fast 100 Jahre nach der klinischen Charakterisierung des PD durch James Parkinson beschrieb Friedrich H. Lewy die heute als „Lewy-Körperchen“ (Lewy bodies, LB) bekannten Einschlusskörper (siehe Abbildung 5) sowie eine Zelldegeneration der Neurone des dorsalen Vaguskerne (HOLDORFF, 2002; LEWY, 1912). Nur wenige Jahre später konnte auch die bis heute neuropathologisch wegweisende degenerative Veränderung und Depigmentierung der Substantia nigra pars compacta (siehe Abbildung 4) durch Tretiakoff erarbeitet werden (TRETIAKOFF, 1919 zitiert nach LEES et al., 2008). Die derzeit vorherrschende Auffassung ist, dass sich das klinische Parkinsonsyndrom entwickelt, sobald mindestens 60 % der dopaminergen Neurone der Substantia nigra untergegangen sind (FEARNLEY, LEES, 1991). Ob die charakteristische Lewy-Pathologie an diesem Prozess pathophysiologisch beteiligt ist und ob sie protektiv oder schädlich wirkt (vgl. Abbildung 3), wird anhaltend kontrovers diskutiert (AU, CALNE, 2005; SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Die neuropathologischen Hauptmerkmale des PD umfassen somit nach derzeitigem Kenntnisstand: (I) die makroskopische Abblassung, (II) den mikroskopisch prominenten Zellverlust und (III) die charakteristische Lewy-Pathologie innerhalb der Substantia nigra pars compacta (HALLIDAY, MURPHY, 2010). Diese drei Kriterien sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

Das erste neuropathologische Merkmal, die Depigmentierung bis hin zum völligen Pigmentverlust, fällt bereits bei makroskopischer Betrachtung auf (siehe Abbildung 4). Diese prominente Abblassung findet vorwiegend in der Substantia nigra pars compacta, teils jedoch auch im darunter gelegenen Locus caeruleus auf (TOLNAY, PAULUS, 2012). Es handelt sich um ein charakteristisches Zeichen vieler mit Parkinsonismus einhergehender Krankheiten und tritt in verschiedenen Krankheiten des nigrostriatalen Systems auf (LEES et al., 2008). Makroskopisch finden sich – im Gegensatz zu vielen anderen neurodegenerativen Krankheiten – an den Gehirnen der PD-Patienten weder in der Bildgebung noch in der Begutachtung post-mortem regelmäßig Atrophien oder Volumenminderungen (DICKSON et al., 2009), weshalb eine Schnittbildgebung in der klinischen Praxis eher als Ausschlussdiagnostik zu empfehlen ist (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023).

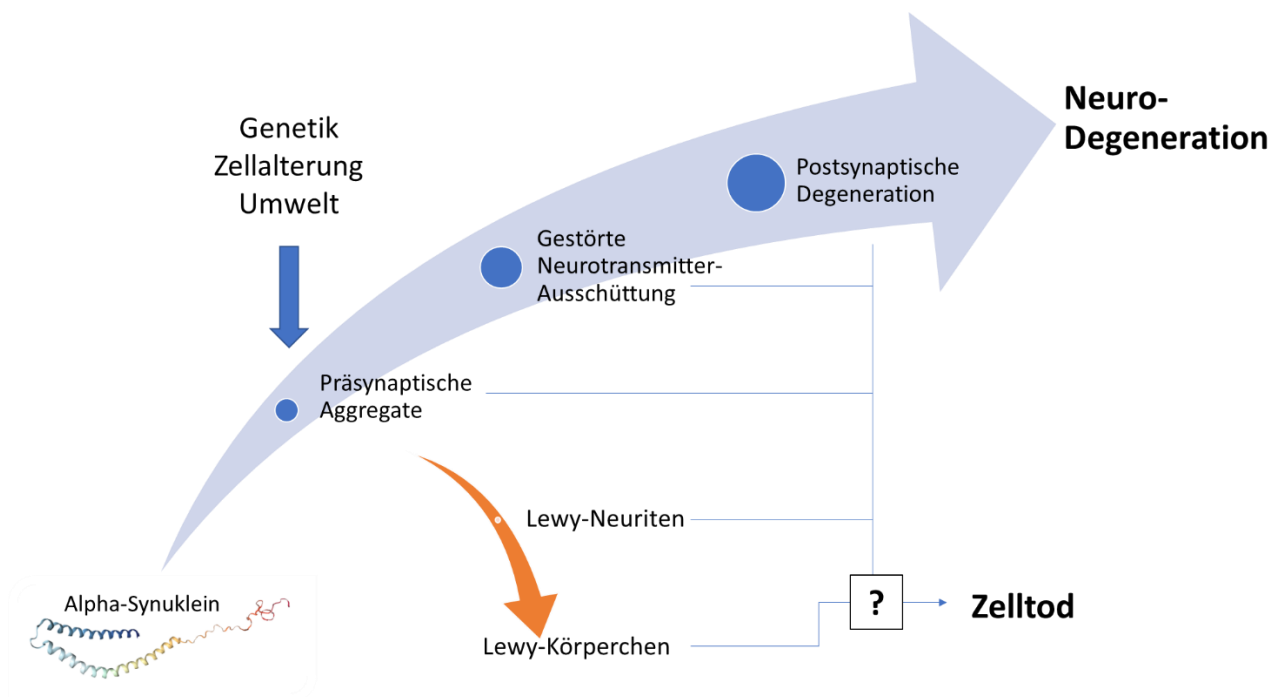


Abbildung 3: Pathophysiologie des Morbus Parkinson. Während der neurodegenerative Funktionsverlust der Synapse gut charakterisiert ist, ist die pathophysiologische Rolle der Lewy-Pathologie bisher nicht abschließend geklärt. Grafik adaptiert nach SCHULZ-SCHAEFFER, 2015.

Mikroskopisch geht die Depigmentierung mit dem zweiten neuropathologischen Merkmal des PD einher: der Degeneration und Destruktion der pigmentierten Neurone. Dies führt im Verlauf der Krankheit zu einem Verlust von ca. 80 % der Neurone der Substantia nigra pars compacta, im ventrolateralen Teil bis zu 90 % (HALLIDAY, MURPHY, 2010). Der Zellverlust kann mikroskopisch entweder direkt oder aber indirekt über eine astrozytäre Gliose und extrazelluläres Neuromelanin („Pigmentinkontinenz“) festgestellt werden (DICKSON et al., 2009; TOLNAY, PAULUS, 2012). Der Beginn dieser Neurodegeneration lässt sich in Fällen von PD, PDD und DLB gleichermaßen lange vor Absterben der Neurone als Verlust präsynaptischer Endigungen und dendritischer Spines visualisieren (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; SCHULZ-SCHAEFFER, 2010).

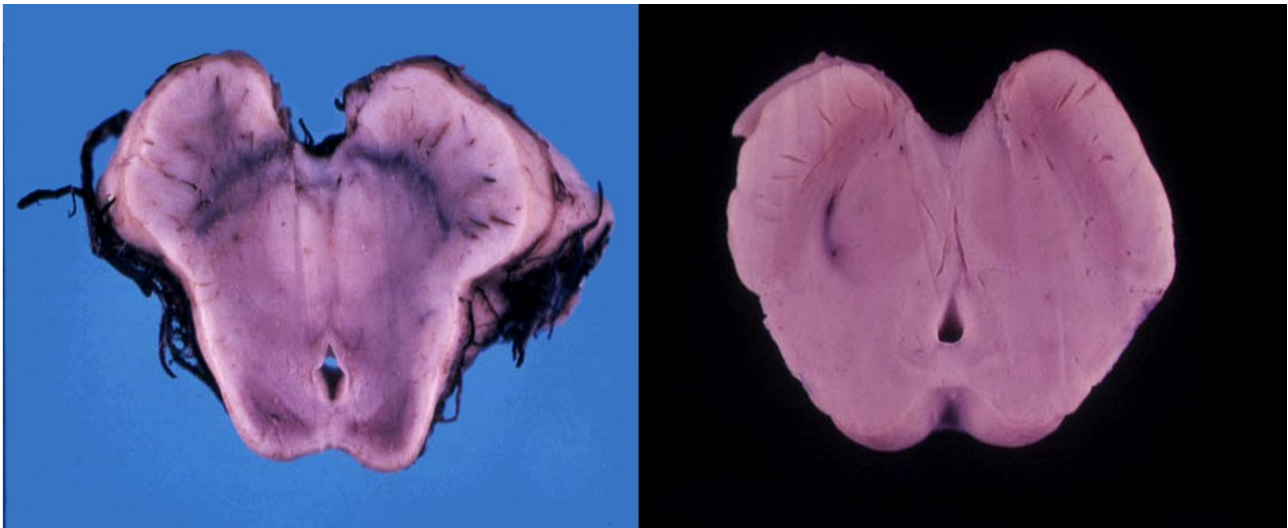


Abbildung 4: Pigmentverlust der Substantia nigra. Im Vergleich mesenzephaler Transversalschnitte auf Höhe der Substantia nigra eines Kontrollfalls (links) sowie eines Patienten mit PD (rechts) fällt eine bereits makroskopisch sichtbare Abblassung durch den Verlust der pigmenthaltigen Zellen auf. Die Bilder wurden durch Herrn Prof. Dr. med. Walter J. Schulz-Schaeffer erstellt und dürfen mit freundlicher Genehmigung hier dargestellt werden.

Schließlich sind auch intraneuronale Protein-Ablagerungen, die unter dem Begriff „Lewy-Pathologie“ (Review siehe auch WAKABAYASHI et al., 2013) subsummiert werden ein Hauptmerkmal (CHARTIER, DUYCKAERTS, 2018). Die prominentesten Vertreter, die sogenannten „Lewy-Körperchen“ und ihre Vorläufer, die „Pale Bodies“ entstehen dabei im Soma der Nervenzelle und lassen sich schon mittels konventioneller Färbemethoden wie Hämatoxylin-Eosin-(H.-E.-)Färbung nachweisen (DICKSON et al., 2009). Die bis zu 25 µm großen LB präsentieren sich in H.-E.-Färbung typischerweise rundlich, homogen und eosinophil mit hellem Randsaum (siehe Abbildung 5 A) (GREENFIELD, BOSANQUET, 1953), nehmen je nach Hirnregion aber auch bizarre Formen an (siehe Abbildung 5 links) (FORNO, 1996; LEWY, 1912). Sie können außerdem entsprechend ihrer Lokalisation weiter unterteilt werden in hyaline „klassische LB“ in den Nuclei des Hirnstammes und die weniger kompakten „kortikalen LB“. Der Unterschied zwischen diesen LB-Varianten liegt morphologisch darin, dass die die kortikalen LB weniger scharf von ihrer Umgebung abgegrenzt sind und keinen aufgehellten Hof besitzen, welcher die klassischen LB ausmacht. Außerdem finden sich die kortikalen Lewy-Körperchen nach manchen Autoren öfter in DLB und PDD, ohne jedoch pathognomonisch für diese Krankheiten zu sein (DICKSON et al., 2009). Auch sind die verschiedenen Arten von LB keinesfalls auf das Gehirn beschränkt, sondern sind in verschiedenen Geweben des peripheren Nervensystems beschrieben worden (MA et al., 2019b). Ultrastrukturell bestehen LB neben Neurofilamenten auch aus Lipid-Membranen, Zytoskelett-Elementen, dysmorphen Zellorganellen und Vesikeln, die im Saum und Zentrum der LB unterschiedlich angeordnet sind (SHAHMORADIAN et al., 2019). Mittels immunhistochemischer Techniken lassen sich weitere Subkategorien der Lewy-Pathologie differenzieren (s. Abbildung 5 B, C, D): Im Soma der Nervenzellen finden sich dann diffuse, granuläre oder pleomorphe Strukturen, im Axon sieht man neben den „Lewy-Neuriten“ (LN) auch neuritische LB sowie punktförmige und sphäroide Ablagerungen (DICKSON et al., 2009; SAITO et al., 2003).

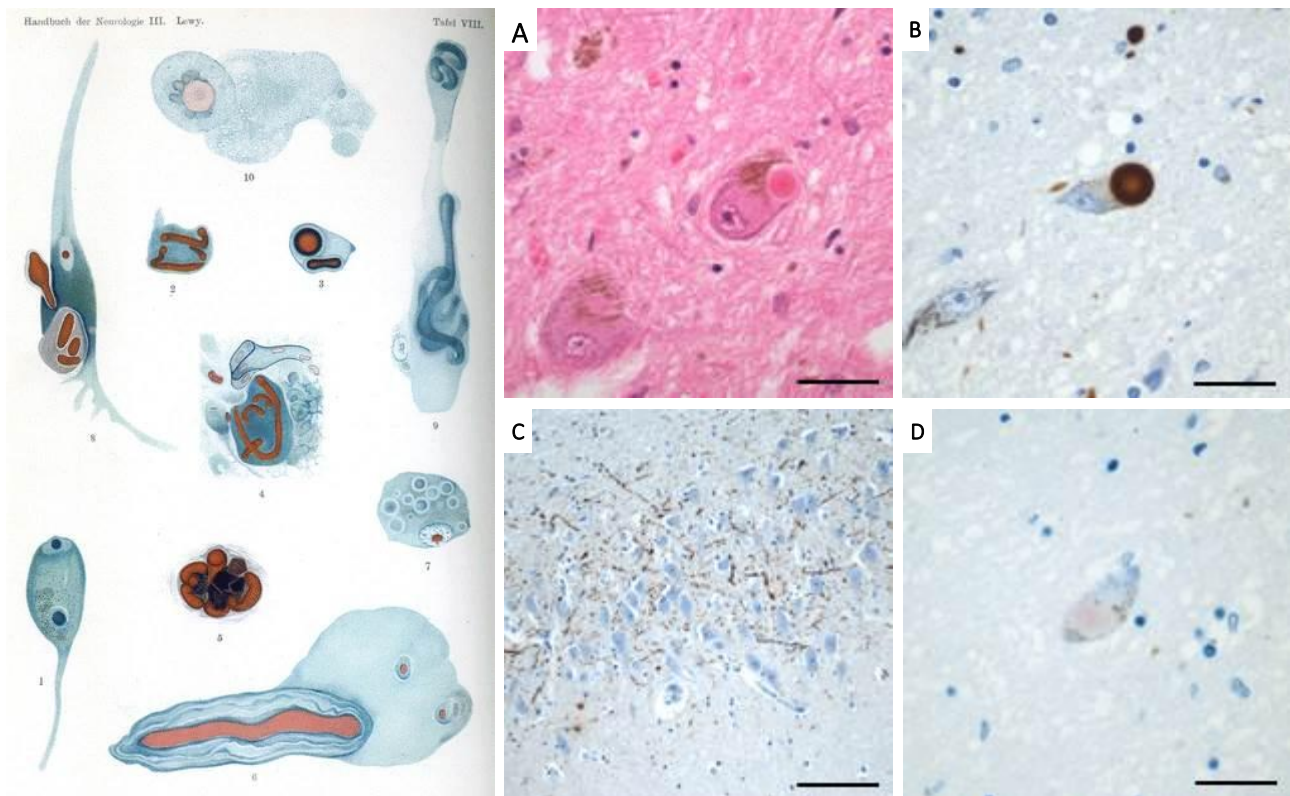


Abbildung 5: Lewy-Pathologie. Die Pathologie findet sich in verschiedenen Organen, meist in seinen typischen Formen als Einschlusskörperchen, Neurit oder punktförmig. **Links:** Mann- (Nr. 1-6, 8) bzw. Mallory-Färbung (Nr. 7, 9-10) nach F. H. Lewy. Man beachte den charakteristischen Aufbau in Kern und Randsaum in Nr. 3 (LEWY, 1912, reproduziert nach HOLDORFF et al., 2013). **Rechts (A-D):** Vergrößerung 400-fach (A, B und D) bzw. 200-fach (C). Färbung mittels Hämatoxylin-Eosin (A) bzw. Immunhistochemie mit Antikörper 10D2, konjugiert mit braunem Farbstoff (B und C), respektive Antikörper 4B12, konjugiert mit rotem Farbstoff (D), jeweils mit Proteinase-K-Vorbehandlung. **A und B:** Lewy-Körperchen in pigmentierten Zellen der Substantia Nigra mit farblicher Darstellung des Randsaums und Zentrums (A aus Gewebe des Falles PD11, B aus DLB5). **C:** Reichliche Lewy-Neuriten finden sich im Ammonshorn (CA2-Region; PD5). **D:** Die Pale Bodies der Substantia nigra sind unscheinbar im Vergleich zur manifesten Lewy-Pathologie (PD8).

Zu bedenken bleibt, dass es für den „Goldstandard“ Histopathologie nur wenige einheitliche Kriterien (GELB et al., 1999) und Standardverfahren gibt, was im Diagnostikverfahren zur Variabilität und folglich zu mangelnder Objektivität, Reliabilität und Validität führen kann (DICKSON et al., 2009). Auch die postmortale neuropathologische Diagnose sollte daher als probabilistische Aussage verstanden werden, welche in Zusammenschau mit klinischen Daten getroffen wird (DICKSON et al., 2009). Das einzige neuropathologisch validierte klinische Diagnostiksystem sind die „UK Parkinson’s Disease Society Brain Bank Diagnostic Criteria“. Demensprechend wird dieses trotz der Entwicklung diverser neuerer Vorschläge (GELB et al., 1999; POSTUMA, BERG, 2017) nach deutscher S2k-Leitlinie auch weiterhin als Goldstandard zur neuropathologischen Diagnostik des PD empfohlen (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023). Zur definitiven Diagnose von α -Synuklein-Aggregationskrankheiten wie des PD ist demnach bis heute eine Zusammenschau klinischer und (post-mortem) neuropathologischer Merkmale nötig. Fragen hinsichtlich der pathophysiologischen Bedeutung der charakteristischen Lewy-Körperchen bleiben kontrovers.

4.3.3 Molekularpathologie

Die Hauptkomponente der Lewy-Pathologie bildet ein Protein namens α -Synuklein (α Syn), welches in seiner aggregierten Form als treibende Kraft der Neurodegeneration diskutiert wird (POLYMEROPOULOS et al., 1997; SPILLANTINI et al., 1997). Ähnlich wie auch bei anderen neurodegenerativen Proteinen wie Amyloid- β und tau ist die physiologische Funktion des α Syn bisher nicht vollständig verstanden (Review siehe SULZER, EDWARDS, 2019). Aufgrund der schieren Menge seiner Interaktionspartner wurde jedoch vorgeschlagen, α Syn primär als „Hub-Protein“ zu sehen, welches wie ein Knotenpunkt zur Integration vielfältiger präsynaptischer Prozesse dienen könnte (DELEERSNIJDER et al., 2013). In der Nervenzelle findet es sich bevorzugt im Bereich der Präsynapse (IWAI et al., 1995), an der es auch erstmalig beschrieben wurde (MAROTEAUX et al., 1988). Im restlichen Zellkörper hingegen findet sich α Syn trotz prominenter Lewy-Pathologie in geringeren Mengen (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Somit ist die Bezeichnung „Synuklein“ („beim Kern gelegen“) eine strenggenommen irreführende Bezeichnung (IWAI et al., 1995) dieses vorwiegend präsynaptischen Proteins. Die Gruppe der Synukleine wie α Syn wurde bisher nur in Wirbeltieren angetroffen (GEORGE, 2002) und Knockout-Modelle rufen nur mäßige Veränderungen im Phänotyp hervor (ABELIOVICH et al., 2000; ANWAR et al., 2011; CHANDRA et al., 2004; GRETEN-HARRISON et al., 2010). Somit scheint trotz relevanter Einflüsse auf die synaptische Funktion keine strenge Notwendigkeit dieser Proteine für die Ausschüttung von Neurotransmittern zu bestehen (SULZER, EDWARDS, 2019).

Strukturell und funktionell kann das 140 Aminosäuren umfassende humane α Syn in drei Teilregionen (siehe Abbildung 6 A) untergliedert werden (Review siehe UVERSKY, 2007; MEADE et al., 2019). Hierzu zählt erstens das α -helikale N-terminale Segment (GEORGE et al., 1995), welches durch Bindung anionischer Lipide als „Membran-Anker“ dienen und genetisch modifiziert werden kann (FUSCO et al., 2014). Zweitens gibt es eine Zentralregion, welche zuerst als mindestens 35 Aminosäuren fassendes Peptid definiert und als „non-amyloid- β component“ der Alzheimer-Pathologie bekannt wurde (HAN et al., 1995; UEDA et al., 1993). Heute wird diese Zentralregion jedoch auch weiter gefasst, da Positionen 31-109 in Analogie zur Alzheimer- und Prion-Pathologie (NEUMANN et al., 2002) eine für neurodegenerative Proteine charakteristische Resistenz gegenüber Proteinasen aufweisen (KUSHNIROV et al., 2020; UEDA et al., 1993). Die hierin enthaltene Sequenz 71-VTGVTAVAQKTV-82 wurde als aggregationsfördernder Faktor beschrieben (GIASSON et al., 2001; MIAKE et al., 2002). Die dritte Region ist der intrinsisch unstrukturierte C-Terminus, der eine im nativen Zustand aggregationshemmende Wirkung (MURRAY et al., 2003) zugeschrieben wird und an welcher sich die meisten posttranslationalen Modifikationen finden (BARRETT, TIMOTHY GREENAMYRE, 2015). Somit ergibt sich für das α Syn eine dreigliedrige Struktur, dessen Bestandteile verschiedene – teils für das Aggregationsverhalten relevante – Funktionen erfüllen und in unterschiedlichem Ausmaß modifiziert werden können.

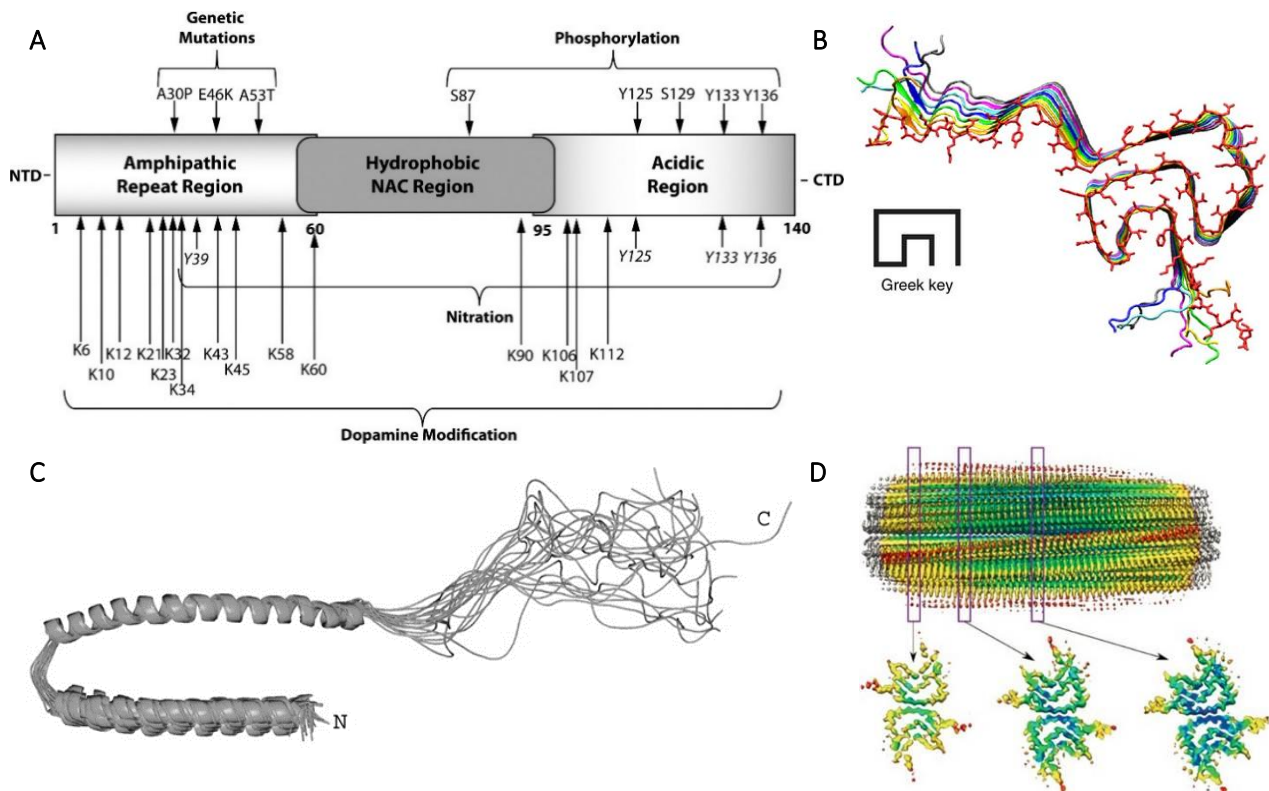


Abbildung 6: Die molekulare Struktur des α -Synukleins. A Die drei Abschnitte können verschieden modifiziert werden (BARRETT, TIMOTHY GREENAMYRE, 2015). B und C: Darstellung jeweils mehrerer überlagernder Monomere. B Die meanderförmige „Fehlfaltung“ in β -Faltblatt-Konformation führt zur Aggregation (TUTTLE et al., 2016). C Die mizellen-gebundene Konformation hingegen ist eine der vielen physiologischen Formen des „Chamäleons“ α Syn (ULMER et al., 2005). D Die aggregierten Einzelproteine lagern sich zu Di- und schließlich Polymeren zusammen und bilden so die pathologischen unlöslichen Fibrillen (LI et al., 2018).

Insbesondere die posttranslationalen Modifikationen werden hinsichtlich ihrer Beiträge zur Pathophysiologie der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten untersucht (OUESLATI et al., 2010). Zu den meistdiskutierten zählen die Phosphorylierung, Nitrierung, C-terminale Trunkierung (d. h. Proteolyse) und Ubiquitinierung (FUJIWARA et al., 2002; GIASSON et al., 2000; HASEGAWA et al., 2002; LI et al., 2005), aber auch vielfältige weitere Modifikationen mit möglicher pathophysiologischer Relevanz wurden beschrieben (ALFARO et al., 2012; CONWAY et al., 2001; DORVAL, FRASER, 2006; IYER et al., 2016; MUNCH et al., 2000; ZHOU et al., 2010). Die Phosphorylierung an Serin 129 ist die derzeit bestuntersuchte posttranslationale Modifikation (BARRETT, TIMOTHY GREENAMYRE, 2015; OUESLATI, 2016; SCHMID et al., 2013) und kann mittels spezifisch bindender Antikörper immunhistochemisch nachgewiesen werden (SAITO et al., 2003). Immerhin findet sich eine starke Korrelation zwischen der Phosphorylierung an Serin 129 und der typischen Histopathologie, da 90 % des α Syn im LB phosphoryliert vorliegen im Vergleich zu nur 4 % der löslichen α Syn-Fraktion (ANDERSON et al., 2006). Eine Verlagerung des Gleichgewichts von löslichem nativem hin zu unlöslichem phosphoryliertem α Syn im Krankheitsverlauf wurde beobachtet (ZHOU et al., 2011) und auch mit hohem Alter, dem Hauptrisikofaktor für PD, konnte die Phosphorylierung an Serin 129 assoziiert werden (CANRON et al., 2012; MCCORMACK et al., 2012). Dennoch herrscht, wie auch bei den LB, bisher kein endgültiger Konsens, inwiefern diese posttranslationalen Modifikationen protektiv oder toxisch wirken, da widersprüchliche Ergebnisse aus verschiedenen Modellen vorliegen (MEADE et al., 2019).

α Syn wurde als „Protein-Chamäleon“ beschrieben, da es eine Fülle löslicher und unlöslicher, freier und membrangebundener Konformationen besitzt (UVERSKY, 2003). So ergibt sich z. B. in der Interaktion mit Membranlipiden (ROVERE et al., 2018) die Form einer „gebrochenen“ α -Helix (siehe Abbildung 6 C) (CHANDRA et al., 2003). Andererseits kann sich, begünstigt durch genetische Mutationen und posttranslationale Modifikationen (MEADE et al., 2019), auch eine β -Faltblatt-Struktur ausbilden (VILAR et al., 2008), die schlangen- bis meanderförmige Züge annimmt („Greek key topology“, siehe Abbildung 6 B). Diese Struktur, die häufig als „Fehlfaltung“ referenziert wird, ermöglicht das reißverschlussartige („steric zipper“) Ineinandergreifen der Protofilamente zu Dimeren (LI et al., 2018). Diese lagern sich nun entlang einer Achse rotationssymmetrisch Schicht für Schicht aneinander (siehe Abbildung 6 D) und aggregieren auf diese Weise zu Fibrillen oder Schleifen (MEADE et al., 2019; PEELAERTS et al., 2015).

Die durch α Syn-Aggregation entstehenden Strukturen wurden als Teil der Amyloid-Familie identifiziert (CONWAY et al., 2000). Der heute breit genutzte Begriff „amyloid“ (stärkeartig) beschreibt die gemeinsamen Eigenschaften einer Gruppe von Proteinen, welche sich durch die Neigung zur Aggregation auszeichnen (BENSON et al., 2018), z. B. PrP^{Sc} bei Prionenerkrankungen oder tau und β -Amyloid bei Morbus Alzheimer (Review s. SCHECKEL, AGUZZI, 2018). Weitere Gemeinsamkeiten der Amyloide umfassen: (I) die antiparallele „cross-beta“-Faltblatt-Konformation (GEDDES et al., 1968), (II) die gewundenen, überwiegend unverzweigten Fibrillen (siehe Abbildung 6 D) sowie (III) eine charakteristische Aggregatfärbung mittels Kongorot und Thioflavin T (CONWAY et al., 2000). Die Eigenschaften amyloider Fibrillen wurden anschaulich beschrieben als stählerne Zugfestigkeit mit seidener Steifigkeit (SMITH et al., 2006), weswegen es nicht verwundert, dass sie auch physiologisch in Systemen wie der Haut oder dem Endokrinium Verwendung finden (FOWLER et al., 2006; MAJI et al., 2009). Somit sind die α Syn-Aggregate, die durch ihr Vorkommen in Lewy-Körperchen, Lewy-Neuriten und als feine präsynaptische Ablagerungen die α -Synuklein-Aggregationskrankheiten definieren, strukturell verwandt sowohl mit physiologischen als auch neurodegenerativen Amyloid.

Die amyloiden α Syn-Fibrillen sind zwar ein Hauptbestandteil der LB, doch stellt die Lewy-Pathologie nur 0,02 bis 11 % der Gesamtaggregate im Neuron dar, während sich der Großteil an der Präsynapse in Form von Mikroaggregaten befindet (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Diese entstehen, indem sich α Syn-Monomere in β -Faltblatt-Konformation zu sphärischen, donut- oder porenartigen, hydrophoben Strukturen zusammenlagern (CHEN et al., 2015; UVERSKY, 2003). Diese können im PET Blot (Paraffin-Embedded Tissue Blot) als synaptische Pathologie von ca. 2-4 μ m Größe dargestellt werden (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Die verschiedenen Aggregate vom Monomer über Oligomere bis zur Fibrille bilden ein ineinander übergehendes Kontinuum unterschiedlich stabiler Zustandsformen (PIERI et al., 2016). Intrazellulär entsteht so ein Gleichgewicht zwischen den löslichen Monomeren und den unter physiologischen Bedingungen selteneren Oligomeren (MEADE et al., 2019). Erst das Versagen zellulärer Räumungsmechanismen wie den Chaperonen, dem Ubiquitin-Proteasom-System und den Lysosomen (Review siehe VILCHEZ et al. 2014) führt zum Kippen dieser Balance. Durch Überschreitung einer kritischen Konzentration des Polymers (OOSAWA, ASAKURA, 1975) kommt es schließlich zur vermehrten, da energetisch begünstigten, α Syn-Aggregation (TARTAGLIA et al., 2007).

Nomenklatorisch muss große diese „Aggregation“ mit großer Sorgfalt von der bloßen „Akkumulation“ des α Syn unterschieden werden: So bezeichnet eine „Aggregation“ die oben beschriebene Verbindung der Monomere zu hochgradig geordneten, unlöslichen Strukturen (PEELAERTS et al., 2015). Der Begriff der „Akkumulation“ hingegen umfasst lose zusammengelagertes α Syn α -helikaler Form, das wie erwähnt durchaus physiologisch vorkommt (MEADE et al., 2019). So finden sich Akkumulate auch regelhaft in den enterischen Ganglien alternder Ratten, ohne dass dies mit Zelldegeneration oder Zelltod korrelieren würde (PHILLIPS et al., 2009). Zwar findet sich in der Literatur häufig eine Terminologie der „Proteinopathie“ (FANNING et al., 2020; UBEDA-BAÑON et al., 2020) oder „Synukleinopathie“ (SCHNEIDER, ALCALAY, 2017; SPILLANTINI, GOEDERT, 2000). Jedoch können diese Begriffe eine Pathogenität der physiologisch anzutreffenden α Syn-Akkumulate nahelegen und verkennen die Aggregation als in diesem Fall (DAVID et al., 2010) zentrales pathologisches Agens. Aus diesen Vorüberlegungen verwendet die vorliegende Arbeit auch im Folgenden bevorzugt den Begriff der „Protein-Aggregationskrankheit“ (AGUZZI, O'CONNOR, 2010; ALBERTI, HYMAN, 2021).

Immerhin finden sich nicht in allen Synapsen α Syn-Akkumulate und nicht aus allen unter diesen entwickeln sich Aggregate (TOTTERDELL et al., 2004). Auch außerhalb des Nervensystems konnten α Syn-Akkumulate entdeckt werden mit Funktionen und Interaktionen, die weit über die rein synaptischen hinaus gehen (COOPER et al., 2006; DEVI et al., 2008; KONTOPOULOS et al., 2006; LI et al., 2007). Dementsprechend findet sich α Syn nicht nur physiologisch im peripheren und autonomen Nervensystem (BLOCH et al., 2006), sondern auch in vielfältigen extraneuronalen Geweben (ASKANAS et al., 2000; BALTIC et al., 2004; HASHIMOTO et al., 1997; KIM et al., 2004; LI et al., 2002; SHIN et al., 2000; TAMO et al., 2002). Somit werden die zunehmenden Bestrebungen verständlich, periphere Gewebe als Biomarker zu nutzen. Diese lassen auf eine verbesserte Differentialdiagnostik schließlich Frühdiagnostik und ggf. Prävention vor Einsetzen der motorischen Kardinalsymptome hoffen (TSUKITA et al., 2019).

Bei α Syn handelt es sich somit um ein funktionell und strukturell vielseitiges und in seiner physiologischen wie auch seiner möglichen pathologischen Rolle bislang unzureichend verstandenes Protein, das regional akkumulieren und zu verschiedenen Konformeren aggregieren kann. Die amyloiden Aggregate, abzugrenzen von einfachen Akkulaten, stellen einen Hauptbestandteil der Lewy-Pathologie dar, finden sich aber in noch höherer Konzentration in Form proteinaseresistenter Oligomere an der Präsynapse. Deren Degeneration wird als frühe Manifestation in der Pathogenese der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten angenommen. Als Ursache der Fehlfaltung zu amyloiden Fibrillen werden verschiedene posttranslationale Modifikationen diskutiert. Die aussichtsreichste unter ihnen stellt derzeit die Phosphorylierung an Serin 129 dar, welche mit Lewy-Pathologie und typischen Risikofaktoren zur Entwicklung der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten korreliert werden konnte. Die Suche nach aggregiertem, phosphoryliertem α Syn in peripheren Geweben stellt daher heute eine vielversprechende Methode zur verbesserten Diagnostik dieser Krankheiten dar.

4.4 Wege in das Zentralnervensystem

Supposed Proximate Cause

A diseased state of the medulla spinalis, [...] extending, as the disease proceeds, to the medulla oblongata. - James Parkinson in "An Essay on the Shaking Palsy" (1817)

Der wohl erste Autor, der den idiopathischen Morbus Parkinson für einen aufsteigenden Prozess hielt, war James Parkinson, der in seinen Beobachtungen auch nicht-motorische Symptome wie extreme Obstipation detailliert festhielt und anhand der Klinik eine Ausbreitung von der Medulla oblongata postulierte (PARKINSON, 1817). Fast ein Jahrhundert später wies Friedrich H. Lewy nach, dass tatsächlich der dorsale Vagus Kern bei Parkinson-Patienten von einer distinkten Pathologie betroffen ist (LEWY, 1912), was eine mögliche Beteiligung der Hirnnerven implizierte. Auch die Beteiligung peripherer Systeme wurde schon bald darauf erkannt (HERZOG, 1928; LEWITAN et al., 1951; WOHLWILL, 1928). Dennoch dauerte es fast 200 Jahre von den ersten Überlegungen Parkinsons bis hin zum Aufkommen der „Prion-Hypothese“, die eine Ausbreitung des aggregierten α Syn entlang neuroanatomischer Bahnen postuliert (Reviews siehe MELKI, 2018; MA et al. 2019). Diese Hypothese entstand im Zuge des Braak-Stagings der Lewy-Pathologie (BRAAK et al., 2003b; DEL TREDICI et al., 2002) sowie der folgenden „Dual-Hit-Hypothese“, welche den Darm und die Nasenschleimhaut als Eintrittspforten der Pathologie in das zentrale Nervensystem (ZNS) postuliert (BRAAK et al., 2006b; HAWKES et al., 2007, 2009). Im Folgenden Kapitel sollen diese pathophysiologischen Hypothesen im Einzelnen näher erklärt werden, um die vermutete Pathogenese näher zu beleuchten.

4.4.1 Die Prion-Hypothese

Bereits vor Einführung des Prion-Begriffs, als noch ein „slow virus“ als Ursache neurodegenerativer Erkrankungen wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit angenommen wurde, fand sich der Verdacht, dass auch PD und PDD eine vergleichbare Ätiologie haben könnten (GAJDUSEK, 1977). Prionen wurden später definiert als „kleine infektiöse Protein-Partikel, welche Prozessen zur Inaktivierung durch Modifikation von Nukleinsäuren gegenüber resistent sind“ (PRUSINER, 1982). Durch Beobachtung einer Host-to-Graft-Ausbreitung des α Syn wurde schließlich eine explizite „Prion-Hypothese“ aufgestellt, die die Ätiologie der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten erklären sollte (KORDOWER et al., 2008; LI et al., 2008). Sie besagt in ihrer ursprünglichen Form, dass aggregierte Fragmente des α Syn in den Körper aufgenommen und prionoid von Neuron zu Neuron innerhalb neuroanatomisch vernetzter Regionen des ZNS verbreitet werden können (BRAAK et al., 2003b). Ein tierexperimenteller Nachweis der Ausbreitung wurde schließlich im ZNS von transgenen (LUK et al., 2012b) und wild-type Mäusen (LUK et al., 2012a), im Primatenmodell (AROTCARENA et al., 2020; RECASENS et al., 2014) und schließlich für intrakolonale α Syn-Applikation erbracht (THOMZIG et al., 2021). Bei den Affen breitete sich das α Syn gleichermaßen ante- und retrograd aus nach intranigraler (RECASENS et al., 2014) respektive enterischer (AROTCARENA et al., 2020) α Syn-Injektion humaner ZNS-Lysate aus autopsierten Parkinson-Fällen.

Derzeit besteht eine kontroverse Debatte, ob α Syn als „Prion“ oder vielmehr „prionoid“ bezeichnet werden sollte (BRUNDIN, MELKI, 2017; TAMGUNEY, KORCZYN, 2017; WATTS, 2019). Für den Begriff

„prionoid“ spricht, dass es sich bei α Syn zwar um ein selbstpropagierendes Protein handelt, das seine Fehlfaltung an andere Proteine weitergibt, es jedoch keinen Hinweis auf Infektiosität bei Menschen gibt, was der Definition des Prions widerspreche (TAMGUNEY, KORCZYN, 2017). Neuere Definitionen des Begriffs „Prion“ sind jedoch inklusiver, da Infektiosität keine *conditio sine qua non* mehr darstellt. Vielmehr handle es sich bei diesen Partikeln um „Proteine, die eine alternative Konformation erreichen und selbst-propagierend wirken“ (PRUSINER, 2013). Demnach ist es terminologisch nicht unangebracht, das α Syn trotz fehlender Evidenz für eine Übertragbarkeit zwischen Menschen (DERKINDEREN, 2019) als Prion und Krankheiten wie PD und DLB entsprechend als „Prionen-Erkrankung“ zu bezeichnen (WATTS, 2019).

4.4.2 Staging-Systeme

Nach ihrer Klassifikation der Alzheimer-Pathologie (BRAAK, BRAAK, 1991, 1995), entwarf die Arbeitsgruppe um Heiko Braak das heute weit verbreitete „Braak-Staging“ der Lewy-Pathologie im ZNS von PD-Fällen (BRAAK et al., 2006a; BRAAK et al., 2018; BRAAK, DEL TREDICI, 2009; BRAAK et al., 2003a; BRAAK et al., 2004; DEL TREDICI et al., 2002). Neben diesem Staging mit Fokus auf PD gibt es weitere Klassifikationssysteme für α Syn-Pathologie mit unterschiedlichem Zweck: So finden sich (I) für DLB die ältere „Kosaka-Klassifikation“ (KOSAKA et al., 1988) sowie das etablierte „McKeith-Staging“ (MCKEITH et al., 1996), jeweils in etwa korrespondierend zum Braak-Staging (siehe Tabelle 1); (II) verschiedene überarbeitete Staging-Ansätze (LEVERENZ et al., 2008; MCKEITH et al., 2017; MULLER et al., 2005; ZACCAI et al., 2008) inklusive eines Systems zur übergreifenden Klassifikation der Lewy-Pathologie in verschiedenen α -Synuklein-Aggregationskrankheiten (BEACH et al., 2009) sowie (III) innovative Staging-Ansätze unter Einbeziehung auch der Alzheimer-Pathologie (TOLEDO et al., 2016) oder mit primärem Fokus auf axonalen Veränderungen (UCHIHARA, 2017).

Tabelle 1: Neuropathologische Staging-Methoden im Vergleich (modifiziert nach JELLINGER, 2019). Staging nach Kosaka und McKeith im Vergleich zum Braak-Staging (BRAAK et al., 2003a; KOSAKA et al., 1988; MCKEITH et al., 2017).

Kosaka-/McKeith-Staging	Braak-Staging	Anatomische Verteilung der Lewy-Pathologie
Hirnstamm-prädominanter Typ	I	Medulla oblongata: dorsaler motorischer Nucleus IX/X, intermediäre retikuläre Zone, enterisches und peripher autonomes Nervensystem, Medulla spinalis und anteriorer olfaktorischer Nukleus
	II	Medulla oblongata und pontines Tegmentum: Stadium 1 plus Läsionen der kaudalen Nuclei raphe, retikulärer Nucleus gigantocellularis und Caeruleus-Subcaeruleus-Komplex; Bulbus olfactorius
	III	Mesencephalon: Stadium 2 plus Mittelhirn-Läsionen; Substantia nigra pars compacta und basales Vorderhirn
Transitionaler (limbischer) Typ	IV	Basales Prosencephalon und Mesokortex: Stadium 3 plus prosencephale Läsionen. Kortikale Involvierung nur am temporalen Mesokortex (transentorhinale Region) und Allokortex (CA2)
Diffus kortikaler Typ	V / VI	Neokortex: Stadium 4 plus Läsionen in höheren sensorischen Assoziationsarealen und präfrontalen Kortex bis hin zu primären Assoziationsarealen und prämotorischen Regionen

Dem geläufigen System nach BRAAK et al. zufolge wird die PD-Pathogenese in sechs aufeinander aufbauende neuropathologische Stadien sowie eine korrespondierende präsymptomatische oder symptomatische Phase eingeteilt (Abbildung 7 A). Die präsymptomatischen Stadien 1 und 2 seien demnach durch Lewy-Pathologie in peripheren Geweben sowie im dorsalen Vaguskern und Nucleus olfactorius charakterisiert. Diese breite sich in den Stadien 3 und 4 in Substantia nigra, Mittel- und Vorderhirn aus und gehe dann mit klinischer Symptomatik einher. In den Endstadien 5 und 6 schließlich seien höhere Assoziationsareale sowie schließlich primär-motorische und -sensorische Gebiete des Neokortex betroffen (Abbildung 7 B, C). Da die Stadien V und VI nicht eindeutig durch distinkte Hirnareale definiert sind (BRAAK et al., 2006a), werden sie in der vorliegenden Studie im Folgenden gemeinsam als Endstadium V/VI behandelt (siehe auch Kapitel 5.2.4). Braak beschreibe das Staging einen progredienten Prozess entlang neuroanatomischer Bahnen vulnerabler Neuronenpopulationen. Es wurde ferner die Hypothese aufgestellt, es handle sich um ein kaudo-rostral aufsteigendes Geschehen, das der neokortikalen Myelinisierung spiegelbildlich entgegenstehe (Abbildung 7 B, D), dass also insbesondere schwach umhüllte Neuronen früher und stärker von der Degeneration betroffen seien. Die Arbeitsgruppe um Braak vermutet, dass der Ursprung dieses Prozesses im Gastrointestinaltrakt, speziell im Magen, lokalisiert sei, von wo aus sich die Pathologie über den Vagusnerv via synaptischer Übertragung bis in das ZNS ausbreite und dort zu den charakteristischen Motor-Symptomen führe (BRAAK et al., 2006a; BRAAK et al., 2003b).

Die Klassifikation nach Braak wird hinsichtlich ihrer klinischen Validität und Relevanz kontrovers diskutiert, da sie nicht von allen Studien repliziert werden konnte (Review siehe KALAITZAKIS et al., 2008, HALLIDAY et al., 2012 und JELLINGER, 2019). So waren in Autopsiestudien nur 51-83 % der Fälle kompatibel mit Braak-Staging (BEACH et al., 2009; JELLINGER, 2009) und in 17-47 % fand sich kein kaudo-rostraler Gradient (ATTEMS, JELLINGER, 2008; JELLINGER, 2003, 2004; KALAITZAKIS et al., 2008b; PARKKINEN et al., 2008; ZACCAI et al., 2008). In 7-11 % konnte trotz Befall höherer Hirnareale keine Lewy-Pathologie im dorsalen Vaguskern gefunden werden (BEACH et al., 2009; FRIGERIO et al., 2011; JELLINGER, 2009; KALAITZAKIS et al., 2008b; PARKKINEN et al., 2008). Schließlich zeigten 49-55 % der Individuen mit höhergradigem Braak-Stadium keine adäquate Korrelation mit klinischer Symptomatik (LEVERENZ et al., 2008; PARKKINEN et al., 2008; ZACCAI et al., 2008). Als Gründe für diese Diskrepanzen werden Fehler in Braaks Studiendesign sowie eine fehlende Repräsentativität der Stichprobe und Nichtbeachtung der Korrelation zwischen α Syn-Last und Nervenzellverlust diskutiert (KALAITZAKIS et al., 2008a), ferner fand keine Kontrolle für Aggregate statt.

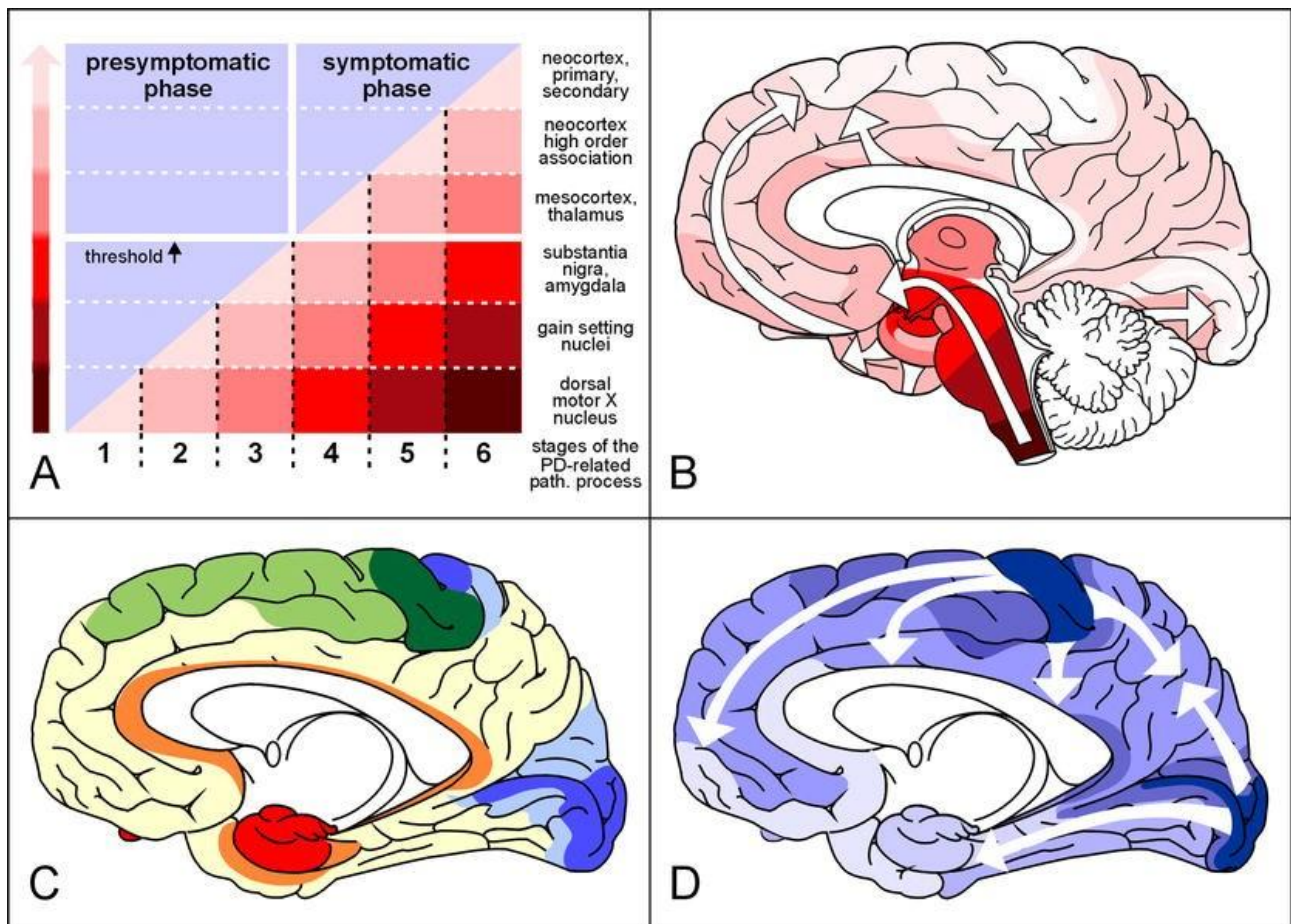


Abbildung 7: Braak-Staging. **A** Stadien 1-6 und ihre Korrelation zur Lewy-Pathologie in Hirnarealen sowie zu klinischen Phasen. **B** Aszendierende Lewy-Pathologie dargestellt durch Pfeile vom Hirnstamm bis in höhere Assoziationszentren. **C** Zusammensetzung des zerebralen Kortex: Allokokortex (rot), Neokortex mit primär (dunkelblau) und sekundärsensorischen Anteilen (hellblau) sowie höheren Assoziationsarealen (orange). Der frontale Neokortex umfasst primärmotorische (dunkelgrün), prämotorische (hellgrün) und präfrontale Areale. **D** Neokortikale Myelinisierung dargestellt als sich ausbreitender Prozess (Pfeile). Dies führt im Erwachsenen zu unterschiedlich stark myelinisierten Arealen mit starker Ausprägung in den primärsensorischen und -motorischen Arealen (dunkelblau) und schwächerer Myelinisierung mit zunehmender Entfernung von diesen. Andererseits konnten diverse Studien das Braak-Staging durchaus replizieren (JELLINGER, 2003, 2004; NEUMANN et al., 2004; SAITO et al., 2004; UCHIKADO et al., 2006) und eine statistisch hoch signifikante Intra- und Inter-Rater-Reliabilität sowie Eignung für die Routine-Pathologie aufzeigen (MULLER et al., 2005). Für eine Subgruppe von PD-Patienten mit jungem Beginn und langem klinischem Verlauf konnte das Braak-Staging auch erfolgreich mit dem klinischen Phänotyp korreliert werden (HALLIDAY et al., 2008). Die durch Braak und Kollegen aufgestellten Hypothesen bieten somit trotz anhaltender Kontroversen bezüglich klinischer Validität einen adäquaten Forschungsrahmen zur Beurteilung der Ausbreitung zentraler und peripherer α Syn-Pathologie, zur neuropathologischen Definition des prodromalen PD und zur Suche nach Biomarkern.

4.4.3 Die Dual-Hit-Hypothese

Die „Dual-Hit-Hypothese“ greift die frühesten neuropathologischen Stadien der Braak-Klassifikation auf und postuliert so zwei Ausgangspunkte der α Syn-Ausbreitung: (I) die Nasenschleimhaut und (II) die gastrische Mukosa (HAWKES et al., 2007, 2009). Diese seien Eintrittspforten eines möglichen Pathogens in das ZNS, welches zur pathophysiologischen Kaskade der α Syn-Aggregation und konsequenter Neurodegeneration führe. Der Hypothese zufolge stellt das Riechepithel via Filae olfactoriae einen unmittelbaren Kontakt zur Umwelt dar, über den ein Pathogen entlang neuroanatomischer Pfade in das ZNS eindringen kann. Aber auch der über den Vagusnerv mit dem Hirnstamm verbundene Gastrointestinaltrakt (GIT), und insbesondere der Magen (BRAAK et al., 2006b), seien anfällig für Erreger. Denn nicht nur sei die Magenschleimhaut durch ein ungewöhnlich großes Segment des dorsalen Vaguskerne innerviert (HOPKINS et al., 1996), in den ein potentiell Pathogen einfallen könne. Erreger könnten auch lange Zeit im Chymus verweilen und über Mukosaschäden eindringen (BRAAK et al., 2006b). Es gibt verschiedene Erklärungen, die eine solche Ätiologie im GIT plausibel machen: Erstens ist der GIT als Tor zur Umwelt exogenen Noxen besonders exponiert, die selbstständig eine α Syn-Fehlfaltung induzieren könnten (PAN-MONTOJO et al., 2010; PAN-MONTOJO et al., 2012). Zweitens stellt das Mikrobiom des GIT eine Quelle endogener Noxen dar, die direkt oder via Inflammation zur Aggregation führen könnten (CHEN et al., 2019; MIRAGLIA, COLLA, 2019). Drittens werden exogene Infektionen, z. B. mit pathogenem *Escherichia coli* (CHEN et al., 2016) oder *Helicobacter pylori* (ALTSCHULER, 1996; DOBBS et al., 2000), als Initiator diverser neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert (BROWN, 2019; TULISIAK et al., 2019).

Es gibt Hinweise darauf, dass sich GIT- und Olfaktorius-Pathologie unabhängig voneinander und mit unterschiedlicher Auswirkung auf den Krankheitsverlauf entwickeln. So konnten LEBOUVIER et al. (2010b) die Lewy-Pathologie im Kolon zwar mit Verlaufsparemtern wie L-Dopa-Ansprechen und axialem UPDRS-III-Subscore korrelieren, nicht jedoch mit olfaktorischer Dysfunktion (LEBOUVIER et al., 2011). Es ist daher plausibel, dass neuropathologische Veränderungen multizentrisch und interindividuell unterschiedlich in zentralem und peripherem Nervensystem auftreten (DICKSON et al., 2008). So konnte z. B. auch eine klinische Fall-Kontroll-Studie zeigen, dass Hyposmie bzw. Anosmie im Mittel $11,2 \pm 11,1$ Jahre vor Einsetzen typischer Motor-Symptomatik feststellbar ist, Obstipation sogar $16,8 \pm 5,7$ Jahre früher (GAENSLEN et al., 2011). Riechepithel und Gastrointestinaltrakt verdienen somit als besonders früh histopathologisch wie auch klinisch betroffene Regionen besondere Aufmerksamkeit bei der Frage nach der Ätiologie pathologischer Veränderungen. Die vorliegende Arbeit orientiert sich im Folgenden insbesondere am GIT als den möglicherweise frühesten betroffenen Ort der α Syn-Aggregation.

4.5 Der Darm als Mittelpunkt der Pathogenese

4.5.1 Neuroanatomische Grundlagen

Thus the ENS can be regarded as the first brain (FURNESS, STEBBING, 2018)

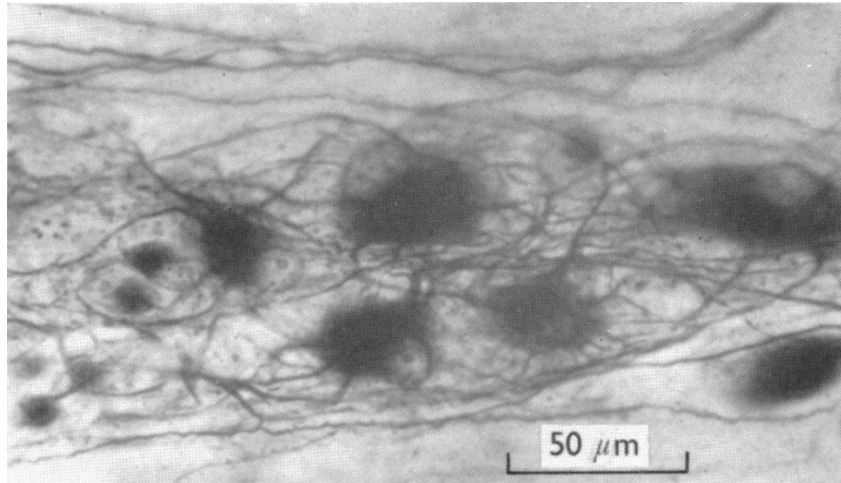


Abbildung 8: Die Ganglien der Darmplexus sind untereinander komplex verwoben (GUNN, 1968). Dünndarm eines Schafes mit interkonnektierten Nervenzellen innerhalb des Plexus myentericus.

Zum besseren Verständnis pathologisch veränderter Darmstrukturen soll hier noch einmal auf den (neuro)physiologischen Aufbau des Gastrointestinaltrakts (GIT) eingegangen werden. Es werden Ursprung und Ausdehnung sowie Verbindungen der Strukturen untereinander erläutert sowie auch Neurotransmitter, Funktion und Myelinisierungsstatus beschrieben. Da es über die Länge des GIT teils starke Unterschiede in Quantität und Qualität der Innervation gibt, wird hier, sofern nicht anders angegeben, nur auf den prinzipiellen Aufbau enterischer Strukturen eingegangen.

Traditionell werden die peripheren Nervenstrukturen des GIT in „autonome“ und „somatische“ Anteile unterschieden (LANGLEY, 1921). Das autonome Nervensystem ist dreigliedrig weiter unterteilt in: (I) autonome Nervenzellen des „intrinsischen“ enterischen Nervensystems (ENS). Hierunter fällt das Darmgeflecht („Darmplexus“; siehe Abbildung 8) samt Plexus submucosus (MEISSNER, 1857) und myentericus (AUERBACH, 1862); weiterhin (II) sympathische und (III) parasympathische Neurone. Diese beiden Systeme stehen dem ENS als „extrinsische“ Anteile des autonomen Nervensystems gegenüber, da sie ihren Ursprung nicht im Darm, sondern im ZNS haben. Neben dem autonomen Nervensystem finden sich schließlich auch somatische Nervenanteile im GIT, d. h. neuronale Strukturen zentralen Ursprungs mit sensorisch afferenter Qualität (BROOKES et al., 2013) oder efferenter Funktion, z. B. in der Regulation des Blutgefäßdurchmessers (HOLZER, 2006).

Das weitgehend autonom arbeitende ENS ist unser evolutionär gesehen älteres „erstes Gehirn“ (FURNESS, STEBBING, 2018), welches mit $2-6 \times 10^8$ Nervenzellen eine dem Rückenmark vergleichbare neuronale Kapazität aufweist (FURNESS, COSTA, 1980). Der Großteil dieser Neurone findet sich in den Plexus organisiert (FURNESS et al., 2014), die in weit oral gelegenen Abschnitten zwar teils durch das ZNS gesteuert werden, aboral jedoch autonom funktionieren können (BAYLISS, STARLING, 1899). Bei den Plexus handelt

es sich um interkonnektierte Ansammlungen von Ganglien, die in funktionell und örtlich voneinander abgrenzbare Netzwerke unterteilt werden (COOKE, 1986; FURNESS, 2006). Zu den Konstituenten des ENS zählt zum einen der Plexus myentericus (AUERBACH, 1862), der in zunehmend feinere Primär-, Sekundär- und Tertiärgeflechte untergliedert werden kann (SCHABADASCH, 1930; STÖHR, 1930). Er ist zwischen den beiden äußeren Muskelschichten des GIT gelegen und erstreckt sich zusammenhängend vom Ösophagus zum Analsphinkter (FURNESS et al., 2014). Dieses Nervengeflecht kontrolliert die Bewegung der umliegenden Tunica muscularis (auch „Muskularis“) und somit insbesondere die Peristaltik (BENARROCH, 2007; CERSOSIMO, BENARROCH, 2008). Das zweite Netzwerk des ENS ist der Plexus submucosus, der sich zwischen Tunica muscularis und Mukosa befindet (MEISSNER, 1857) und in einen inneren und äußeren Ring untergliedert werden kann (COOKE, 1986; GUNN, 1968; SCHABADASCH, 1930; SCHEUERMANN, STACH, 1984). Auch er findet sich im gesamten GIT, bildet jedoch erst aboral des Magens ein zusammenhängendes Netzwerk (FURNESS, 2006). Die verschiedenen Neurone dieses Geflechts sind verantwortlich für reflektorische Prozesse wie Sekretion und Blutfluss der Mukosa, teils aber auch für die Motorik der glatten Muskulatur (BENARROCH, 2007; CERSOSIMO, BENARROCH, 2008). Plexus submucosus und myentericus sind somit die wesentlichen neuronalen Strukturen innerhalb des intrinsischen ENS und finden sich im gesamten GIT in Submukosa bzw. Muskularis, wo sie z. B. peristaltisch oder sekretorisch wirken.

Die extrinsische Innervation des GIT erfolgt durch Sympathikus und Parasympathikus. Im sympathischen Pfad werden die cholinergen Afferenzen vom Nucleus intermediolateralis des thorakolumbalen Rückenmarks in den para- und prävertebralen Ganglien auf noradrenerge Fasern verschaltet und in den GIT projiziert (CERVI et al., 2014; COSTES et al., 2013; LUNDGREN, 2000). Der Plexus coeliacus ist hierbei verantwortlich für Magen und Duodenum, der Plexus mesentericus superior für die folgenden Abschnitte oral der Flexura coli sinistra. Ab dort innerviert der Plexus mesentericus inferior das restliche Kolon sympathisch, die Ganglia pelvica versorgen schließlich das distale Rektum (SIMMONS, 1985). Diese peripheren sympathischen Nerven enthalten überwiegend unmyelinisierte C-Fasern (HEATH, 1983; SENGUPTA, GEBHART, 1994). Funktionell inhibieren prä-vertebrale sympathische Fasern die Motilität der glatten Muskulatur (GERSHON, 1967) sowie die sekretorische (FURNESS, COSTA, 1980; SJÖVALL et al., 1983) und motorische (HIRST, MCKIRDY, 1974; NORTH, SURPRENANT, 1985) Funktion der ENS-Plexus und induzieren eine Vasokonstriktion (EVANS, SURPRENANT, 1992; LOMAX et al., 2007). Die Axone der prävertebralen sympathischen Plexus hingegen lösen ausschließlich Gefäßverengung aus, was ihre Lokalisation streng perivaskulär an Arteriolen erklärt (LOMAX et al., 2010). Die Fasern des prävertebralen Plexus haben zwar ihre höchste Dichte an arteriellen Gefäßen und Darmplexus, sind aber auch teils mit venösen Gefäßen oder dem Lymphsystem assoziiert (FELTEN et al., 1985; FURNESS, 1970; LOMAX et al., 2010). Als freie Fasern finden sie sich parallel zur Ringmuskulatur oder bis in die Submukosa und in die Villi der Mukosa hinein (FURNESS, 1970). Neben den beschriebenen „peri-vaskulären“ Sympathikusfasern finden sich auch „para-vaskuläre“ Axone unterschiedlicher Qualität, welche dem Verlauf arterieller Gefäße in die Peripherie folgen (FURNESS, COSTA, 1980). Neuronale Strukturen finden sich im GIT folglich nicht nur entlang der Plexus, sondern auch in Form sympathischer Axone peri- und paravaskulär in hoher Dichte.

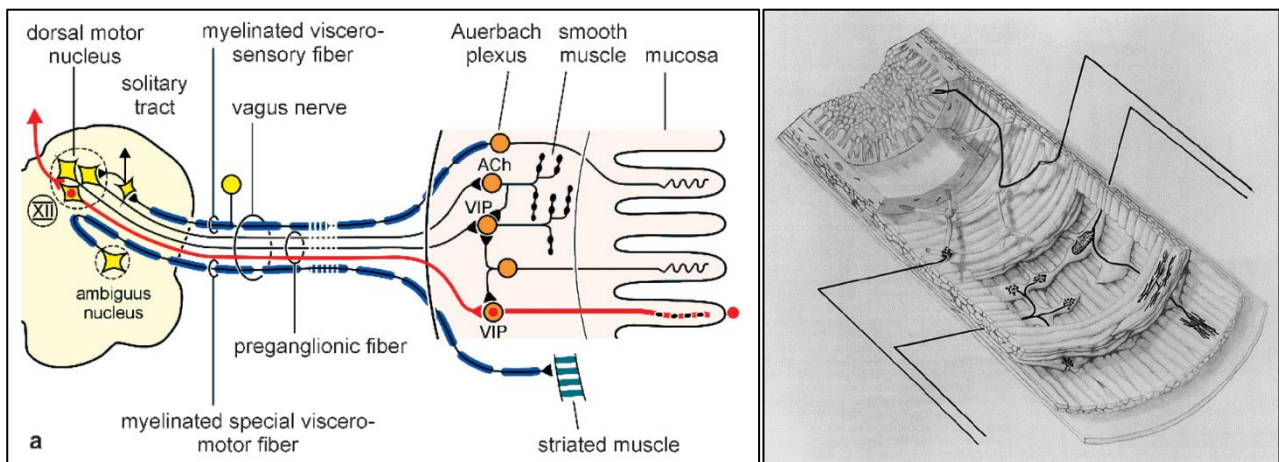


Abbildung 9 (links): Der Vagusnerv verbindet ENS und ZNS (BRAAK, DEL TREDICI, 2009). Präganglionäre viszerosensible (rot) und viszeromotorische (schwarz) unmyelinisierte Fasern des dorsalen Vagusnervs kommunizieren mit postganglionären Neuronen des Darmplexus. Im Vagusnerv verlaufen aber auch myelinisierte Fasern: Einerseits die des Ncl. ambiguus zu den quergestreiften Muskeln des Larynx und oberen Ösophagus, andererseits viszerosensorische Anteile ausgehend vom Ncl. tractus solitarii.

Abbildung 10 (rechts): Topographie der Afferenzen und Efferenzen des Vagusnervs (POWLEY et al., 1994). Vagale Afferenzen sind schematisch durch rechts oben im Bild entspringende Axone dargestellt, Efferenzen finden sich links unten im Bild.

Der „Gegenspieler“ des sympathischen Grenzstrangs sind die parasympathischen Efferenzen des Vagusnervs und sakralen Rückenmarks, über die das ZNS Peristaltik und Sekretion im GIT fördert (GRUNDY, 1988). Die präganglionären cholinergen Vagusfasern entspringen für Pharynx, Larynx und Ösophagus aus dem Nucleus ambiguus, Nucleus dorsalis nervi vagi und der Intermediärzone (BERTHOUD, NEUHUBER, 2000). Für den weiter aboralen GIT gilt, dass alle präganglionären Fasern des Vagusnervs allein dem viszerotop gegliederten dorsalen Vagusnerv entspringen (HOPKINS et al., 1996). Die Verschaltung auf postganglionäre Neurone (Abbildung 9) findet erst in den Ganglien (Abbildung 10) des ENS statt (POWLEY et al., 1994). Die parasympathischen Efferenzen stimulieren in ihren Erfolgsorganen glatte Muskelzellen sowie nachgeschaltete inhibitorische und exzitatorische Neurone (HORNBY, ABRAHAMS, 2000). Allerdings besitzt der Vagusnerv afferente Anteile, welche die efferenten um ein Vielfaches übersteigen (PRECHTL, POWLEY, 1990). Ihre pseudounipolaren Somata – ähnlich denen der Spinalganglien – liegen im Ganglion inferior nervi vagi; ihre Fasern enden aufseiten des ZNS bevorzugt im Nucleus tractus solitarii, seltener in der Area postrema oder dem dorsalen Vagusnerv (BERTHOUD, NEUHUBER, 2000). Im GIT verknüpfen sich die Nervenenden teils mit glatter Muskulatur oder dem Plexus myentericus, teils reichen sie aber auch weit bis in die Lamina propria mucosae und in die Villi und Krypten, sind jedoch spärlich mit dem Plexus submucosus (Abbildung 10) verbunden (BERTHOUD et al., 1995; BERTHOUD, NEUHUBER, 2000; POWLEY et al., 1994; WILLIAMS et al., 1997). Die Dichte der Vagus-Afferenzen (BERTHOUD et al., 1997) und -Efferenzen (HOLST et al., 1997) weist eine gewisse Abnahme von oral nach aboral auf. Die Myelinisierung der vagalen Fasern (siehe Abbildung 9) ist dabei heterogen (AGOSTONI et al., 1957; ASALA, BOWER, 1986; EVANS, MURRAY, 1954; PRECHTL, POWLEY, 1990): so sind die aus dem dorsalen Vagusnerv stammenden Fasern unmyelinisiert, die des Ncl. tractus solitarii und Ncl. ambiguus hingegen sind myelinisiert (BRAAK et al., 2003b). Ab dem Cannon-Böhm-Punkt knapp proximal der linken Kolonflexur geht die Innervation allmählich

vom Vagusnerv auf das Sakralmark über, bevor letzteres gänzlich die parasympathische Versorgung des distalen Kolons und Rektums übernimmt (FURNESS et al., 2014). Neben den sympathischen innervieren demnach auch die parasympathischen Fasern den gesamten GIT, wenngleich in einem komplexen Muster unterschiedlicher Qualität und Myelinisierung.

Schließlich nehmen auch als primär sensorisch afferent beschriebene Neurone an der enterischen Innervation teil. Ihre pseudounipolaren Somata sitzen in den Spinalganglien und entsenden dünne C-Faser-Axone (HIND et al., 2005), die im GIT ein breites Netz freier Nervenendigungen bilden (BROOKES et al., 2013). Sie treten auch mit den Plexus submucosus et myentericus in Kontakt, finden sich perivaskulär, perilymphatisch und reichen bis in die Villi der Mukosa, finden sich jedoch nur selten in der Muskularis (CHIOCCETTI et al., 2006; GREEN, DOCKRAY, 1987; STERNINI, ANDERSON, 1992). Diese „afferenten“ Neurone versorgen jedoch nicht nur das ZNS mit Informationen aus der Peripherie, sondern modulieren durchaus im Wechselspiel mit dem ENS auch Vasodilatation und Darmpermeabilität efferent (MCCULLOCH, COOKE, 1989; VANNER, 1994). Die Axone der Spinalganglien nehmen somit ebenso wie Sympathikus und Parasympathikus an der Innervation des gesamten GIT teil und können insbesondere in der Nähe gastrointestinaler Gefäße angetroffen werden.

Das Nervensystem des GIT umfasst demnach mehr als nur das ENS. Vielfältige, mittlerweile gut erforschte Teilsysteme heterogenen Ursprungs interagieren dynamisch miteinander. Über die Länge des GIT wechseln die Anteile der einzelnen Innervationskomponenten an der Integration von Funktionen wie Motilität und Sekretion. Die Plexus des ENS finden sich in der Muskularis und Submukosa als wichtige Knotenpunkte der Innervation und werden zwar durch Sympathikus und Parasympathikus beeinflusst, arbeiten jedoch zu großen Teilen autonom. Primär sensorisch afferente Neurone versorgen das ZNS mit Informationen des GIT, können jedoch auch efferente Funktionen übernehmen. Entlang der Gefäß- und Lymphbahnen finden sich begleitende Axone des Sympathikus, Parasympathikus und der Spinalganglien.

4.5.2 Die Darm-Hirn-Achse

Für viele Krankheiten, die vormals isoliert in anderen Organsystemen lokalisiert wurden, schärft sich zunehmend eine Assoziation zum Geschehen im Darm aus. So besagt ein Hippokrates von Kos zweifelhaft zugeschriebener Aphorismus:

Alle Krankheiten beginnen im Darm (GASBARRINI et al., 2016; LYON, 2018).

Dies passt nicht nur zu vielen Risikofaktoren zur Entwicklung eines PD, sondern gerade zu den häufigen (SCHAPIRA et al., 2017), schon früh beginnenden (JONES, CIUCCI, 2016) und im Verlauf teils bedrohlichen (WON et al., 2021) nicht-motorischen Symptomen. Vor dem Hintergrund des Braak-Stagings, das einen aufsteigenden Prozess postuliert, der Prion-Hypothese, welche eine Ausbreitung entlang neuroanatomischer Pfade identifiziert und der Dual-Hit-Hypothese, welche Darm und Nasenschleimhaut als Orte früher Manifestation postuliert, erscheinen vom GIT ausgehende α Syn-Aggregate als Ursache zentraler Neuropathologie einer weiteren Untersuchung würdig.

Der Vagusnerv, der einen Großteil des GIT parasymphatisch innerviert, wurde als retrograder „Highway“ für die α Syn-Pathologie auf ihrem Weg in das ZNS beschrieben (BREEN et al., 2019). Denn einerseits konnte eine Vagotomie in zwei Registerstudien als protektiver Faktor erarbeitet werden (LIU et al., 2017; SVENSSON et al., 2015). Andererseits ist auch das Zökum vagal innerviert (ALTSCHULER et al., 1991) und jüngst als Eintrittspforte des aggregierten α Syn ins ZNS diskutiert (KILLINGER, LABRIE, 2019). Auch die Appendektomie wurde als präventiver Faktor zur Entwicklung eines PD diskutiert (LIU et al., 2020; MENDES et al., 2015), was jedoch in einer Metastudie nicht nachvollzogen werden konnte (LU et al., 2019). Trotz breiter Diskussion ist der Vagusnerv keinesfalls der einzige Pathway der „Darm-Hirn-Achse“: In Übereinstimmung mit Studien zu Prionenerkrankungen (MCBRIDE et al., 2001) wurden auch die Efferenzen des sympathischen Nervensystems via autonomer Ganglien und Splanchnikusnerven als Eintrittspforten von Protein-Aggregaten in das ZNS erkannt (BRAAK et al., 2007; VAN DEN BERGE et al., 2019; WAKABAYASHI, TAKAHASHI, 1997). Somit finden sich in der Literatur mindestens zwei potentielle Pfade, die der traditionellen Auffassung entgegenstehen, es handle sich bei den α Syn-Aggregationskrankheiten um rein zentral lokalisierte Krankheiten: (I) den Parasympathikus und (II) den Sympathikus. Auch ein „Second“- oder „Third-Hit“-Szenario mit Beginn der Protein-Fehlfaltung in weiteren Organen ist plausibel diskutiert worden (VAN DEN BERGE et al., 2019).

4.5.3 Periphere Histopathologie

Analog zur zentralen Histopathologie finden sich auch im GIT charakteristische histopathologische Muster (Abbildung 11). So fanden sich die aus dem ZNS bekannten LB auch im Ösophagus von PD-Patienten mit Dysphagie bzw. Achalasie (YOSHIMURA et al., 1982, zitiert nach MAEDA et al. 2013)(QUALMAN et al., 1984) sowie im unteren GIT bei PD-Patienten mit Megakolon (KUPSKY et al., 1987). Schließlich wurden diese Muster systematisch in den Darmplexus von PD-Fällen untersucht (WAKABAYASHI et al., 1988). Ähnliche Muster wurden in DLB-Fällen beschrieben, nicht jedoch für Patienten mit Multisystematrophie, bei denen die α Syn-Aggregation im Wesentlichen auf die Oligodendroglia sowie einzelne periphere postganglionär-symphatische, cholinerge und noradrenerge Neurone beschränkt zu sein scheint (COON et al., 2018).

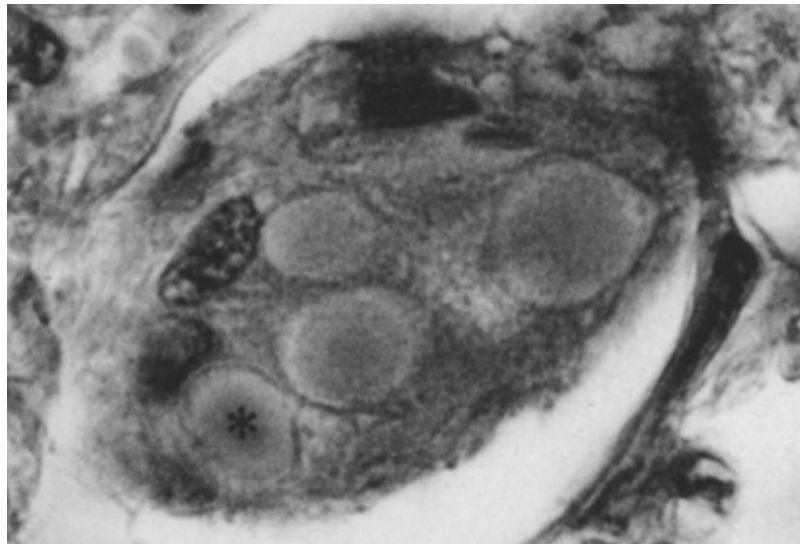


Abbildung 11: Auch in den Ganglien des GIT finden sich intraneuronale Lewy-Körperchen. (WAKABAYASHI et al., 1988). Patient mit idiopathischem Morbus Parkinson, Hämatoxylin-Eosin-Färbung. 1200-fache Vergrößerung eines Ganglions des Plexus myentericus im unteren Ösophagus.

Bereits in frühen morphologischen Studien zu den α -Synuklein-Aggregationskrankheiten konnten folgende Erkenntnisse gewonnen werden: (I) LB finden sich entlang des gesamten GIT; (II) es besteht ein gewisser oral-aboral abnehmender (bzw. „kaudo-rostral“ zunehmender) Gradient an LB (WAKABAYASHI et al., 1988); (III) die LB des GIT lagern sich im Plexus submucosus et myentericus als eosinophile, hyaline Einschlüsse ab, vergleichbar in Form, Größe und Ultrastruktur mit dem „klassischen Typ“ der LB im Hirnstamm (KUPSKY et al., 1987; WAKABAYASHI et al., 1988); (IV) LB finden sich nicht in allen PD-Fällen (DEN, BETHLEM, 1960); (V) LB finden sich auch im GIT von Probanden ohne neurodegenerative Diagnose (WAKABAYASHI et al., 1988); (VI) es besteht eine erhöhte Vulnerabilität VIPerger Neurone (WAKABAYASHI et al., 1990). Ein Nervenzellverlust im GIT hingegen wurde (im Gegensatz z. B. zur Substantia nigra) nicht beobachtet (QUALMAN et al., 1984; WAKABAYASHI et al., 1988), was in einer größeren Studie zur Untersuchung des Plexus myentericus bestätigt wurde (ANNERINO et al., 2012). In den meisten Studien war die α Syn-Immunreaktivität im Plexus myentericus stärker als im Plexus submucosus (ANNERINO et al., 2012; BEACH et al., 2010; POUCKET et al., 2012a; WAKABAYASHI et al., 1988). Nur in einer kleineren Stichprobe waren Dichte und Prävalenz der Lewy-Pathologie im Plexus myentericus und submucosus ähnlich (BEACH et al., 2016b). Aufgrund der Beobachtung, dass die Lewy-Pathologie 2-5 Jahre (SHANNON et al., 2012a) und phosphoryliertes α Syn 10-20 Jahre (STOKHOLM et al., 2016) vor der klinischen Diagnose nachgewiesen werden konnte, wurde schließlich vorgeschlagen, enterisches α Syn als Biomarker zur Frühdiagnostik zu nutzen (BARRENSCHEE et al., 2017).

α Syn und damit einhergehende Lewy-Pathologie sind also seit etwa 40 Jahren im GIT von Patienten mit α -Synuklein-Aggregationskrankheiten bekannt und der Histopathologie des ZNS morphologisch ähnlich. Auf der Suche nach einer Frühdiagnostik und der daraus erhofften Basis für verlaufsmodifizierende Therapien (DAWSON, DAWSON, 2019) werden in den letzten Jahren vermehrte Anstrengungen zur Entwicklung sensitiver und spezifischer Diagnostikverfahren zum Nachweis von α Syn in GIT-Proben unternommen.

4.6 Fragestellung

Die explorative Arbeitshypothese dieser Studie lautet: „**Der Gastrointestinaltrakt stellt ein zur neuropathologischen Diagnose der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten geeignetes Ziel dar**“. Dies wird anhand der Immunreaktivität α Syn-positiver Strukturen sowie statistischer Maße wie Sensitivität und Spezifität beispielhafter Protokolle untersucht. Mittels der Methoden Immunhistochemie und PET Blot sowie der Variation von Antikörpern und Proteinase-Vorbehandlung werden Phosphorylierungsstatus als wichtigste posttranslationale Modifikation und Proteinaseresistenz als Charakteristikum neurodegenerativer Aggregate kontrolliert (vgl. Kapitel 4.3.3). Der Fokus der vorliegenden Studie liegt auf der Untersuchung des Nutzens enterischer Diagnostik als Grundlage zur Entwicklung einer neuropathologischen Frühdiagnostik. Es ergeben sich die folgenden pathophysiologischen und diagnostischen Fragestellungen:

- ❖ Welche spezifischen und unspezifischen Reaktivitätsmuster finden sich im Gastrointestinaltrakt?
- ❖ Folgt das α -Synuklein-Verteilungsmuster einem Gradienten?
- ❖ Korreliert das Ausmaß an α -Synuklein-Pathologie mit der Erkrankungsdauer?
- ❖ Wie groß muss eine Biopsie mindestens sein?
- ❖ Welches ist das neuropathologische Diagnostikverfahren der Wahl?

5 Material und Methoden

Mit der Verbesserung der Technik sehen wir eine nervöse Störung nach der anderen aus der Reihe der funktionellen in die der organischen übergehen. – F. H. Lewy in „Lewandowskys Handbuch der Neurologie“, 1912

Im Rahmen der vorliegenden Studie sollen die pathophysiologischen Besonderheiten der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten im Allgemeinen sowie des PD im Speziellen berücksichtigt werden: Zum einen zählen dazu die posttranslationalen Modifikationen, insbesondere die Phosphorylierung des α -Synukleins an Serin 129, was durch Einsatz eines spezifisch bindenden Antikörpers (pSer129) abgebildet wird. Zum anderen werden Aggregate von Akkumulaten unterschieden, indem das PET-Blot-Verfahren eingesetzt wird, welches eine intensive Proteinase-Vorbehandlung ermöglicht. Die Lewy-Pathologie in den Nervenplexus des GIT wird morphologisch untersucht durch Verfahren mit hoher anatomischer Auflösung wie der Hämatoxylin-Eosin-(H.-E.-)Färbung und Immunhistochemie (IHC) bzw. moderater anatomischer Auflösung im Falle des PET Blot. Schließlich werden neben PD auch Patienten mit Parkinson-Demenz (PDD) und Demenz mit Lewykörperchen (DLB) in die als Spektrum verstandene Diagnosegruppe sowie klinisch häufige Differentialdiagnosen in die Kontrollgruppe einbezogen. Dies soll die Abgrenzbarkeit zwischen den als Spektrum verstandenen (vgl. Kapitel 4.1) α -Synuklein-Aggregationskrankheiten und neurodegenerativen Krankheiten ohne neuronale Lewy-Pathologie sicherstellen.

5.1 Materialien

Im Folgenden werden nach einer Übersicht über forschungsethische Aspekte zunächst Details zu den eingeschlossenen Autopsieproben, klinische Daten der Patienten in Diagnose- und Kontrollgruppe sowie die getesteten Antikörper vorgestellt. Auch grundlegende statistische Ausgangsdaten werden an dieser Stelle tabellarisch angeführt. Ausführliche Tabellen zu den genutzten Reagenzien, Materialien, Geräten und Informationsverarbeitung sind in den jeweiligen Kapiteln aufgeführt.

5.1.1 Forschungsethische Aspekte

Die Gewebeproben stammen aus der Gewebebank des Instituts für Neuropathologie, Homburg (Saar), am Universitätsklinikum des Saarlandes. Die Gewebe wurden im Zeitraum zwischen 2003 und 2018 in Autopsien durch einen Facharzt für Neuropathologie in Göttingen und Homburg (Saar) gewonnen. Das Einverständnis zur Gewebeentnahme zu Forschungszwecken wurde sämtlich vor Beginn der Studie (2019) entweder prospektiv von Patienten oder retrospektiv von Angehörigen schriftlich eingeholt. Die Obduktionen sowie auch das Brainbanking und entsprechende Forschungsvorhaben wurden im Voraus durch entsprechende Ethikanträge bewilligt (Landesärztekammer Hessen Nr. FF89/2008).

5.1.2 Patientenproben

Autopsiegewebe aus dem Magen-Darm-Trakt von 20 Personen mit einer neuropathologisch gesicherten Diagnose eines M. Parkinson (n = 11), einer Parkinson-Demenz (n = 3), oder Demenz mit Lewy-Körperchen (n = 6) aus der Brainbank des Instituts für Neuropathologie der Universität des Saarlandes wurden mit 15 Kontrollpersonen mit klinischen Differentialdiagnosen verglichen. Dieser Vergleich umfasste insgesamt 85 Gewebeproben aus unserer Diagnosegruppe und 69 differentialdiagnostische Gewebeproben. Die Proben stammten aus der Speiseröhre (n = 3), dem Magen (n = 29), dem Zwölffingerdarm (n = 27), dem Jejunum (n = 19), dem Ileum (n = 31), der Appendix (n = 13), dem Dickdarm (n = 17) und dem Rektum (n = 15). Die Differentialdiagnose-Fälle umfassten 37 Proben, die dem frontotemporalen Spektrum zugeordnet werden konnten, 7 Proben für einen Fall von Multisystematrophie und 25 weitere Proben, welche hauptsächlich als neurodegenerative oder neurovaskuläre Erkrankungen klassifiziert werden konnten. Die Stadieneinteilung zeigte eine Pathologie im Endstadium, d. h. Braak Stadium V/VI für M. Parkinson oder kortikales McKeith-Stadium im Fall einer Demenz mit Lewy-Körperchen. Die Proben der Parkinson-Patienten waren in 6 der 11 Fälle Pathologien im Endstadium, in 3 von 11 Fällen lag ein fortgeschrittenes Stadium (Braak IV) vor. Weitere Details und Aufschlüsselungen finden sich in den hier folgenden Tabellen sowie im Anhang (insbesondere Tabelle 65).

Die einzelnen Proben wurden in jeweils ca. 2 x 2 x 1,5 cm fassenden Paraffinblöcken haltbar gemacht. Die Blöcke wurden im Anschluss kühl, trocken und lichtgeschützt gelagert (Abbildung 12). Wo dies möglich war, wurden die Autopsieproben des GIT als Querschnitte in Form intakter Zirkumferenzen des betreffenden Organs angefertigt. Von Organen, deren Größe dies nicht zuließ (z. B. Proben des Magens), wurden mehrere Proben streifenförmig in jeweils einen Block eingefasst. Zu Beginn der vorliegenden Studie lagen Proben von Ösophagus, Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum unterschiedlichen Ausmaßes und in unterschiedlicher Anzahl von Blöcken je Fall vor (siehe Tabelle 2). Neben den Darmabschnitten wurden für die Diagnosegruppe auch Gehirnproben aus je mindestens drei Abschnitten des Zentralnervensystems zum Staging nach Braak und McKeith genutzt. Der Gesamtumfang der Arbeit bezogen rein auf die in die Endauswertung eingeschlossenen Präparate des GIT entspricht 154 H.-E.-, 308 PET-Blot- und 462 IHC-Färbungen gastrointestinaler Organe zuzüglich Positiv-Kontrollpräparaten, Serienschnitten und zum Staging genutzten Gehirnproben.



Abbildung 12: Die Paraffinblöcke lagern trocken und lichtgeschützt im Archiv. Abgebildet sind exemplarische Organpräparate unterschiedlicher Lokalisation.

Die Diagnosegruppe (Tabelle 4) der Studie umfasst insgesamt 11 Fälle mit neuropathologischer Diagnose eines PD, 3 mit PDD und 6 mit DLB. Es wurden außerdem Proben von 15 Patienten mit typischen Differentialdiagnosen (Tabelle 5) als Kontrollfälle eingeschlossen. Ein Patient mit Multisystematrophie (MSA) wurde ebenfalls als Kontrollfall eingeschlossen, nachdem dieser in unseren Vorversuchen passend zur Literatur (COON et al., 2018) keine erhöhte Immunreaktivität im GIT aufwies. Für die Diagnosegruppe wurden alle Fälle der Gewebekbank genutzt, die die beiden folgenden Kriterien erfüllten: (I) GIT-Präparate sind in der Gewebekbank vorhanden und (II) es liegt die neuropathologisch gesicherte Diagnose eines PD, einer PDD oder DLB vor. Die Kontrollgruppe wurde mit besonderem Augenmerk auf relevante Differentialdiagnosen (insbesondere Parkinson-Plus-Syndrome) auf 15 Fälle festgelegt, welche den folgenden Kriterien entsprechen mussten: (I) Darmpräparate sind in der Gewebekbank vorhanden, (II) es bestand zum Todeszeitpunkt laut Krankenakte der klinische Verdacht auf eine neurodegenerative Erkrankung und (III) neuropathologisch wurde die Diagnose eines PD, PDD und DLB ausgeschlossen. Im Folgenden werden tabellarische Übersichten über die wichtigsten Informationen zu Diagnose- und Kontrollgruppe gegeben (Tabelle 4 und Tabelle 5).

Tabelle 2: Anzahl der einzelnen gastrointestinalen Organabschnitte im Vergleich zur Stichprobe (n = 154).

Organ	Diagnose- gruppe	Kontroll- gruppe	Gesamt	Prozent
Oesophagus	2	1	3	1,9 %
Magen	16	13	29	18,8 %
Duodenum	14	13	27	17,5%
Jejunum	11	8	19	12,3 %
Ileum	16	15	31	20,1 %
Appendix	6	7	13	8,4 %
Kolon	9	8	17	11 %
Rektum	11	4	15	9,7 %
Gesamt	85	69	154	100 %
Prozent	55,2 %	44,8 %	100 %	100 %

Tabelle 3: Patientendaten der Diagnose- (n = 20) und Kontrollgruppe (n = 15) ähneln sich hinsichtlich statistischer Parameter. Standardabweichungen ggf. in Klammern angegeben.

Parameter	Diagnosegruppe	Kontrollgruppe
Fallzahl	20	15
Anzahl Präparate	85	69
Fallzahl nach Geschlecht m:w	12:8	9:6
Geschlechterverhältnis m:w	1,5	1,5
Altersspanne	50-87	59-89
Altersmedian	73	74
Mittleres Alter	73,46 (SD = 9,77)	72,39 (SD = 8,76)
Alter zum Diagnosezeitpunkt	61.33 (SD = 10.67)	65.38 (SD = 8.42)
Zeitraum Diagnose bis Tod (Jahre)	11,4 (SD = 6,54)	7,6 (SD = 3,78)

Tabelle 4: Statistische Daten der Diagnosegruppe (n = 20). Eingeschlossen wurden Parkinson, PDD- und DLB-Fälle.

Patient	Autopsiediagnose	Alter (Jahre)	Krankheits- dauer (Jahre)	Geschlecht	Todesursache	Braak- Stadium
PD1	M. Parkinson	83	NA	W	Herzinsuffizienz	V/VI
PD2	M. Parkinson	78	NA	M	Kreislaufversagen	V/VI
PD3	M. Parkinson	72	NA	M	Kreislaufversagen	V/VI
PD4	M. Parkinson	86	10	M	Aspiration	V/VI
PD5	M. Parkinson	72	21	M	Subduralblutung	V/VI
PD6	M. Parkinson	50	5	W	Peritonitis	IV
PD7	M. Parkinson	57	10	M	Intrazerebralblutung	IV
PD8	M. Parkinson	85	8	M	Kreislaufversagen	V/VI
PD9	M. Parkinson	81	11	W	Kreislaufversagen	IV
PD10	M. Parkinson	80	22	W	Gastroparese	V/VI
PD11	M. Parkinson	71	10	M	Kreislaufversagen	V/VI
PDD1	Parkinson-Demenz	75	16	M	Pneumonie	V/VI
PDD2	Parkinson-Demenz	73	12	M	Aneurysmaruptur	V/VI
PDD3	Parkinson-Demenz	73	24	W	Sepsis	V/VI
DLB1	Lewy-Körperchen- Demenz	87	NA	M	Pneumonie	V/VI
DLB2	Lewy-Körperchen- Demenz	67	10	M	Pneumonie	V/VI
DLB3	Lewy-Körperchen- Demenz	59	4	W	Pneumonie	V/VI
DLB4	Lewy-Körperchen- Demenz	82	9	W	Pneumonie	V/VI
DLB5	Lewy-Körperchen- Demenz	71	5	M	Pneumonie	V/VI
DLB6	Lewy-Körperchen- Demenz	76	4	W	Pneumonie	V/VI

Tabelle 5: Statistische Daten der Kontrollgruppe (n = 15). Die Kontrollfälle gehören mehrheitlich zur Gruppe der „Parkinson-Plus-Syndrome“.

Patient	Autopsiediagnose	Alter (Jahre)	Diagnose bis Tod (Jahre)	Geschlecht	Todesursache
AD1	M. Alzheimer	89	NA	W	Kreislaufversagen
ALS1	Amyotrophe Lateralsklerose	66	NA	M	Amyotrophe Lateralsklerose
CBD1	Kortikobasale Degeneration	75	2	M	Kreislaufversagen
CBD2	Kortikobasale Degeneration	66	5	W	Sepsis
CBD3	Kortikobasale Degeneration	70	1	W	Demenz
HI1	Multiple Hirninfarkte	75	NA	M	Aortendissektion
LE1	Lymphatische Enzephalopathie	67	NA	W	Kreislaufversagen
MSA1	Multisystematrophie	59	2	M	Leberversagen
PSP1	Progressive supranukleäre Blickparese	74	NA	W	Pneumonie
PSP2	Progressive supranukleäre Blickparese	74	5	M	Endokarditis
PSP3	Progressive supranukleäre Blickparese	73	6	M	Sepsis
PSP4	Progressive supranukleäre Blickparese	61	10	M	Kreislaufversagen
vPD1	Vaskuläres Parkinson- Syndrom	80	NA	W	Diabetes
vPD2	Vaskuläres Parkinson- Syndrom	76	1	M	Demenz
vPD3	Vaskuläres Parkinson- Syndrom	85	NA	M	Pneumonie

5.1.3 Antikörper

Vor Beginn der Endversuche wurden in der IHC wie auch im PET Blot verschiedene Kombinationen von Primär- und Sekundärantikörpern hinsichtlich ihres Färbeverhaltens getestet. Im Folgenden wird eine tabellarische Übersicht über alle im Laufe der Studie getesteten Antikörper gegeben (Tabelle 6 bis Tabelle 8). Protokolle, die sich über die Vorversuche hinaus robust zeigten und in die Endversuche übertragen wurden, sind in den jeweiligen Kapiteln des Methodenteils (Kapitel 5.2.2.3 und 5.2.3.3) aufgelistet.

Tabelle 6: In der Immunhistochemie genutzte Antikörper (Vor- und Endversuche). Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller.

Klon (Art.-Nr.)	Hersteller / Bezugsquelle	Wirts-spezies	Klonalität	Zielstruktur
10D2 (847-0102004701)	AJ Roboscreen GmbH, Leipzig, DE	Maus	monoklonal	α -Synuklein, Aminosäuren 119-126
pSer129 [EP1536Y] (ab51253)	Abcam plc., Cambridge, UK	Kaninchen	monoklonal	α -Synuklein, phosphoryliert an Serin 129
pSer129 (ab59264)	Abcam plc., Cambridge, UK	Kaninchen	polyklonal	α -Synuklein, phosphoryliert an Serin 129
Dako REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse (K5007)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark, Glostrup, DK	Ziege	polyklonal	Kaninchen- und Maus-Immunglobuline

Tabelle 7: Im PET Blot genutzte Primärantikörper (Vor- und Endversuche). Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller.

Klon (Art.-Nr.)	Hersteller / Bezugsquelle	Wirts-spezies	Klonalität	Zielstruktur
10D2 (847-0102004701)	AJ Roboscreen GmbH, Leipzig, DE	Maus	monoklonal	α -Synuklein, Aminosäuren 119-126
10D2 (NDG-076500)	DIANOVA GmbH, Hamburg, DE	Maus	monoklonal	α -Synuklein, Aminosäuren 119-126
LB509 (SIG-39725)	Covance Inc., Princeton, USA / HISS Diagnostics GmbH, Freiburg, DE	Maus	monoklonal	α -Synuklein, Aminosäuren 115-122
pSer129 [EP1536Y] (ab51253)	Abcam plc., Cambridge, UK	Kaninchen	monoklonal	α -Synuklein, phosphoryliert an Serin 129
pSer129 (ab59264)	Abcam plc., Cambridge, UK	Kaninchen	polyklonal	α -Synuklein, phosphoryliert an Serin 129

Tabelle 8: Im PET Blot genutzte Sekundärantikörper (Vor- und Endversuche). Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller.

Klon / Konjugat (Art.-Nr.)	Hersteller / Bezugsquelle	Wirts- spezies	Klonalität	Zielstruktur
Dako Goat Anti-Rabbit Immuno-globulins / AP (D0487)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark, Glostrup, DK	Ziege	polyklonal	Kaninchen- Immunglobulin
Dako Rabbit Anti-Mouse Immuno-globulins / AP (D0486)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark, Glostrup, DK	Ziege	polyklonal	Maus- Immunglobulin
EnVision G2 System Rabbit/Mouse / AP (K5355)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark, Glostrup, DK	Ziege	polyklonal	Kaninchen-/Maus- Immunglobuline
Streptavidin / AP (189732)	Calbiochem-Nova- biochem Corp., La Jolla, USA / Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	-	-	Biotin
Swine-anti-rabbit-F(ab')₂ / Biotin (E0431)	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark, Glostrup, DK	Schwein	polyklonal	Kaninchen- Immunglobulin

5.1.4 Geräte

Die genutzten Geräte orientierten sich am Laborstandard des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Zur Bewertung der H.-E.-Färbungen und IHC diente ein Durchlichtmikroskop mit 10x-Okular 20x-Objektiv zur Bewertung der einzelnen Gesichtsfelder. Für PET Blot wurde ein Auflicht-Setup mit stufenloser Vergrößerung verwendet, dessen Vergrößerung durch Kalibrierung identisch zu der des Auflichtmikroskops eingestellt wurde (Tabelle 9).

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Beschreibung des Geräts	Hersteller (Artikel-Nr.)
Auflichtmikroskop „SZX12“	Olympus Corporation, Tokio, JP
10x-Okular „WHS10X-H/22“	
1x-Objektiv „DFPLAPO1XPF“	
20x-Zusatzobjektiv „AL-20X“	
Lichtquelle „Highlight 3100“	
Durchlichtmikroskop „DM5000B“	Leica Camera AG, Wetzlar, DE
10x-Okular „HC PLAN s 10x/25“	
20x-Objektiv „HCX PL FLUOTAR 20x/0.50“	
Lichtquelle „CTR5000“	
Olympus BX40 mit Zweitbetrachterbrücke	Olympus Corporation, Tokio, JP
Kühlplatte „Blue Cooler“	Weinkauf Medizintechnik, Hallerndorf, DE (31400)
Mikrotom “RM 2035 BioCut Manual Microtome”	Leica Camera AG, Wetzlar, DE (8226-30-1021)
Pipette „Transferpette® S“,	BRAND GMBH + CO KG, Wertheim, DE
10, 20, 100, 200, 1000 µl	(705870, 705872, 705873, 705874, 705878, 705880)
Schüttler „Duomax 1030“	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE (543-32205-00)
Wärmeplatte “Thermo Scientific Heraeus®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE (31220061)
Hotplate”	
Wärmeschrank “Thermo Scientific Heraeus®	Heraeus Holding GmbH, Hanau, DE (50042301)
Function Line Series Heating and Drying Oven”	

5.2 Methoden

Bisherige Studien zur Erforschung gastrointestinaler Proben als Biomarker der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten waren in ihren Methoden wie auch Ergebnissen bislang sehr heterogen (Tabelle 48). Ein Schwerpunkt der vorliegenden Dissertation war daher eine transparente Methodik, die sich im Wesentlichen an den durch Ruffmann und Parkkinen vorgeschlagenen Punkten zur Vereinheitlichung der Literatur orientiert (RUFFMANN, PARKKINEN, 2016): (I) Nutzung mindestens zweier Antikörper gegen unterschiedliche α -Synuklein-Epitope (hier: 10D2 und pSer129), (II) Bevorzugung von Antikörpern, die hohe Affinität zu oligomerem α -Synuklein aufweisen (hier: 10D2), (III) Extraktion von Geweben mit vagaler Innervation (hier: gesamter GIT), (IV) Abdrucken der erhobenen morphologischen Befunde und (V) explizite Erwähnung nicht-neuronaler Muster sowie (VI) hinreichender Umfang der Proben (hier: whole-wall biopsies). Weiterhin erfolgte die von Ruffmann und Parkkinen nicht erwähnte, aber aus unserer Sicht methodisch zentrale Kontrolle für Aggregat-Pathologie (hier: mittels PET Blot).

Hypothese: Der Darm ist ein geeignetes Ziel zur neuropathologischen Diagnostik der Synuklein-Aggregationskrankheiten



Vorversuche und Erarbeitung der Techniken



Erarbeitung konkreter Fragestellungen



Suche nach krankheitsspezifischen morphologischen Mustern



Entwurf eines Auswertungsschemas



Systematische Bewertung der Schnitte durch zwei Wissenschaftler



Statistische Auswertung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Abbildung 13: Flowchart: Arbeitsschritte in der Durchführung der Doktorarbeit.

Im Folgenden werden die einzelnen Methoden, deren Theorie, Vorbereitung und Anwendung beschrieben. Die Aufgaben des Doktoranden bestanden nach Aufarbeitung der Patientendaten besonders in der Anfertigung von Verdünnungsreihen, Schneiden der Paraffinblöcke am Mikrotom und Färbung der Schnitte mittels H.-E.-Technik sowie je drei IHC- und zwei PET-Blot-Protokollen. Weitere Aufgaben umfassten die selbstständige

Erstellung eines Auswertungsschemas, die mikroskopische Bewertung und das Staging der Präparate nach Braak. Schließlich führte der Doktorand eine statistische Auswertung und Interpretation der Ergebnisse anhand einer ausführlichen Literaturrecherche durch (siehe Abbildung 13). Nicht Teil der Arbeit des Doktoranden war die Gewinnung der Proben aus Autopsien sowie das Einbetten der Proben in Paraffin. Ein Teil der Färbungen (< 10 %) sowie vier Schnittserien (hier gilt besonderer Dank an Frau Tatjana Pfander) wurden freundlicherweise durch die technische Assistenz bereitgestellt. Eine Einarbeitung in alle Methoden fand unter ständiger Rücksprache des Doktoranden mit dem Team der technischen Assistenz und einem Facharzt für Neuropathologie statt.

Vor Beginn der Experimente wurden die zwei Antikörper 10D2 und pSer129 ausgewählt. 10D2 wurde durch KOVACS et al. (2012) synthetisiert und hat sich in unserer Arbeitsgruppe im PET Blot wie auch in der Immunhistochemie als zuverlässiger Marker für α Syn bewährt. Der Antikörper pSer129 (EP1536Y, monoklonal) wiederum wurde von SAITO et al. (2003) generiert, um spezifisch an Serin 129 phosphoryliertes α Syn zu detektieren, das als „Hallmark“ der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten diskutiert wird (ANDERSON et al., 2006). Die beiden Antikörper 10D2 und pSer129 wurden in dieser Studie in drei Immunhistochemie- und zwei PET-Blot-Protokollen mit unterschiedlichen Proteinase-Konzentrationen angewandt, um sie hinsichtlich ihrer diagnostischen Wertigkeit zu vergleichen.

5.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

H.-E.-Färbungen aller Präparate wurden ergänzend zur IHC und insbesondere zum PET Blot angefertigt, um in der Identifizierung fraglicher Strukturen (z. B. Ganglienzellen) auf ein ergänzendes Verfahren mit optimaler anatomischer und farblicher Auflösung zurückgreifen zu können. Die Färbung erfolgte nach Labor-Standard des neuropathologischen Institutes des Universitätsklinikums des Saarlandes (Reagenzien und Lösungen siehe

Tabelle 10 und Tabelle 11). Die Schnitte je ca. 1-3 μm Stärke (aufgrund inhärenter Schwankungen der händischen Mikrotomschnitte) wurden zunächst zehn Minuten bei 80° C inkubiert, um das Präparat auf dem Glasobjektträger zu fixieren. Die Schnitte wurden nun in Xylol entparaffiniert und in eine absteigende Alkoholreihe transferiert. Im Anschluss erfolgten acht Minuten Kernfärbung in Hämatoxylin, eine Differenzierung durch zwei bis dreimaliges Schwenken in einer Chlorwasserstoff-(HCl-)Ethanol-Lösung und ein fünfminütiges Bläuen in warmem Leitungswasser (alle Schritte jeweils unterbrochen durch kurzzeitige Reinigung in destilliertem Wasser). Die Schnitte wurden weitere 5 Minuten in Eosin gegengefärbt und nach einer aufsteigenden Ethanolreihe und 2 x 2 Minuten Xylol schließlich via Entellan mit Glasplättchen eingedeckt. Die fertigen Präparate wurden wahlweise über Nacht bei Raumtemperatur oder 15 Minuten bei 80° C getrocknet, um einen optimalen Brechungsindex zu erzielen.

Tabelle 10: Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzte Reagenzien. Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller

Reagenz	Hersteller (Artikel-Nr.)
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.07961.0500)
Eosin G (gelblich) (C.I. 45380)	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.15935.0100)
Ethanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE (ETO-5000-99-1)
Chlorwasserstoff 25 %	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.00316.1011)
Mayer's Hämalalaun	Sigma-Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.09249.0500)
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE (PZN 09208860)

Tabelle 11: Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzte Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Eosin-Lösung 0,1 %	0,1 % Eosin G in bidestilliertem Wasser
HCl -Ethanol-Lösung 1 %	700 ml Ethanol 300 ml destilliertes Wasser 10 ml 25 % HCl

5.2.2 Immunhistochemie

Als Goldstandard der PD-Diagnostik (inferentiell: der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten) gilt laut S2k-Leitlinie nach wie vor die neuropathologische Diagnose post-mortem (HÖGLINGER, TRENKWALDER, 2023). Da das einzige klinisch und neuropathologisch validierte Diagnostiksystem Färbungen mittels H.-E.- und IHC-Technik nutzt (GIBB, LEES, 1988), interpretiert die hier vorliegende Arbeit diese Techniken als den derzeitigen Leitlinien-Goldstandard. Dementsprechend wurden mittels Antikörpern 10D2 (Robotec) und pSer129 (Abcam) IHC-Färbungen angefertigt, um diese mit einer Kombination aus H.-E.- und PET-Blot-Präparaten vergleichen zu können. Als Ausgangsprotokoll wurde das etablierte IHC-Protokoll des Instituts für Neuropathologie genutzt, ergänzt durch eigene Verdünnungsreihen und Vorbehandlung entsprechend der Literatur. So erwies sich in einer Studie von BEACH et al. (2008) im Vergleich zwischen Protokollen acht verschiedener Labore die Vorbehandlung via Proteinase K (PK) im Vergleich zu anderen Verfahren (z. B. mittels Ameisensäure) als überlegene Retrieval-Methode, sodass wir dieses Protokoll erfolgreich adaptierten. Die im Einzelnen genutzten Materialien, Reagenzien und Lösungen sind Tabelle 12 bis

Tabelle 14 des folgenden Teilkapitels zu entnehmen.

5.2.2.1 Materialien

Tabelle 12: Zur Immunhistochemie verwendete Materialien. Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller

Beschreibung des Materials	Hersteller (Artikel-Nr.)
Sequenza™ Slide Rack and Coverplate™ system	Thermo Fisher Scientific / Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, USA (72110017)
Objektträger „Superfrost+“	R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, DE (03-0060)
Deckgläser 24 X 40 mm, Glasdicke 0,13-0,16	R. Langenbrinck GmbH Emmendingen, DE (01-2440/1)

Tabelle 13: Zur Immunhistochemie genutzte Reagenzien. Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller

Reagenz	Hersteller (Artikel-Nr.)
Dako REAL™ Antibody Diluent (Tris-Puffer, pH 7,2, mit 15 mmol/L NaN ₃ und Protein)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark (S2022)
Dako REAL™ DAB+ Chromogen (X50)“ (3,3'-Diaminobenzidin in Chromogen-Lösung)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark (K3468)
Dako REAL™ Substrate Buffer (Imidazol-HCl-Puffer, pH 7,5, mit Wasserstoffperoxid und anti-mikrobiellem Mittel)	Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA / Dako Denmark (K5007)
Ethanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE (ETO-5000-99-1)
Natriumhydroxid	VWR International GmbH, Darmstadt, DE (28245.298)
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Lewis, USA (P6556-500 mG)
Wasserstoffperoxid-Lösung 30 %	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE (PZN 07284667)
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE (PZN 09208860)

Tabelle 14: Zur Immunhistochemie genutzte Lösungen

Lösung	Rezept
Proteinase-K-Pufferlösung	10 mM TrisHCl pH 7,8 100 mM NaCl 0,1 % Brij 35 50 mM CaCl ₂ 50 mM MgCl ₂
Proteinase-K-Stocklösung	50 mg Proteinase K pro ml TBST
Proteinase-K-Vorbehandlungslösung	Proteinase-K-Stocklösung (50 mg / ml) verdünnt 1:200 in Proteinase-K-Pufferlösung (z. B. 100 µg / 20 ml)
TBST (10 x Stocklösung)	10 mM TrisHCl pH 7.8 100 mM NaCl 0,05 % Tween 20

5.2.2.2 Vorversuche

Mittels Antikörper 10D2 wurden die Verdünnungen 1:500, 1:1.000 und 1:2.000 getestet, jeweils mit einer PK-Vorbehandlung von 10 µg/ml. Auch orientierende Präparate ohne PK-Vorbehandlung wurden mittels 10D2 angefertigt, um die Effektivität der Vorbehandlung und somit das Gelingen der Vorbehandlung zu bestätigen. Da ohne Vorbehandlung jedoch vor allem physiologisches αSyn gefärbt wird, wurden nur Präparate mit Vorbehandlung in die Endauswertung einbezogen. Der zweite Primärantikörper, pSer129 (EP1536Y, monoklonal), der sich gegen phosphoryliertes αSyn richtet, wurde in den Verdünnungsstufen 1:2.000 und 1:10.000 verglichen. Gegen das phosphorylierte αSyn sind monoklonale (mk) und polyklonale (pk) Antikörper erhältlich, deren Unterschied sich in den orientierenden IHC-Färbungen in minimal erhöhter Basalmembran-Reaktivität des monoklonalen Antikörpers bei jedoch guter spezifischer Bindung bemerkbar machte. Insgesamt erzielten wir gute Ergebnisse mit der monoklonalen Variante von pSer129 in den IHC-Vorversuchen, weshalb dieser Antikörper auch für die Endversuche erfolgreich eingesetzt wurde. Als Sekundär-Antikörper schließlich wurde ein im Labor etabliertes Ready-to-use-Präparat von Dako (EnVision, K5007) genutzt, welches ohne weitere Verdünnung gute Ergebnisse erzielte. Mit diesen Spezifizierungen konnten Protokolle für die Endversuche erstellt werden, an die sich im Folgenden gehalten wurde.

5.2.2.3 Endversuche

Tabelle 15: Zur Immunhistochemie genutzte Protokolle. Für weitere Details zu den Antikörpern siehe Tabelle 6 in Kapitel 0.

Protokoll	Primär-Antikörper	Konzentration	Vorbehandlung	Sekundär-Antikörper
I	10D2 mk (AJ Roboscreen GmbH)	1:1.000	Proteinase K, 10 µg/ml	Dako REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse (K5007)
II	pSer129 mk [EP1536Y] (Abcam plc Cambridge)	1:10.000	-	Dako REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse (K5007)
III	pSer129 mk [EP1536Y] (Abcam plc Cambridge)	1:10.000	Proteinase K, 10 µg/ml	Dako REAL™ EnVision™ Rabbit/Mouse (K5007)

Die IHC-Endversuche erfolgten für alle verfügbaren GIT-Abschnitte eines Falles in je drei Protokollen (Tabelle 15): (I) 10D2 mit PK-Vorbehandlung, um vorzugsweise aggregiertes α Syn anzufärben, (II) pSer129 ohne Vorbehandlung, um das gesamte phosphorylierte α Syn zu detektieren, sowie (III) pSer129 mit PK-Vorbehandlung zur möglichst selektiven Detektion phosphorylierter Aggregate. Da im Rahmen der Verdünnungsreihen 10D2 1:1.000 und pSer129 1:10.000 die jeweils optimale Färbequalität bei geringer Artefaktlastigkeit zeigten, wurden diese Protokolle in die Endversuche einbezogen. Eine PK-Verdünnung von 10 µg/ml erzielte in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe zur Detektion von α Syn-Aggregaten in der Glandula submandibularis (GORBACHUK, 2023) sowie in der einschlägigen Literatur (BEACH et al., 2016b; BEACH et al., 2008) gute Ergebnisse und wurde erfolgreich übernommen. Auf eine Reihe von bis zu 19 Objektträgern kam bei den Versuchen jeweils eine Positivkontrolle aus dem Großhirnkortex eines neuropathologisch validierten DLB-Falles (DLB5), um die Qualität der Färbungsreihe zu überprüfen. In die Endauswertung wurden nur solche Reihen eingeschlossen, deren Positivkontrolle kortikale Immunreaktivität in Form von Lewy-Pathologie zeigte. Fallreihen wurden genau dann verworfen und wiederholt, wenn sie diesem Qualitätskriterium nicht entsprachen oder extensive unspezifische Färbung aufwiesen. Im Folgenden wird die konkrete Durchführung der IHC-Protokolle beschrieben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Versuche bei Raumtemperatur durchgeführt.

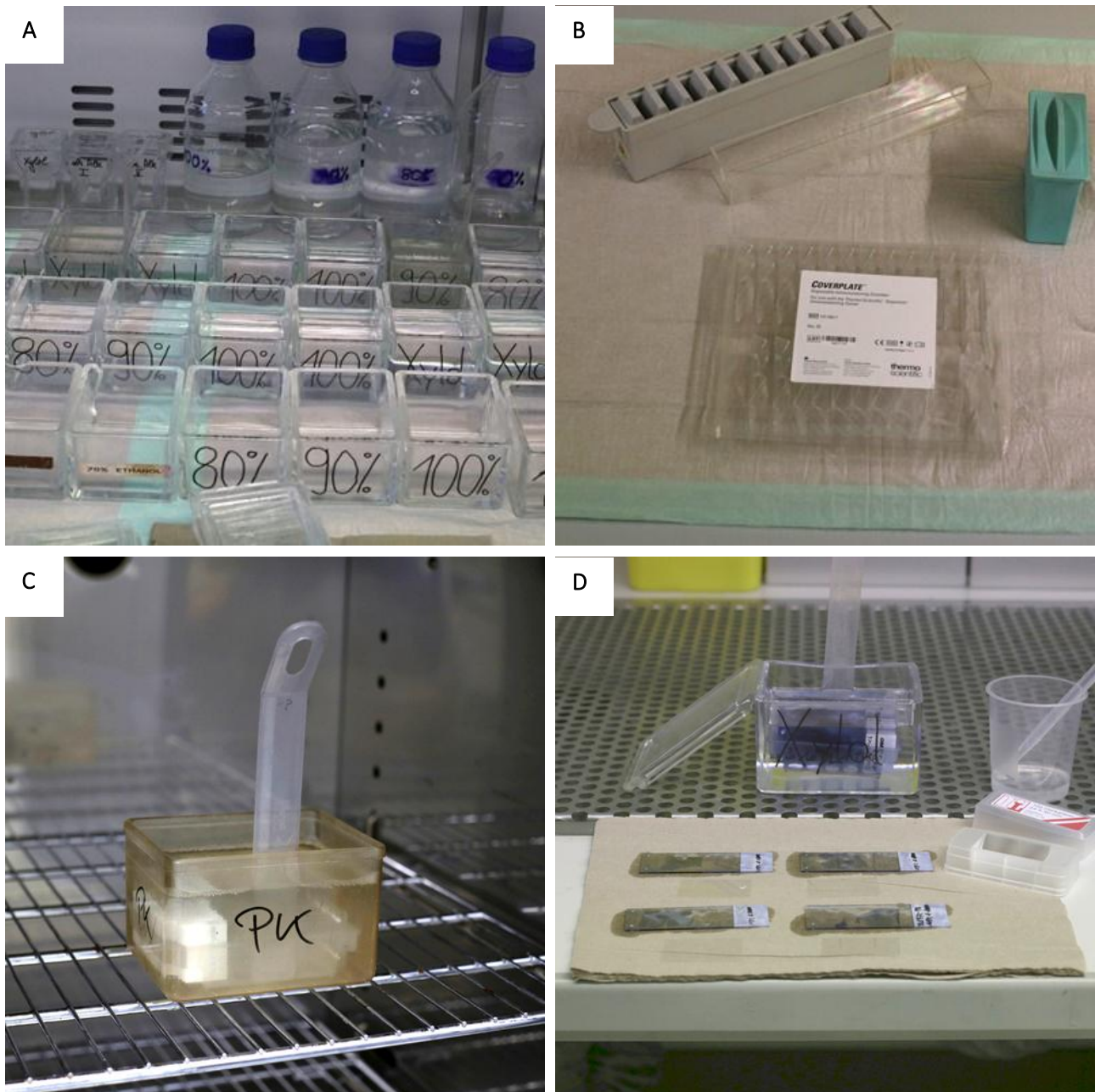


Abbildung 14: Zentrale Schritte der Immunhistochemie. **A** Entparaffinierungsreihe mit Xylol und absteigender Ethanolkonzentration. **B** Rack samt Abdeckung (oben links), zugehörigen Cover plates (unten mittig) und einem Gefäß mit TBST (oben rechts). **C** Die Proteinase-K-Vorbehandlung findet im Wärmeschrank (37° C) statt. **D** Nach erfolgter Färbung werden die Objektträger nacheinander aus dem Xylol entnommen und via Entellan (oben rechts mit Pipette) mit Glasplättchen (rechts darunter im Bild) eingedeckt.

Zur Vorbereitung einer Färbung werden die in Paraffin eingebetteten Präparate zuerst auf unter -20° C gekühlt und mittels Rotationsmikrotom zurechtgeschnitten (siehe auch Abbildung 15 A). Die Schnitte je 1-3 µm werden vom warmen Wasserbad (ca. 55° C) auf Glasobjektträger aufgebracht und über Nacht (8-24 Stunden) im Wärmeschränk (ebenfalls ca. 55° C) fixiert. Zur Vorbereitung der Färbung werden dann bis zu 20 Objektträger (Kontrollfall inklusive) pro Halterung in 3 x 5 Minuten 100 % Xylol entparaffiniert und einer Ethanolreihe von jeweils 2 Minuten erst in 2 x 100 %, dann absteigend 90 %, 80 % und 70 % Ethanol unterzogen (Abbildung 14 A). Nach Spülen in destilliertem Wasser wird je nach Protokoll eine Vorbehandlung mit PK oder direkt ein Schritt zum Peroxidase-Block durchgeführt. Für den PK-Verdau werden 50 µg einer 50 mg/ml PK-Stocklösung in 250 ml PK-Puffer (Rezept siehe

Tabelle 14) vorbereitet, gründlich vermischt und 30 Minuten bei 37° C erwärmt, um die (im Vergleich zum PET Blot milde) Vorbehandlung mit 10 µg/ml vorzubereiten (Abbildung 14 C). Die fertig entwässerten Objektträger können nun in die PK-Lösung gegeben und 15 Minuten bei 37° C inkubiert werden. In allen Protokollen erfolgt zuletzt der Peroxidase-Block für 10 Minuten in 10 ml Wasserstoffperoxid pro 300 ml destilliertem Wasser.

Nach einem letzten Spülschritt in Wasser folgt das Übertragen der Objektträger auf Deckplättchen (Cover plates), die hierfür leicht mit TBST-Puffer (Rezept siehe

Tabelle 14) benetzt werden. Bis zu zehn Objektträger werden mittels der Deckplättchen in jeweils ein Gestell (Rack) übertragen und dort einer Durchlaufkontrolle mit TBST unterzogen (Materialien in Abbildung 14 B). Nach gelungener Durchlaufkontrolle werden je 100 µl Primärantikörper (10D2 bzw. pSer129) auf die einzelnen Objektträger aufgetragen, mit Deckel luftdicht verschlossen (sodass keine Antrocknungsartefakte entstehen) und für 45 Minuten inkubiert. Die Objektträger verbleiben im Rack für drei Waschschrte je 5 Minuten mittels TBST und weitere 30 Minuten zum Einwirken des Sekundärantikörpers (EnVision). Nach drei abschließenden Spülvorgängen folgt die Entnahme der Objektträger aus dem Rack und deren Transfer in eine feuchte Kammer. Mittels DAB-Lösung aus je 25 µl „Dako REAL™ DAB+ Chromogen“ und 1 ml „Substrate buffer DAB+ Chromogen“ wird die Färbung vorbereitet. Diese wirkt anschließend mit je ca. 200 µl der DAB-Lösung pro Objektträger unter abgedunkelten Bedingungen ein. Die Färbung dauert sechs bis zehn Minuten bis die Positivkontrolle eine bräunliche Färbung der Kortexareale zeigt und wird sodann in destilliertem Wasser gestoppt.

Es folgt eine Gegenfärbung, indem jeweils 20 Schnitte pro Halterung 20 Sekunden in Hämatoxylin geschwenkt und 5 Minuten in warmem Leitungswasser gebläut werden. Eine Ethanolreihe mit Schwenken in aufsteigend 70 %, 80 %, 90 % und je 2 Minuten in 2 x 100 % Ethanol sowie schließlich 2 x 100 % Xylol entwässert die Schnitte und bereitet sie für das Eindecken vor. Mittels weniger Tropfen Entellan können nun Glasplättchen auf die einzelnen Objektträger eingepasst werden (Abbildung 14 D). Zur Optimierung des Brechungsindex werden die fertigen Präparate schließlich über Nacht in waagerechter Position getrocknet.

5.2.3 Paraffin-Embedded Tissue Blot

Der PET Blot ist eine Kombination aus IHC und Histoblot, bei der dünne Gewebeschnitte auf Nitrozellulosemembranen aufgezogen werden, um eine intensivere Proteinase-K-Vorbehandlung und somit die hochsensitive Detektion von Proteinaggregaten zu ermöglichen. Die Technik wurde ursprünglich zum Nachweis von Prion-Protein in Patienten mit Creutzfeldt-Jakob-Krankheit entwickelt (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000a), wo sie eine sensitivere Detektion von Aggregaten zulässt als vergleichbare Verfahren wie IHC oder Western Blot (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000b).

Durch zunehmende Fokussierung der Forschung zu den α -Synuklein-Aggregationskrankheiten auf die aggregierte (proteinase-resistente) Form des α Syn findet der PET Blot mittlerweile auch Anwendung in der Erforschung von PD, PDD und DLB (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; NEUMANN et al., 2002; NEUMANN et al., 2004; VISANJI et al., 2015). Der PET Blot kann neben der bekannten Lewy-Pathologie auch feinste synaptische α Syn-Aggregate darstellen, welche wesentlich zur synaptischen Dysfunktion und folglich Neurodegeneration beitragen (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007; SCHULZ-SCHAEFFER, 2010). Die überlegene Sensitivität bei gleichzeitig passabler anatomischer Auflösung sprachen dafür, den PET Blot im Rahmen dieser Studie als Vergleichsmethode zum etablierten Goldstandard der IHC zu nutzen. Die im Einzelnen genutzten Materialien, Reagenzien und Lösungen sind Tabelle 16 bis Tabelle 18 des folgenden Teilkapitels zu entnehmen.

5.2.3.1 Materialien

Tabelle 16: Im PET Blot genutzte Reagenzien. Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller

Reagenz	Hersteller (Artikel-Nr.)
BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE (A1117.0001)
Brij® 35 solution (Polyalkylenglycolether)	Merck KGaA, Darmstadt, DE (B4184)
CaCl₂	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.02382.0500)
Destilliertes Wasser (Ampuwa® Spüllösung)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, DE (B23067A)
EDTA, 0,5 M (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.08454.0250)
GdSCN, 4 M (Guanidiniumthiocyanat)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE (0017.2)
I-Block (Tropix ®)	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, Bedford, USA (T2015)

Isopropanol	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, DE
MgCl₂	Merck KGaA, Darmstadt, DE (8147330100)
NaCl	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, DE (2438)
NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid)	Sigma-Aldrich, St. Lewis, USA (N6876-1G)
PBS (pH 7,4)	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE (A9177.0100)
Proteinase K	Sigma-Aldrich, St. Lewis, USA (P6556-500 mG)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, DE (1.08382.0500)
Tween 20 (Polysorbat 20)	Caesar & Loretz GmbH, Hilden, DE (3472)
Xylol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, DE (PZN 09208860)

Tabelle 17: Im PET Blot genutzte Lösungen

Lösung	Rezept
BCIP-Lösung	50 mg/ml in 100 % DMFA (Dimethylformamid)
Casein 0,2 % + Tween	2 g I-Block 1000 ml PBS (pH 7.4) 1 ml Tween 20
NBT-BCIP-NTM-Färbelösung	90 µl NBT-Lösung 66 µl BCIP-Lösung 20 ml NTM-Puffer
NBT-Lösung	75mg / ml in 70 % DMFA (Dimethylformamid)
NTM-Puffer, pH 9,5	100 mM NaCl 100 mM TrisHCl pH 9,5 50 mM MgCl ₂
PBST-Puffer	250 ml PBS pH 7.4 400 µl Tween 20
Proteinase-K-Pufferlösung	10 mM TrisHCl pH 7,8 100 mM NaCl 0,1 % Brij 35 50 mM CaCl ₂ 50 mM MgCl ₂
Proteinase-K-Stocklösung	50 mg Proteinase K pro ml TBST

Proteinase-K-Vorbehandlungslösung	Proteinase-K-Stocklösung 50 mg / ml verdünnt 1:200 in Proteinase-K-Pufferlösung (z. B. 100 µg / 20 ml)
TBST (10 x Stocklösung)	10 mM TrisHCl pH 7.8 100 mM NaCl 0,05 % Tween 20

Tabelle 18: Im PET Blot verwendete Materialien. Bezugsquelle angegeben, falls nicht identisch mit Hersteller

Beschreibung des Materials	Hersteller (Artikel-Nr.)
Einlagetuch „WYPALL* X80 Towel“	Kimberly-Clark Corporation, Dallas, USA (4102600)
Klebeband 3M™ Durapore™	3M, Minnesota, USA (1538-1)
Nitrozellulose-Membranen, Porengröße 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA (1620115)
PET-Blot-Box „Gilson plastic tip box“	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA (N/A)
PET-Blot-Halteklammer	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA (N/A)
Vernichtungsbeutel aus Polypropylen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE (86.1197)

5.2.3.2 Vorversuche

Der Antikörper 10D2 ist erhältlich bei den Firmen Dianova und Robotec, wobei beide Produkte dem gleichen Klon entstammen. Da die Konzentration dennoch unterschiedlich sein kann, verglichen wir die Antikörper miteinander. Das Produkt 10D2 von Dianova in der Verdünnung 1:2.000 erzielte in unseren Vorversuchen äquivalente Ergebnisse zu 10D2 von Robotec in 1:5.000, gemessen (a) am Färbeverhalten der Positivkontrolle sowie (b) an der Artefaktlastigkeit gastrointestinaler Präparate. Wir entschieden uns, aufgrund allseits guter Ergebnisse und in Anbetracht identischer Klonalität, die Produkte beider Anbieter für unsere Versuche zu nutzen. Unser Sekundärantikörper (D0486, Dako), wurde in den Verdünnungen 1:500 und 1:1.000 getestet, wobei letztere aufgrund geringerer Artefaktlastigkeit beibehalten wurde. Auch der Antikörper LB509 (BABA et al., 1998; SOUSA et al., 2012) wurde in der gängigen Verdünnung 1:2.000 getestet, zeigte jedoch bereits nach wenigen Sekunden stärkste Überfärbungsartefakte wurde dementsprechend nicht weiter getestet.

Als nächstes wurde ein Protokoll mittels Antikörper pSer129 erstellt, um auch für phosphoryliertes α Syn eine verbesserte Kontrolle für Aggregate zu erreichen. Zunächst wurde ein monoklonaler Antikörper getestet, der jedoch schon früh durch starke Kreuzreaktivität der Basalmembranen auffiel. Dies stellte ein relevantes Problem für die Auswertung der PET-Blot-Präparate dar, da wir morphologisch nicht mehr sicher zwischen gefäßnahen Neuriten und unspezifischer Immunreaktion der Gefäßwand unterscheiden konnten. Daher variierten wir die Verdünnungen mit pSer129 (monoklonal) in der Konzentration 1:10.000 und 1:20.000 (Sekundärantikörper D0487 1:1.000) miteinander, was jedoch keinen Effekt auf die Artefaktdichte zeigte. Auch eine Verdünnungsreihe des Sekundärantikörpers in den Konzentrationen 1:500, 1:1.000 und 1:2.000 bei

gleichbleibender pSer129-Verdünnung von 1:10.000 erbrachte keine merkliche Verbesserung. Daher wurden zwei Kombinationen von Sekundärantikörpern und Alkalischer-Phosphatase-Kopplung (jeweils 60 Minuten Einwirkzeit) bei gleichbleibender Primärantikörper-Konzentration getestet: (I) biotinylierte swine-anti-rabbit-F(ab')₂-Fragmente 1:2.000 mit anschließender Streptavidin-AP-Kopplung 1:2000 (Sigma-Aldrich 189732) sowie (II) ein Ready-to-use-Kit von Dako (K5355), bestehend aus rabbit/mouse-Link in Verdünnung 1:10 und folgender AP-Enzym-Behandlung 1:10. Auch diese Vorversuche mit monoklonalem Primärantikörper erbrachten keinerlei Veränderung hinsichtlich der Artefaktbeladenheit. Da somit Verdünnungsfehler sowie auch fehlende Spezifität des Sekundärantikörpers als Ursache der Artefakte ausgeschlossen waren, wurde im Folgenden die polyklonale Variante des Antikörpers pSer129 getestet. In einer Verdünnung von 1:10.000 zeigte die polyklonale Variante des Antikörpers pSer129 keine dieser Kreuzreaktionen, weshalb wir uns im Weiteren für diesen Antikörper entschieden.

5.2.3.3 Endversuche

Tabelle 19: Im PET Blot genutzte Protokolle (Weitere Details zu Antikörpern siehe Kapitel 0, Tabelle 7 und Tabelle 8).

Protokoll	Primär-Antikörper	Konzentration	Sekundär-Antikörper	Konzentration
I	10D2 mk (AJ Robo-screen GmbH) bzw. 10D2 mk (Dianova)	1:5.000 bzw. 1:2000	Polyclonal Goat Anti-mouse, AP-gekoppelt (D0486, Dako Dänemark)	1:1.000
II	pSer129 pk	1:10.000	Polyclonal Goat Anti-rabbit, AP-gekoppelt (D0487, Dako Dänemark)	1:500

Die aus den Vorversuchen bewährten zwei Färbeprotokolle (Tabelle 19) mittels PET Blot ergänzen die drei immunhistochemischen, indem sie für die beiden Antikörper 10D2 und pSer129 jeweils wesentlich stärkere PK-Vorbehandlungen zulassen. So konnten anstatt 10 µg/ml Proteinase K in PK-Puffer im PET Blot Konzentrationen von 250 µg/ml genutzt werden. Ein weiterer Unterschied zur IHC liegt darin, dass im PET Blot die polyklonale Variante des Antikörpers pSer129 (EP1536Y) genutzt wurde, da der monoklonale Antikörper hier zu extensiver Bindegewebsreaktion führte. Analog zu den immunhistochemischen Versuchen war auch im PET Blot je ein Kontrollschnitt (DLB5) pro Reihe eingeschlossen, was je fünf Schnitten zuzüglich einer Positivkontrolle pro Box entspricht. Obligate Positivkriterien zum Einschluss in die Endauswertung waren: (I) Gleichmäßige kortikale Färbung der Positivkontrolle, (II) ein retikuläres Muster aus feinen Neuriten und ein synaptisches Muster in Form kleiner punktförmiger Aggregate in der Kontrolle, (III) dunkel-violettes Färbeverhalten der Kontrolle sowie (IV) geringe oder keine Anfärbung von Basalmembranen der Gefäße. Proben wurden dann und nur dann wiederholt, wenn der Durchgang diesen Gütekriterien nicht entsprach.

Im Folgenden werden die Protokolle der Antikörper 10D2 und pSer129 im PET-Blot-Verfahren gemeinsam beschrieben, wobei sich das Protokoll eng am publizierten Referenzverfahren orientiert (SCHULZ-SCHAEFFER et al., 2000a). Das Gesamtverfahren gliedert sich in eine Vorbereitung der Schnitte sowie das anschließend dreitägige Verfahren: Tag 1) Entparaffinieren und Trocknen, Tag 2) Proteinase-Verdau im Wärmeschränk, Tag 3) Detektion und Färbung. Abgesehen von der Wärmebehandlung (Tag 2) wurden alle Schritte bei Raumtemperatur (ca. 20-25° C) durchgeführt.

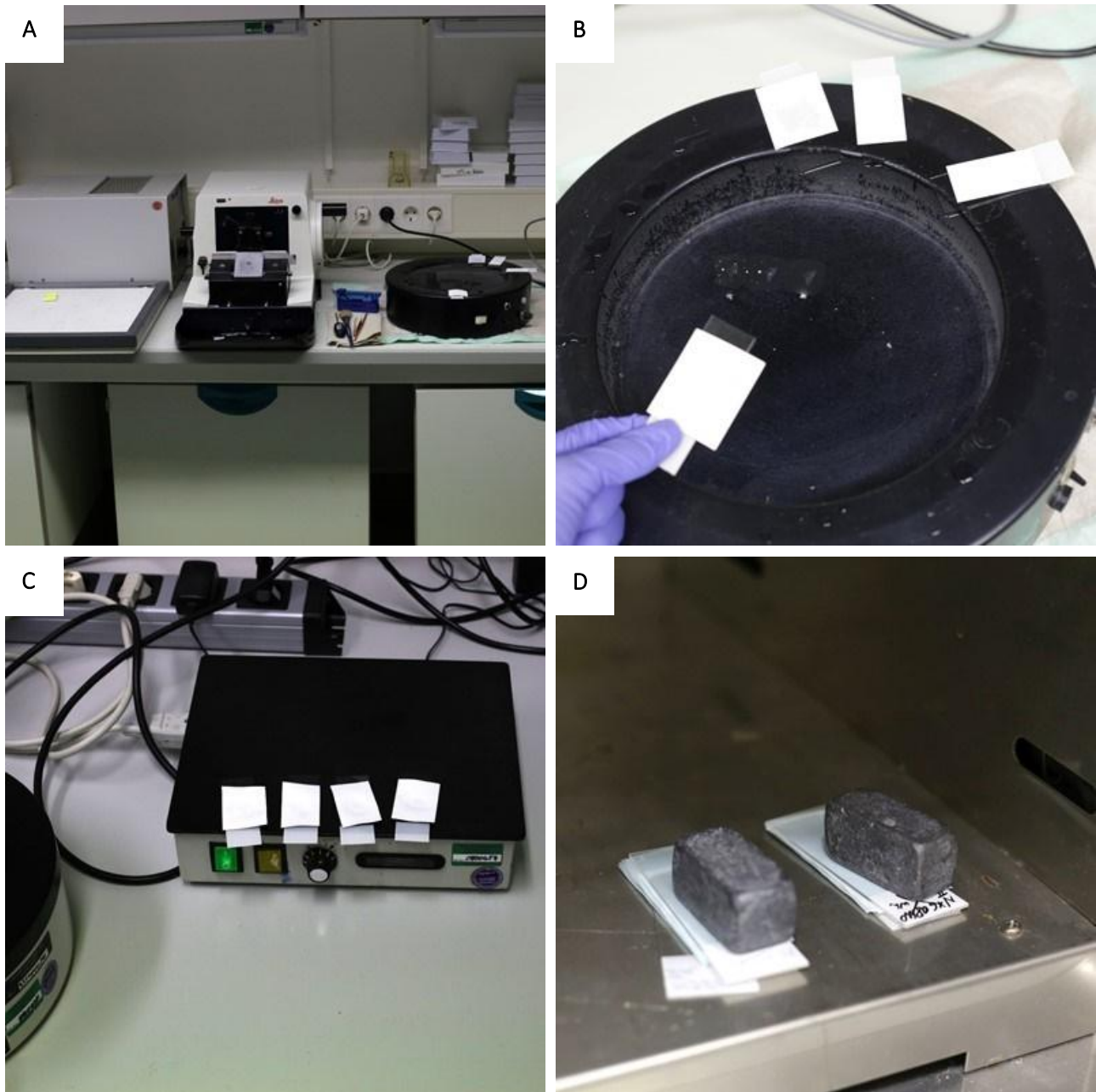


Abbildung 15: Vorbereitung der PET-Blot-Membranen. **A** Für den Schneideprozess werden Kühlplatte (links), Mikrotom (Mitte) und Warmwasserbecken (rechts) benötigt. **B** Die Schnitte werden auf Nitrozellulose aufgezogen. Drei fast transparente zusammenhängende Schnitte sind erkennbar knapp oberhalb des Objektträgers. **C** Die fertigen Membranen werden zunächst auf einer Wärmeplatte leicht getrocknet. **D** Im Wärmeschränk (ca. 55° C) trocknen die Membranen anschließend beschwert für mindestens zwei Tage.

Zur Vorbereitung der Objektträger werden von den Paraffinblöcken zunächst per Mikrotom in Gefriertechnik (Abbildung 15 A) Schnitte je 1-3 μm erstellt. Diese werden mit einem Pinsel im warmen Wasserbad (ca. 55° C) auf vorbefeuchtete Nitrozellulosemembranen (0,45 μm Porengröße) aufgezogen (Abbildung 15 B), denen ein Glasobjektträger zur Stabilisierung unterliegt. Die Schnitte benötigen ca. 15 Minuten Trocknungszeit auf der Wärmeplatte (Abbildung 15 C), bevor sie gestapelt und beschwert im Wärmeschrank (Abbildung 15 D) für mindestens 48 Stunden bei ca. 55° C fixiert werden. Die so vorbereiteten Membranen halten sich über Jahre, sodass das im Folgenden beschriebenen dreitägige Protokoll jederzeit erfolgen kann.

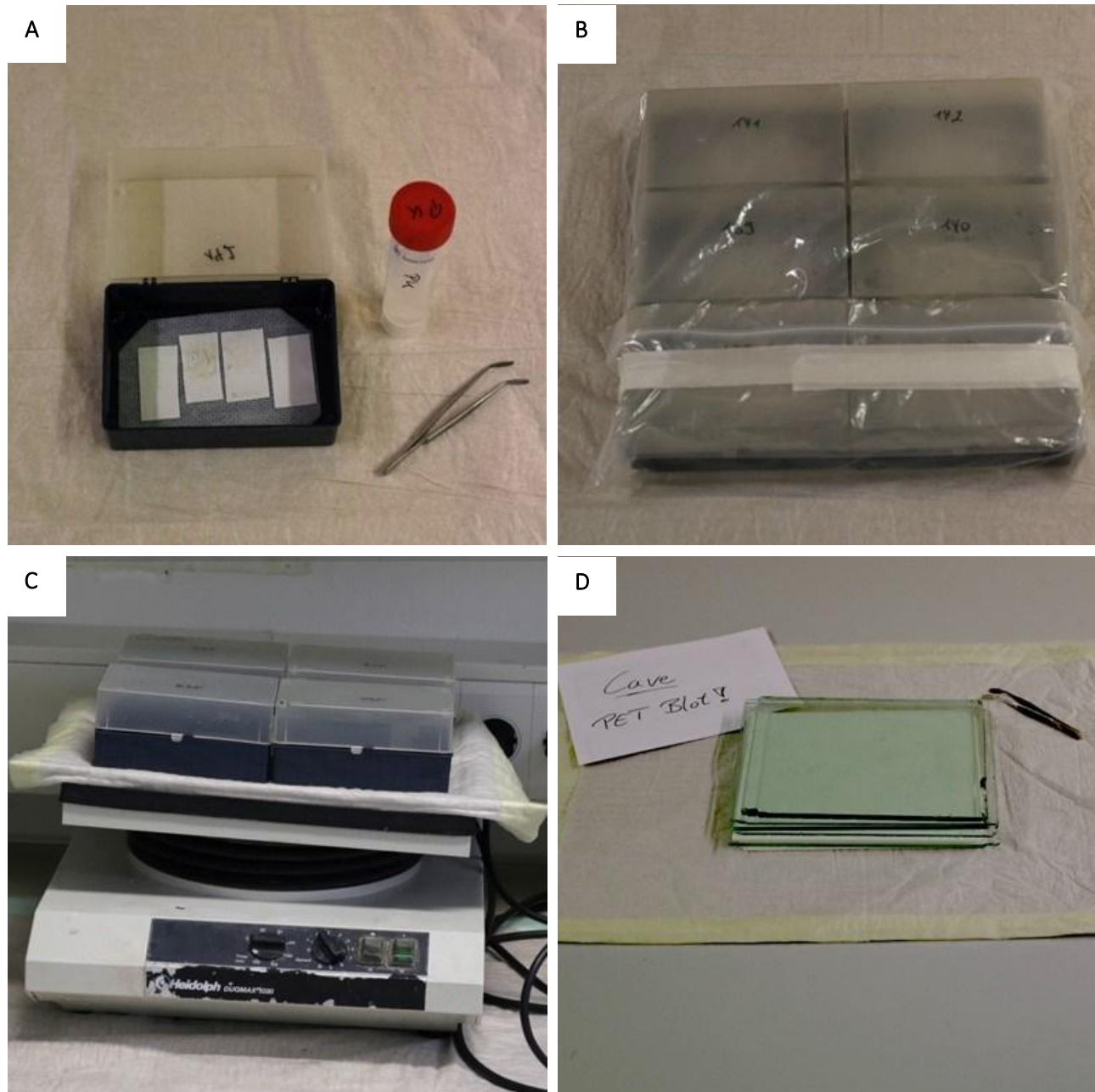


Abbildung 16: Vorbehandlung, Detektion und Trocknung der PET-Blot-Membranen. Die Entparaffinierung an Tag 1 ist nicht dargestellt, ähnelt aber (mit Anpassungen, siehe unten) dem in Abbildung 14 A dargestellten Versuchsaufbau. **A** Tag 2: Das Einlage-Tuch wird mit in TBST gelöster Proteinase K bis zum Level der entparaffinierten Membranen getränkt. **B** Die Boxen aus A müssen luftdicht verschlossen werden, bevor sie über Nacht in den Wärmeschrank gestellt werden. **C** Tag 3: Wasch- und Inkubationsschritte werden auf einem Schüttler auf niedriger Stufe ausgeführt. **D** Nach abschließendem Färbeschritt werden die Membranen beschwert zwischen Zelluloseplatten (Whatman) getrocknet und lichtgeschützt gelagert.

Die Entparaffinierung leitet das dreitägige PET-Blot-Protokoll ein. Hierfür werden die Schnitte in je 3 x 10 Minuten Xylol, 5 Minuten Isoxylol (Mischung aus 50 % Xylol und 50 % Isopropanol), 2 x 5 Minuten 100 % Isopropanol und eine absteigende Reihe von 5 Minuten je 90 %, 70 % und 50 % Isopropanol überführt. Dieses Verfahren ähnelt dem für die IHC (Abbildung 14 A), jedoch wird Isopropanol anstatt Ethanol verwendet, da sich die Schnitte ansonsten von der Membran lösen können. Die so entparaffinierten und gewässerten Schnitte werden nun nicht länger als 5 Minuten in PBST-Lösung (pH 7,4) gewaschen und anschließend abgedunkelt und beschwert zwischen luftdurchlässigen Papiertüchern über Nacht (ca. 12-24 Stunden) getrocknet.

Der zweite Tag des Protokolls umfasst die Vorbehandlung mittels Proteinase K, wofür zunächst PK-Konzentrat (50 mg/ml) 1:200 in speziellem PK-Puffer (Rezept siehe Tabelle 17) verdünnt wird. Bis zu sechs getrocknete Membranen einschließlich je einer Positivkontrolle werden nun entsprechend Abbildung 16 A in je einer Box (Gilson) auf zurechtgeschnittenen Tüchern (Wypall X80) platziert und die Lösung bis auf Membranlevel in die Boxen gegeben (ca. 13-15 ml), sodass sie dem durchtränkten Tuch aufliegen („Pillow technique“). Hierbei ist darauf zu achten, dass sich weder Luftblasen unter noch Pfützen auf den Membranen bilden, die je zu ungleichmäßigen Ergebnissen führen können. Nach Benetzung der Membranen durch vorsichtiges Schwenken der Box wird diese bei ca. 55° C inkubiert. Die Boxen werden anschließend über einen Zeitraum von drei bis vier Stunden noch mindestens zwei bis drei Male geschwenkt, bevor sie luftdicht verpackt (Abbildung 16 B) für 12 bis maximal 16 Stunden in den Wärmeschrank gestellt werden.

Am letzten Tag des Protokolls beginnt der Detektionsprozess mit der Entnahme der Box aus dem Wärmeschrank und dem Transfer der Membranen in eine frische Box mit TBST (Rezept siehe Tabelle 17). Alle Schritte bis auf die Färbung werden ab jetzt auf einem Schüttler (Abbildung 16 C) auf niedriger Stufe ausgeführt, sodass die Membranen umspült werden ohne zu zerkratzen. Nach 3 x 5 Minuten initialem Waschen in TBST beginnt eine 15-minütige Behandlung mit Guanidiniumthiocyanat (4 mol/l) zur Freilegung der Epitope, gefolgt von weiteren 3 x 5 Minuten Waschung. Die Membranen werden nun nebeneinander in der Box aufgereiht und am Boden mittels Halterung fixiert, sodass sie nicht überlappen. Es folgt ein 45-minütiger Schritt zum Blocken mit ca. 15-20 ml Casein 0,2 % (Rezept siehe Tabelle 17) pro Box, um unspezifische Bindungen zu vermindern. Es schließen sich unmittelbar 90 Minuten Primärantikörper-Behandlung (10D2 bzw. pSer129 je nach Protokoll) an, gefolgt von 5 x 10 Minuten TBST-Waschung ohne Halterung. Der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Sekundärantikörper (je nach Protokoll D0486 bzw. D0487) erfordert eine erneute Fixierung der Membranen am Boden der Boxen für 60 Minuten sowie abschließende 5 x 10 Minuten TBST. Nun werden die Membranen in 2 x 5 Minuten NTM (Rezept siehe Tabelle 17) auf die Färbung vorbereitet und die NBT-BCIP-Färbelösung (Rezepte siehe ebenfalls Tabelle 17) angesetzt. Die Boxen werden von den Shakern entnommen, die Flüssigkeit entleert und die Membranen am Boden der Box so angeordnet, dass sie nicht überlappen. Nun werden ca. 20 ml der Färbelösung pro Box hinzugegeben, sodass eine Formazan-Reaktion nach ca. 5-15 Minuten zur violetten Färbung der Zielstrukturen führt. Während dieser lichtsensitiven Reaktion bleiben die Boxen verschlossen. Sie wird abgestoppt, sobald die Kontrolle eine klare Abgrenzung zwischen kortikalen und medullären Anteilen zeigt. Das Abstoppen geschieht, indem die Färbelösung entsorgt, dann mittels PBS-Puffer (pH 7,4) 15 Minuten gespült und schließlich in zweifach destilliertem Wasser zunächst mit EDTA (0,5 mol/l), dann ohne Zusatz je 10 Minuten geblockt wird.

Schließlich werden die Membranen zwischen dickwandigen Filterpapier-Platten (Whatman) getrocknet (Abbildung 16 D). Am folgenden Tag haben die Schnitte durch Nachdunklung ihre Endfärbung erhalten und können nun mikroskopiert werden.

5.2.4 Staging nach Braak und McKeith

Zur Charakterisierung der einzelnen Fälle hinsichtlich der Ausbreitung von Lewy-Pathologie im ZNS wurden die Stadien nach BRAAK et al. (2003a) und MCKEITH et al. (2005) bestimmt. Dadurch soll die Vergleichbarkeit unserer Serie mit anderen Fallkollektiven sowie die Verallgemeinerbarkeit unserer Erkenntnisse sichergestellt werden. Es wurden Proben aus dem Ammonshorn, anterioren Gyrus cinguli und Gyrus frontalis medius genutzt. Die Bestimmung der Stadien erfolgte anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie IHC mittels 10D2 mk (Robotec), verdünnt 1:500 bis 1:1.000 mit Vorbehandlung via 10 µg/ml Proteinase K (jeweils gelöst in TBST), entsprechend dem Goldstandard des Antigen-Retrievals bei α -Synuklein-Aggregationskrankheiten (BEACH et al., 2008). Im Braak-Staging wurde ein Hirnareal genau dann als positiv bewertet, wenn mindestens eine immunreaktive Struktur in Form von Lewy-Pathologie identifiziert werden konnte. Fälle, die dem Stadium V oder VI entsprachen, wurden gemeinsam als Endstadium V/VI bewertet, da die beiden Stadien unseres Erachtens nicht hinreichend durch ausreichend distinkte Hirnareale voneinander unterschieden definiert sind (BRAAK et al., 2006a). Die Stadien nach McKeith ergaben sich durch Bewertung des jeweils am stärksten immunreaktiven Hemigyrius des Präparates, der zur positiven Wertung mindestens fünf Lewy-Körper enthalten musste. Wo sich ein geringeres Stadium als „V/VI“ nach Braak oder „Kortikal“ nach McKeith ergab, wurden bestehende PET Blot-Präparate der Großhirnareale aus unserem Archiv gesichtet und zusätzliche Präparate mittels IHC von Medulla oblongata, Pons und Mesencephalon angefertigt, um das Staging weiter differenzieren zu können.

5.2.5 Mikroskopische Auswertung

In die Auswertung der IHC- und PET-Blot-Präparate waren zwei Forscher, JS (Doktorand) und WSS (Facharzt für Neuropathologie) involviert. JS war damit betraut, die Datenerhebung durchzuführen, wozu regelmäßig Präparate einem gemeinsamen „Cross-Check“ unterzogen wurden, um eine verbesserte Inter-Rater-Reliabilität zu erzielen. Die mittels PET Blot gefärbten Membranen wurden mittels Auflichtmikroskopie ausgewertet, die in der IHC-Technik gefärbten Objektträger in Durchlichtmikroskopie (Spezifikationen siehe Tabelle 9). Es wurden jeweils hinsichtlich Immunreaktivität ausgewertet: (I) zehn zusammenhängende Gesichtsfelder zentral in der Submukosa sowie (II) in der Muskularis zwischen Ring- und Längsmuskelschicht; (III) für den PET Blot erfolgte eine zusätzliche Auswertung des gesamten Präparates, was je nach Darmabschnitt ca. 2-5 Zirkumferenzen oder ca. 1-2 x 2 cm Fläche (z. B. bei Magen-Präparaten) entspricht. Diese Protokolle haben das Ziel, Rückschlüsse auf den klinischen Nutzen verschiedener Biopsieverfahren zuzulassen: (I) vom Submukosa-Protokoll auf intraluminale Biopsien, (II) vom Muskularis-Protokoll auf extraluminal (z. B. laparoskopisch) gewonnene Biopsate, (III) die Auswertung des Gesamtpräparats soll einen Rückschluss auf den diagnostischen Wert größerer Gewebeproben zulassen, wie sie bei resezierenden Operationen anfallen. Bei der Auswertung der Submukosa wurden auch im jeweiligen Gesichtsfeld befindliche Teile der Lamina

muscularis mucosae berücksichtigt, wie sie z. B. auch bei einer Stanz- oder Zangenbiopsie der Submukosa miterfasst werden. In die Bewertung der Muskularis flossen gegebenenfalls auch Anteile der (Sub-)Serosa und Gefäße außerhalb der Darmzirkumferenz mit ein, wenn diese im jeweiligen Gesichtsfeld sichtbar waren. Von der Bewertung ausgeschlossen war die Mukosa, da hier vermehrt Artefakte anfallen und physiologisch kaum Nervenstrukturen zu erwarten sind (siehe Kapitel 4.5.1).

In allen Präparaten wurde zur Auswertung der zehn konsekutiven Gesichtsfelder der je gleiche Ausgangspunkt im Präparat und die gleiche Auswertungsrichtung gewählt, um die Vergleichbarkeit der Scores zwischen verschiedenen Protokollen zu fördern. Die Wahl des Auswertungsbereichs hierfür fiel anhand der H.-E.-Färbung eines Präparates und hing von der Auswertbarkeit (z. B. in Form gut sichtbarer anatomischer Strukturen) des Areals ab. Gezählt wurden je die positiven von je zehn Gesichtsfeldern in 200-facher Vergrößerung (ca. 1,2 mm²) anhand zuvor definierter Kriterien (siehe folgendes Kapitel, Tabelle 20 bis Tabelle 23). Zur Vorbereitung eines finalen Auswertungsschemas sowie von Positiv- und Negativkriterien wurden zunächst Präparate repräsentativer Patienten der Diagnosegruppe mittels IHC und PET Blot gefärbt und hinsichtlich Färbequalität und -quantität orientierend bewertet. Anschließend wurden alle Magen-Präparate ausgewertet, um qualitative Unterschiede im Reaktionsverhalten zwischen Diagnosegruppe und Kontrollfällen zu erarbeiten. Der Magen wurde ausgewählt, da (im Sinne eines rostro-kaudalen α Syn-Gradienten) eine höhere Dichte an immunreaktiven Strukturen in weiter oral gelegenen Organ beschrieben wurde (BEACH et al., 2010; GELPI et al., 2014). In die Positivkriterien für ein jeweiliges Gesichtsfeld nahmen wir folglich diejenigen Muster auf, die sich stark überwiegend in der Untersuchungsgruppe fanden. Als Negativkriterien wurden solche Muster erarbeitet, die sich in Kontroll- und Diagnosegruppe gleichermaßen fanden oder aus der Laborroutine oder Literatur als Artefakte bekannt sind, so z. B. Färbung der Basalmembranen von Gefäßen. Ein jeweiliges Gesichtsfeld wurde genau dann als positiv gewertet, wenn für mindestens eine Struktur im Gesichtsfeld galt: alle der Positiv- bzw. Einschlusskriterien (Tabelle 20 oder Tabelle 22) und keine der Negativ- bzw. Ausschlusskriterien (Tabelle 21 oder Tabelle 23) treffen auf diese Struktur zu. „Leere“ Gesichtsfelder, die weder Positiv- noch Negativkriterien erfüllten, wurden als negativ bewertet.

5.2.5.1 Durchlichtmikroskopie

Für die Durchlichtmikroskopie nutzten wir ein Setup mit Leica-DM5000B-Durchlichtmikroskop, 10x-Okular, und 20x-LEICA-PH2-Objektiv (siehe Tabelle 9) zur Auswertung der H.-E.- und IHC-Präparate. Ein Cross-Check zur Optimierung der Inter-Rater-Reliabilität erfolgte mittels Olympus BX40 mit Zweitbetrachterbrücke. Die im folgenden genannten Kriterien beziehen sich auf einzelne Strukturen anhand derer eines der je zehn Gesichtsfelder als positiv oder negativ bewertet wurde. Demzufolge konnte für jedes der drei Auswertungsprotokolle der IHC je ein Score 0-10 erstellt werden

Beispiel: Für das Ileum-Präparat des Falls DLB3 in einer immunhistochemischen Färbung mittels monoklonaler Variante des Antikörpers pSer129 mk ohne Proteinase-K-Vorbehandlung waren in der Muskularis 4/10 Gesichtsfelder positiv.

Ist in der IHC von „immunreaktiven“ bzw. „positiven“ Gesichtsfeldern oder ganzen Präparaten die Rede, so ist stets der Bezug auf die folgenden Positivkriterien gemeint. Ist die Sprache von „nicht-immunreaktiven“ bzw. „negativen“ Gesichtsfeldern oder Präparaten, so ist die Abwesenheit positiver Strukturen gemeint, d. h. gleichermaßen Strukturen, die Negativkriterien erfüllen als auch „leere“ Gesichtsfelder ohne Erfüllung jeglicher Kriterien. Analoges gilt für die im Folgenden dargestellten Positiv- und Negativkriterien der Auflichtmikroskopie für PET Blot.

Tabelle 20: Immunhistochemische Positivkriterien. Die Bewertung einer Struktur als positiv für spezifische aSyn-Reaktivität erfolgte anhand folgender Kriterien, die vor Beginn der Endauswertung erstellt wurden. Erfüllte eine Struktur alle drei Kriterien und kein Negativkriterium, so wurde das Gesichtsfeld als positiv bewertet.

Kriterium	Beschreibung
Färbung	Tief dunkelbraune Immunreaktivität
Anatomische Zuordnung	Assoziation zu einem Gefäß, Nerv oder Ganglion. Tangential angeschnittene Neuriten wurden unabhängig von ihrer Lage als positiv gewertet.
Morphologie	Lewy-Körperchen, tangential angeschnittener Lewy-Neurit, multiple Lewy-Punkte oder multiple axial angeschnittene Lewy-Neuriten

Tabelle 21: Immunhistochemische Negativkriterien. Analog zur Erarbeitung der Positivkriterien wurden folgende Kriterien erstellt, die zur Bewertung einer Struktur unspezifisch führten.

Kriterium	Beschreibung
Neuronale Muster, die sich auch in Kontrollfällen finden	z. B. zytoplasmatische Ganglienzellfärbung oder flächige Myelinreaktivität
Färbung nicht-neuronaler Strukturen	z. B. Makrophagen oder Drüsen
Basalmembranreaktivität	Tiefbraune Farbreaktion, aber beschränkt auf die typisch „gekräuselt“ anmutende Basalmembran
Falsche Farbgebung	z. B. tiefschwarze oder hellgelbe Strukturen
Unplausible Lokalisation	z. B. in der Mukosa oder einem Gefäßlumen
Überfärbungsartefakte	z. B. Kernfärbung oder selektive Anfärbung des Präparatrandes
Überlagerungsartefakte	Falsche Bildebene der Struktur
Formalinpigment	Örtlich gehäufte braun-schwarze Punkte und gelbe Schlieren
Bizarre und polygonale nicht-physiologische Strukturen	z. B. Farb- und Schmutzartefakte

5.2.5.2 Auflichtmikroskopie

Wir nutzten ein Setup mit Auflichtmikroskop Olympus SZX12, 10x-Okular „WHS10X-H/22“, 1x-Objektiv „DFPLAPO1XPF“ und 20x-Zusatzobjektiv „AL-20X“ (siehe Tabelle 9). Der PET Blot besitzt eine moderate anatomische Auflösung, mittels der die Zugehörigkeit zu anatomischen Strukturen festgestellt werden kann, ist diesbezüglich jedoch der Immunhistochemie unterlegen. Um diesen Nachteil auszugleichen, wurden Präparate in H.-E.-Färbung als Übersichtspräparate genutzt. Die Kriterien zur Bewertung der einzelnen Strukturen und somit der Gesichtsfelder sind insgesamt an denen der IHC orientiert, berücksichtigen jedoch die besonderen Reaktivitätsmuster und Artefakte des PET Blot. Wird in Bezug auf PET Blot von „Immunreaktivität“, „positiver“ oder „negativer“ Bewertung gesprochen, so ist stets der Bezug auf die Folgenden Positiv- und Negativkriterien gemeint (vgl. auch vorangehendes Kapitel).

Tabelle 22: Positivkriterien im PET Blot. Die folgenden Kriterien wurden vor Beginn der Endversuche erstellt und führen zur Bewertung einer Struktur als positiv für spezifische aSyn-Reaktivität.

Kriterium	Beschreibung
Färbung	Dunkel-violett mit hellvioletttem „Schatten“ / „Hof“
Anatomische Lage	Assoziation zu einem Gefäß, Nerv oder Ganglion. Tangential angeschnittene Neuriten wurden unabhängig von ihrer Lage als positiv gewertet.
Morphologie	Neuriten (analog den Lewy-Neuriten der Immunhistochemie), intrazelluläre Einschlüsse (ähnlich Lewy-Körperchen) sowie Ansammlungen von Punkten (ähnlich Lewy-Punkten bzw. axialen Neuriten)

Tabelle 23: Negativkriterien im PET Blot. Analog zu den Positivkriterien wurden diese Kriterien erstellt, die zur Bewertung einer Struktur als unspezifisch führen.

Kriterium	Beschreibung
Untypisches Färbeverhalten	z. B. tiefschwarz ohne violetten „Schatten“, braun, gelb
Unplausible Lokalisation	z. B. in der Mukosa oder einem Gefäßlumen
Atypische Morphologie	Bizarr, keiner physiologischen Struktur entsprechend oder in Kontrollfällen ähnlich auffindbar, z. B. punktförmig oder polygonal
In Kontrollfällen auffindbare Muster	Insbesondere einzeln gelegene, intra- oder extrazelluläre Punkte mit violetttem „Schatten“ sowie Randartefakte
Formalinreaktion	Örtlich gehäufte braun-schwarze Punkte und gelbe Schlieren

5.2.6 Informationsverarbeitung und Statistik

Alle Bilder wurden mittels Leica Application Suite, Version 3.8.0 aufgenommen und gegebenenfalls mit Kennzeichnungen versehen. Mittels „GNU Image Manipulation Program“, Version 2.10.22 wurden außerdem Bilder in ihrer Helligkeit angepasst und gegebenenfalls weitere Beschriftungen angebracht. Zur quantitativen Auswertung wurden die zunächst in „Microsoft Excel“, Version 16.0, zusammengefassten Primärdaten mittels „RStudio“, Version 1.2 sowie „SPSS“, Version 27 weitergehend aufgearbeitet (Details siehe Tabelle 24). Zu diesem Zweck erfolgte freundlicherweise eine statistische Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) am Universitätsklinikum des Saarlandes.

Tabelle 24: Verwendete Software

Beschreibung der Software	Versionsnummer	Entwickler
EndNote	17.8.0.11583	Thomson Reuters
GNU Image Manipulation Program (GIMP)	Version 2.10.22	Open Source (GIMP Development Team)
Leica Application Suite	3.8.0	Leica Camera AG
Microsoft Excel	16.0.13001.20266	Microsoft Corporation
Microsoft Word	16.0.13029.20344	Microsoft Corporation
RStudio	1.2.5033	Open source (RStudio PBC)
SPSS	27.0.0.0	International Business Machines Corporation (IBM)

Die Daten wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test und Quantil-Quantil-Diagrammen auf Normalverteilung getestet, um geeignete Tests für die schließende Statistik zu ermitteln. Bei beiden Tests handelt es sich um Signifikanztests mit der Nullhypothese, die Stichproben seien normalverteilt. Nach Widerlegung der Nullhypothese wurden einzelne Protokolle mittels Friedman-Rangsummen-Test als

adäquatem Globaltest auf statistische Signifikanz getestet. Es folgte ein paarweiser Signifikanztest via Wilcoxon-Rangsummen-Test für verbundene Stichproben. Für unverbundene Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Der Signifikanzwert zur Verwerfung der jeweiligen Nullhypothese wurde konventionell auf 0,05 festgelegt. Zur Korrelation von Immunreaktivität und klinischen Parametern wurde der Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman (r) zur Abschätzung der Korrelation bestimmt. Mittels dessen Quadrat, dem Bestimmtheitsmaß (r^2), konnte anschließend gezeigt werden, welcher Anteil der Streuung in den Daten durch das jeweilige Regressionsmodell erklärt werden kann.

Zur Bestimmung des α Syn-Gradienten nutzten wir zwei unterschiedliche Ansätze: Einerseits bestimmten wir auf Basis der immunreaktiven Gesichtsfelder mittels Scoring von x/10 Gesichtsfeldern je Organpräparat die Dichte der Immunreaktivität (im Folgenden auch x/10 „HPF“ für High Power Fields, d. h. Gesichtsfelder in 200-facher Vergrößerung). So konnten wir einen Gradienten der α Syn-Dichte für die einzelnen Organe sowie auch im Vergleich zwischen Submukosa und Muskularis bestimmen (Abbildung 29 und Abbildung 30).

Komplementär und unabhängig hierzu nutzten wir ein Rankingverfahren auf Einzelfallbasis, welches im Folgenden näher erklärt sei. Für das Ranking sichteten wir zunächst alle Fälle mit jeglicher spezifischer Immunreaktivität und bestimmten für jeden Organabschnitt des GIT, wie stark sich weitere Organabschnitte desselben Falles ko-reaktiv verhielten. Ausgenommen waren Ösophagus und Appendix aufgrund einer zu geringen Fallzahl. Wir vergaben entsprechende Koreaktivitäts- bzw. Ranking-Punkte je Organabschnitt, die geringste Punktzahl entsprach hierbei dem besten Rang (ähnlich Schulnoten).

Beispiel: In der Diagnosegruppe gab es 13 immunreaktive Präparate des Magens. Zu diesen ließen sich insgesamt 11 Ileum-Präparate derselben Fälle finden, von denen 8/11 (73 %) immunreaktiv, d. h. ko-reaktiv mit den Magen-Präparaten, waren. Dahingegen zeigte sich im Vergleich derselben 13 Magen-Präparate mit 11 Proben des Duodenums eine Ko-Reaktivität bei nur 3/11 (27 %) Fällen, sodass das Ileum einen höheren Rang erzielte (in diesem Fall das Ileum den ersten, das Duodenum den letzten).

Es war möglich, zwischen 0 und 5 Rangpunkte zu erreichen, entsprechend der Organabschnitte des GIT (Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Rektum; 0 Punkte wurden vergeben, um Präparate nicht mit sich selbst zu vergleichen siehe Tabelle 25). Bei Gleichstand wurde dieselbe Menge an Rangpunkten an beide verglichenen Organe vergeben. Im abschließenden Schritt wurden die Rangpunkte aufaddiert: z. B. erreichte der Magen in der Diagnosegruppe im IHC-Protokoll via 10D2 8 Rangpunkte (3 x 1. Rang + 1 x 2. Rang + 1 x 3. Rang = 8) und somit aufgrund niedrigster Rangpunktzahl den (Gesamt-)Rangplatz Nr. 1, das Duodenum hingegen im gleichen Protokoll mit 25 Punkten den 6. Platz von 6 Organabschnitten. Dieses Procedere wurde für alle Fälle, Organabschnitte des GIT und Protokolle durchlaufen.

Tabelle 25: Beispiel zur Rangbildung durch Bestimmung der Ko-Reaktivität auf Einzelfallbasis. Präparate der Diagnosegruppe mit koreaktiven Vergleichspräparaten (n = 58) in der IHC via 10D2 und Proteinase-K-Vorbehandlung. Zur Veranschaulichung sind die Organabschnitte bereits ihren Rangpunkten nach geordnet. Anhand der Rangpunkte erhielt in diesem vereinfachten Schema das Rektum den ersten Rang, das Duodenum den letzten. In der tatsächlichen Auswertung wurden die Rangpunkte sämtlicher solcher Rankings (d. h. für jeden Organabschnitt des Gastrointestinaltraktes) addiert, um einen aussagekräftigen Gesamtwert zu erhalten. Grau unterlegt ist die Koreaktivität des Magens „mit sich selbst“, es werden hierfür 0 Punkte vergeben.

Ko-Reaktivität mit Magen-Präparaten. Diagnosegruppe, IHC via 10D2 und PK-Vorbehandlung						
Rangpunkte	0	1	2	3	4	5
GIT-Abschnitt	Magen	Rektum	Ileum	Jejunum	Kolon	Duodenum
Immunreaktive Präparate	13	6	8	6	3	3
Gesamtzahl Präparate	13	8	11	9	6	11
% Immunreaktiv/Gesamt	100	75	73	66	50	27

Zur Bestimmung einer Mindestbiopsiegröße wurde schließlich aus der Anzahl der immunreaktiven pro jeweils zehn High-Power-Fields (HPF) darauf geschlossen, wie viele benötigt werden, um mit 95 % Konfidenz wenigstens eines mit spezifischer Immunreaktivität (vgl. Tabelle 20 bzw. Tabelle 22) zu entdecken. Das Procedere sei im Folgenden beschrieben: Es wurde zunächst die Zahl der nicht-immunreaktiven (negativen) HPF berechnet (Beispiel: 2/10 negative, wenn 8/10 HPF immunreaktiv waren). Um nun zu ermitteln, wie viele HPF zur Diagnose ausreichen, wurde der Wert pro zehn HPF in mehreren Iterationen mit sich selbst multipliziert und das Ergebnis mit dem Konfidenzintervall von 95 % verglichen.

Beispiel: Es ergibt sich bei 2/10 (= 0,2 = 20 %) negativen Gesichtsfeldern: $0,2^2 = 0,04$, also eine Wahrscheinlichkeit von 4 %, dass in zehn HPF keine Immunreaktivität gefunden wird bzw. mit 96 % Wahrscheinlichkeit ein positives HPF auffindbar ist. Es waren im Beispiel somit zwei Iterationen ($0,2 \times 0,2$) und entsprechend zwei HPF nötig, um mit 95 % Konfidenz eine Diagnose stellen zu können.

Gegenbeispiel: bei 8/10 negativen HPF wären schon 14 Iterationen und dementsprechend 14 HPF auszuwerten, um unter die Signifikanzgrenze zu gelangen, denn $0,8^{14} = 0,044$, ergo $< 0,05$.

Da die Größe eines HPF in 200-facher Vergrößerung in Auflicht- und Durchlichtmikroskopie jeweils mit 1,131 mm² bekannt war, konnte mit Hilfe der berechneten HPF auf die Mindestbiopsiegröße der einzelnen Fälle der Diagnosegruppe geschlossen werden (siehe Tabelle 43 im Kapitel 6.2.6). Falls alle HPF eines Protokolls negativ waren, betrug die Wahrscheinlichkeit für ein zufällig ausgewähltes negatives HPF 100 %, weshalb der entsprechende Wert lediglich als über dem ermittelbaren Höchstwert liegend klassifiziert wurde ($> 32,8$ mm²).

6 Ergebnisse

Vor der Darstellung unserer qualitativen (morphologischen) und (semi-)quantitativen Ergebnisse aus den Verfahren PET Blot und IHC sollen zunächst exemplarische H.-E.-Färbungen und Positivkontrollen vorgestellt werden. Dies dient dem didaktischen Zweck, eine Vorstellung über die Anatomie der Präparate sowie über Ausmaß und Qualität der *zentralen* Lewy-Pathologie (siehe auch Abbildung 5) unserer Fälle zu erhalten. In diesem Rahmen wird für den PET Blot auch auf einen wichtigen Fallstrick in der Vorbehandlung hingewiesen. Im Anschluss werden die qualitativen Ergebnisse aus der IHC und dem PET Blot danach aufgeschlüsselt, ob sie unseren im Voraus erarbeiteten Positiv- und Negativkriterien entsprachen. Besonderes Augenmerk legen wir dabei in beiden Verfahren auf Artefakte, welche leicht mit spezifischer Immunreaktivität verwechselt werden können, sowie darauf, ob auch Kontrollfälle Immunreaktivität aufweisen, die unseren Kriterien von Morphologie, Lokalisation und Färbung entsprechen.

Im zweiten Teil kommen wir – analog zur Durchführung der Studie – zur quantitativen Auswertung unserer Ergebnisse und schließlich zum Staging nach Braak. Für die quantitative Auswertung halten wir uns eng an unsere explorative Hypothese, der Gastrointestinaltrakt sei ein zur neuropathologischen Diagnose der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten geeignetes Ziel und führen eine schrittweise systematische Auswertung zur Beantwortung unserer Forschungsfragen durch: (I) Bestimmung eines α -Synuklein-Gradienten im Sinne einer Dichtebestimmung je Organ und eines Rankings auf Einzelfallbasis sowie im Vergleich von Submukosa und Muskularis; (II) eine daran anschließende Einzelfalldarstellung derjenigen Fälle mit besonders hoher α -Synuklein-Dichte und (III) eine Korrelationsanalyse mit klinischen Parametern, um komplementär zur Gradientenbestimmung Auskunft über pathophysiologische Implikationen unserer Studie zu erhalten; (IV) ein Vergleich der Protokolle untereinander sowie (V) der Sensitivität und Spezifität hingegen zielen stärker auf das diagnostische Interesse unserer Studie ab. Wir schließen die quantitative Auswertung mit (VI) dem Versuch der Berechnung einer Mindestbiopsiegröße in Abhängigkeit von Methode und Fall. Das Staging nach Braak und McKeith ordnet die gewonnenen Daten in einen klinisch-neuropathologischen Kontext ein.

6.1 Qualitative Auswertung

6.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

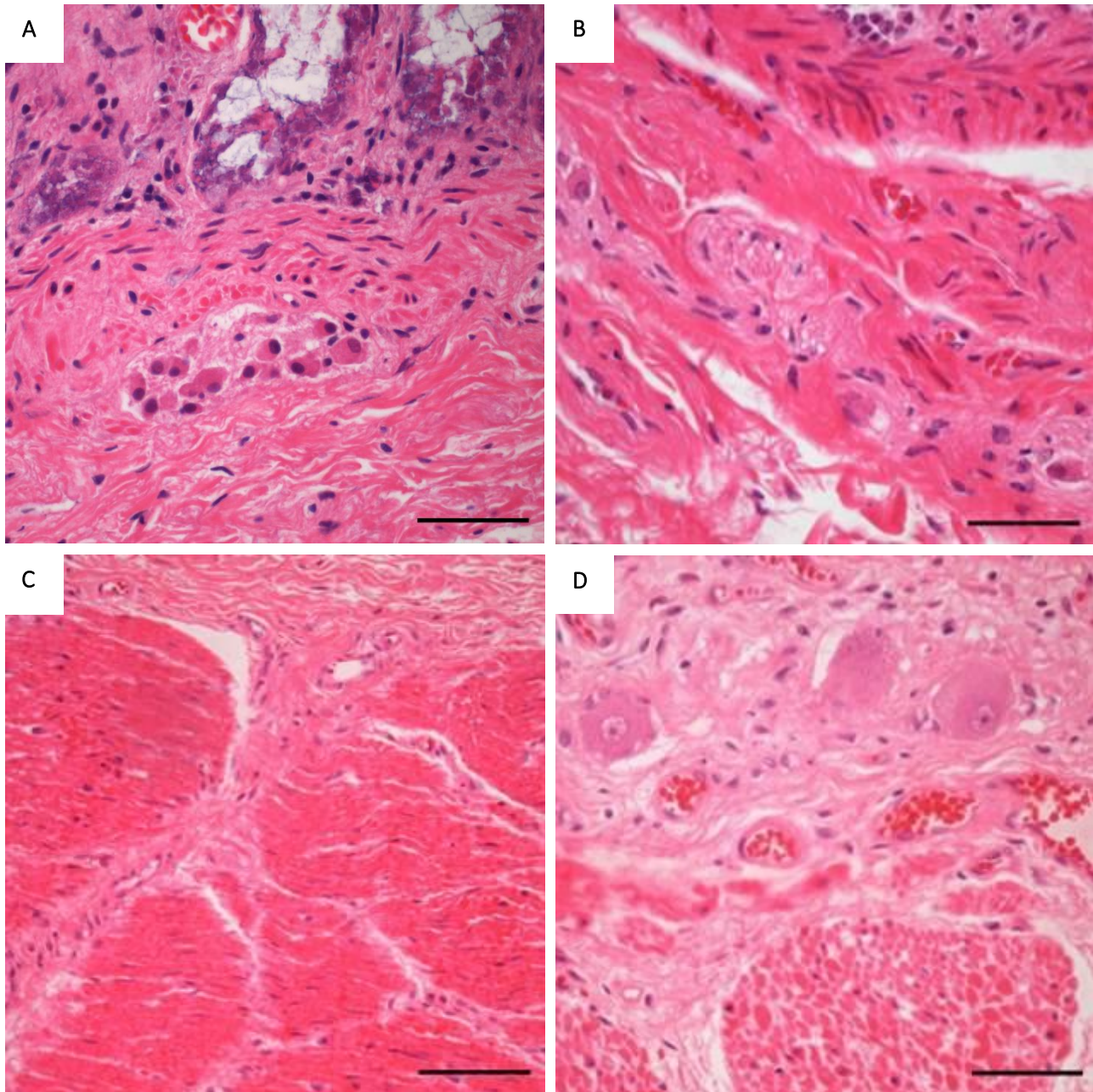


Abbildung 17: Die hohe anatomische Auflösung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung veranschaulicht Strukturen des enterischen Nervensystems. A, B und D in 400-facher Vergrößerung (Balken entspricht je 50 μm), C in 200-facher Vergrößerung (Balken entspricht 100 μm). A Ein Ganglion der Submukosa liegt der darüber liegenden Muscularis mucosae an (PSP2; Kolon). B Ein geschlängelter Nerv verbindet zwei solcher Ganglien (oben links nach unten rechts) der Submukosa (PD4; Rektum). C Nervenstränge führende Bindegewebssepten verbinden die Submukosa (oben) mit der Muskularis, wo sie sich stark verzweigen (MSA1; Ösophagus) und in den D Plexus myentericus übergehen, hier mit großen Ganglienzellen neben kleineren Gefäßen (selbes Präparat wie in C).

Anhand der H.-E.-Färbung, kann die Physiologie des Gastrointestinaltraktes demonstriert werden. In der meist stark aufgelockerten Submukosa fanden sich der Muscularis mucosae anliegend kleine Anhäufungen von Ganglienzellen im Plexus submucosus internus (Meissner) sowie der Ringmuskelschicht angelagert im Plexus submucosus externus (Schabadasch). Die beiden Plexus konnten anhand der charakteristischen, runden Ganglienzellen (Abbildung 17 A, B, D) identifiziert und entsprechend ihrer Lokalisation differenziert werden. Des Weiteren fanden sich Nervenstränge, welche die Ganglien miteinander zu Plexus verbinden (Abbildung 17 B) sowie Gefäße unterschiedlichen Kalibers (z. B. Abbildung 17 D zwischen Ganglienzellen und Muskel). Von der Submukosa ausgehend waren Bindegewebsstraßen zu sehen, welche in die Muskularis ziehen (Abbildung 17 C), in der sie sich auffächern und den Plexus myentericus (Auerbach) umgeben (Abbildung 17 D). Der Plexus myentericus war im Vergleich zum Plexus submucosus länglicher und weniger kompakt, jedoch mit subjektiv ähnlicher Anzahl und Morphologie der Ganglienzellen (Vgl. Abbildung 17 A und D). Einzelne Anteile des Plexus konnten auch an der Grenze zur Subserosa bzw. Submukosa entdeckt werden.

6.1.2 Positivkontrollen

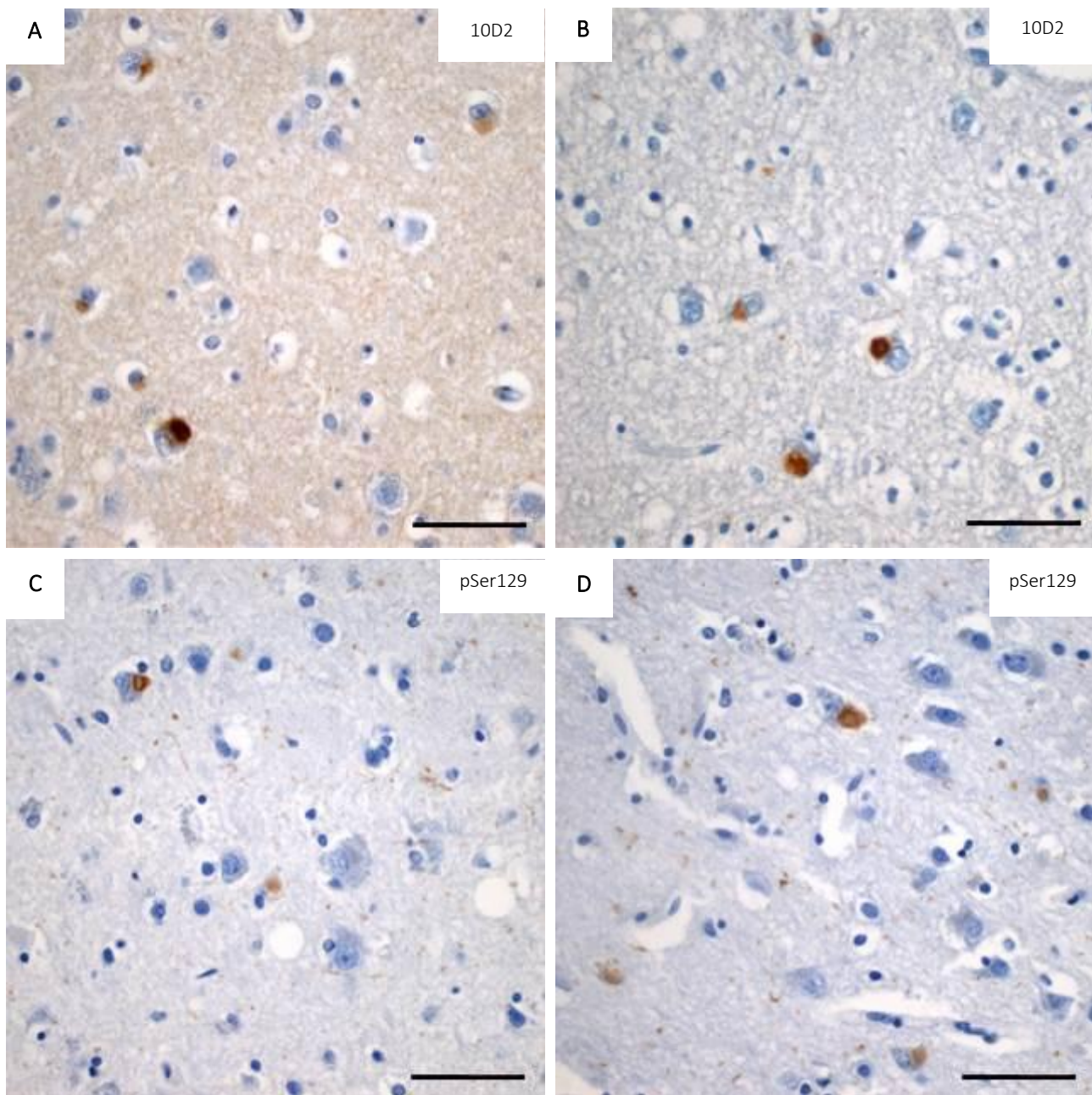


Abbildung 18: Ein retikuläres Muster aus Lewy-Körperchen und Neuriten mit geringer Hintergrundreaktivität bestätigte die hohe Qualität eines immunhistochemischen Versuchs. Kortikale Lewy-Pathologie des Kontrollfalls DLB5 in 400-facher Vergrößerung (Balken je 50 µm). **A** Ein Protokoll mit 10D2 ohne Vorbehandlung (nicht in die Endauswertung einbezogen) weist stärkere Hintergrundreaktivität auf wohingegen **B** 10D2 mit Proteinase-K-Vorbehandlung praktisch keine aufweist. **C** pSer129 (monoklonal) ohne Vorbehandlung und **D** pSer129 (monoklonal) mit Proteinase-K-Verdau zeigten vergleichbare Reaktivitätsmuster.

Die Kortex-Präparate des als Positivkontrolle genutzten Falles (DLB5) zeigten in allen Protokollen reichlich Lewy-Pathologie (Abbildung 18 A bis D). Gleichzeitig fanden sich in den in die Endauswertung einbezogenen Protokollen (Abbildung 18 B bis D) keinerlei mit Lewy-Pathologie verwechselbaren Artefakte im ZNS. Der Antikörper 10D2 mit PK-Vorbehandlung wies die charakteristischen Einschlusskörperchen kortikalen Typs auf neben versprengter extrazellulärer Immunreaktivität mit kaum Hintergrundfärbung (Abbildung 18 B). Vorversuche mit 10D2 ohne Vorbehandlung hingegen (nicht in quantitative Auswertung einbezogen) erbrachten ein diffuses Hintergrundmuster (Abbildung 18 A), das sich in keinem anderen Protokoll in dieser Ausprägung wiederfand. Unter den via pSer129 mk gefärbten Kortexpräparaten ließen sich keine eindeutigen Abgrenzungsmerkmale zwischen den Protokollen mit und ohne PK-Vorbehandlung ausmachen (Abbildung 18 C und D). Im Vergleich zu pSer129 wies das 10D2-Protokoll mit PK-Vorbehandlung (Abbildung 18 B) zwar ein ähnliches Muster kortikaler Lewy-Körperchen auf, jedoch mit etwas geringerer Dichte an neuritischen Strukturen. Ein retikuläres Muster neben- und übereinander liegender Neuriten sowie einzelner Lewy-Körperchen war in allen Protokollen ein Merkmal hoher Qualität der mit dieser Positivkontrolle gefärbten Reihe (vgl. Abbildung 18 C sowie prominent in Abbildung 32 B, Kapitel 6.3).

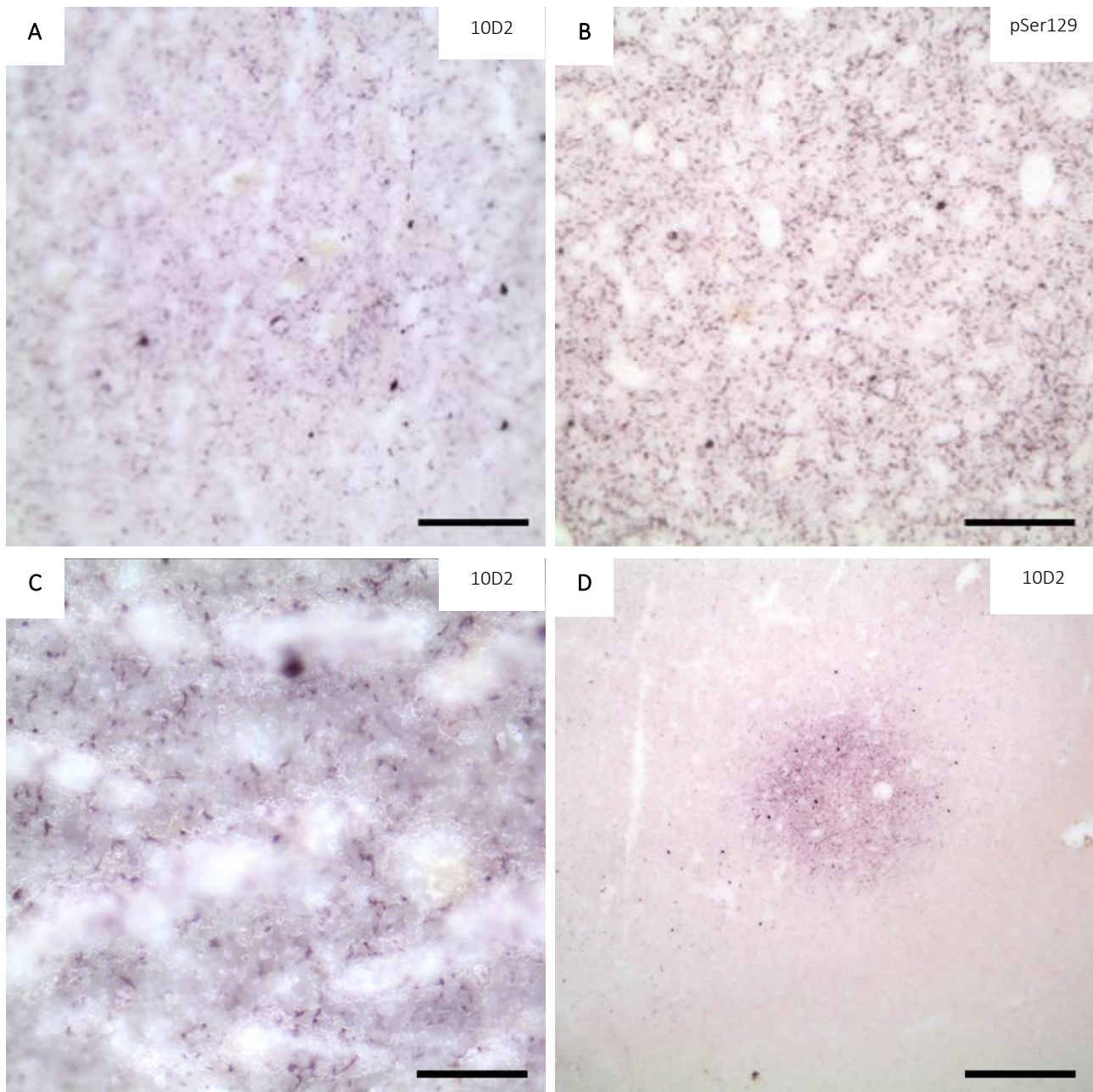


Abbildung 19: Ein feines synaptisches Muster und gleichmäßiges Färbeverhalten der Positivkontrolle signalisierten einen gelungenen Versuch im PET Blot. Kortikale Lewy-Pathologie des Kontrollfalls DLB5. **A** (10D2 1:5.000) **und B** (pSer129 pk 1:10.000): Lewy-Körperchen und synaptisches Reaktivitätsmuster (jeweils 200-fache Vergrößerung, Balken 100 µm). **C** Nahaufnahme des synaptischen Musters inklusive feinen Neuriten und eines Lewy-Körperchens in der oberen Bildhälfte (10D2 1:5.000; 500-fach, Balken 40 µm). **D** Eine fehlerhafte Vorbehandlung ist erkennbar an der inhomogenen Verteilung der kortikalen Lewy-Pathologie. Auch im Detektionsprozess entstandene weiße Kratzer lassen sich im Kortex (oben) erkennen, was durch eine niedrige Einstellung der Schüttelplatte vermieden werden kann. In der Substantia alba (unten rechts) findet sich regelmäßig kaum Immunreaktivität (10D2 1:2.000; 50-fach, Balken 400 µm).

Im PET Blot (Abbildung 19) zeigten die Positivkontrollen bei guter Färbung neben retikulärer Morphologie aus LB und übereinander liegenden LN auch ein „synaptisches“ Färbemuster mit Mikroaggregaten über dem gesamten Kortex (Detailaufnahme in Abbildung 19 C), teils bis in die weiße Substanz reichend. Dieses Muster sowie eine homogene, dunkel-violette Färbung im gesamten Kortex der Positivkontrollen (vgl. Abbildung 19 A und B im Gegensatz zu D) sprachen für die hohe Qualität eines Färbedurchgangs. 10D2 und pSer129 erbrachten qualitativ und quantitativ in etwa vergleichbare Ergebnisse. Was pSer129 angeht, war die polyklonale Variante subjektiv stärker immunreaktiv. Der nur für Vorversuche in Verdünnung 1:2.000 verwendete Antikörper LB509 (Abbildung 27 C) zeigte auch im Kortexgewebe eine sehr intensive Färbung trotz Färbezeit von nur wenigen Sekunden. Ein replizierbarer Fallstrick, der potentiell alle Färbungen betraf und den wir in der IHC nicht beobachten konnten, war die ungleichmäßige Kortexfärbung unserer Positivkontrollen (Abbildung 19 D). Derartige Ungleichmäßigkeiten konnten vermieden werden, wenn die Präparate während der PK-Vorbehandlung mindestens zwei Mal im Abstand von je zwei Stunden durch Schwenken neu mit dem Antikörper benetzt wurden. Alles in allem waren die Färbung von α Syn-Aggregaten in der Großhirnrinde mittels PET Blot mittels aller getesteten Antikörper morphologisch vergleichbar und die Qualität der von uns erarbeiteten Protokolle gut, sodass eine quantitative Auswertung der enterischen Proben durchgeführt werden konnte.

6.1.3 Immunhistochemie

6.1.3.1 Histopathologie

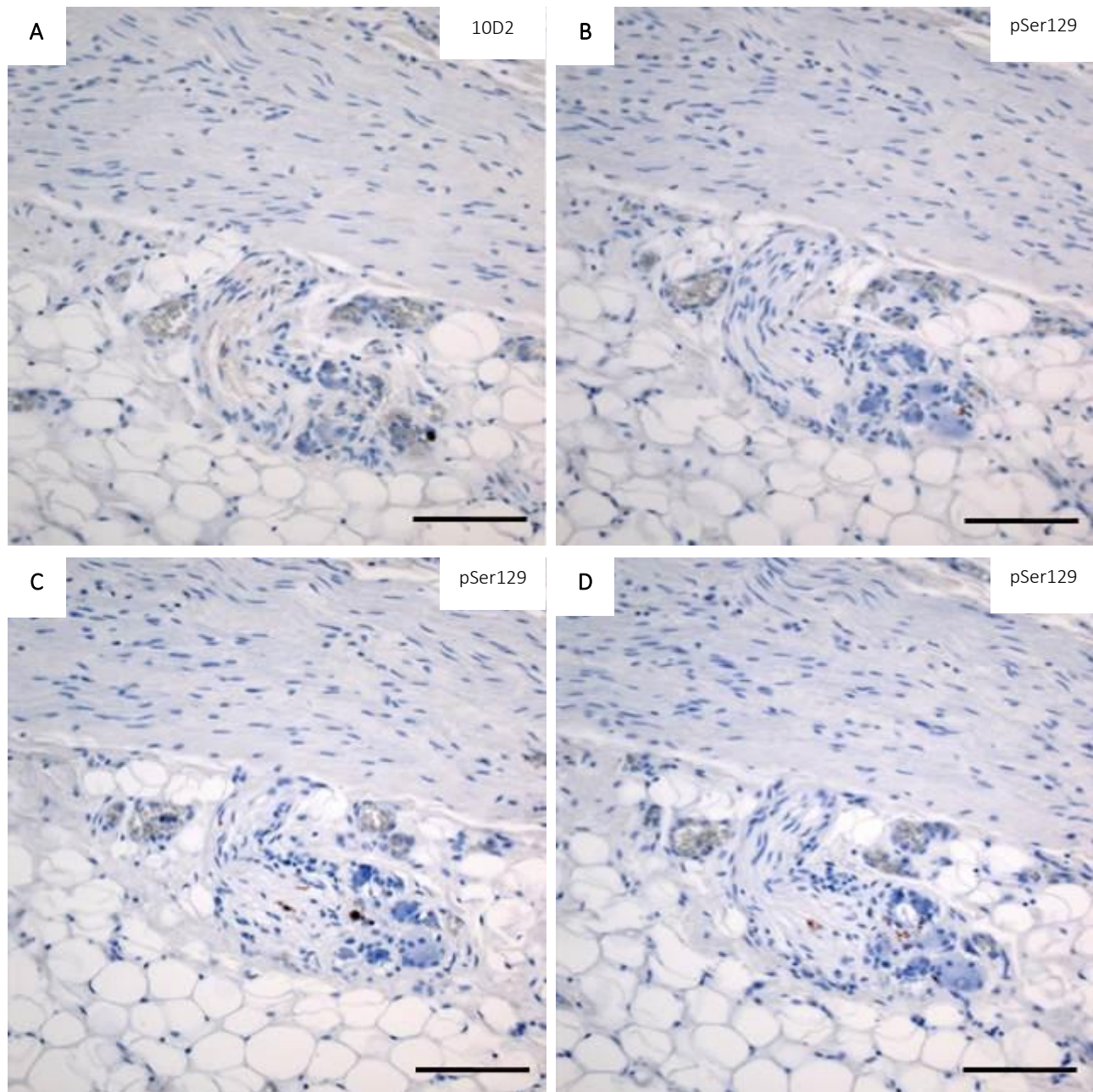


Abbildung 20: Ein Ganglion am Rand der Muskularis zeigt vergleichbare Färbemuster in einer Schnittserie vier immunhistochemischer Protokolle. DLB2 in 400-facher Vergrößerung (Balken je 50 µm). Protokolle A, C und D wurden in die Endauswertung einbezogen, b ist zur Veranschaulichung der Gleichwertigkeit des polyklonalen Antikörpers in der IHC dargestellt. Das Ganglion befindet sich in der Mitte des Bildes, erkennbar an den runden Ganglienzellen und der in einen Nervenstrang in Richtung Muskularis auslaufenden Morphologie. **A** 10D2 1:1.000, PK-Vorbehandlung. **B** pSer129 (polyklonal) 1:10.000, PK-Vorbehandlung **C** pSer129 (monoklonal) 1:10.000, ohne Vorbehandlung. **D** pSer129 (monoklonal) 1:10.000, PK-Vorbehandlung. Im PET Blot fand sich an gleicher Stelle keinerlei Immunreaktivität.

Es zeigten sich vergleichbare Färbemuster in allen IHC-Protokollen (Abbildung 20 A-D). Dabei fanden sich immunreaktive Strukturen in der Diagnosegruppe, die sich morphologisch am ehesten als Lewy-Neuriten (LN), Lewy-Körperchen (LB) und Lewy-Punkte einordnen ließen. Daneben entdeckten wir auch Muster, welche sich über alle IHC-Protokolle gleichermaßen wiederfanden. Obwohl sich Immunreaktivität auch in Kontrollfällen versprengt entdecken ließ, waren immunreaktive Strukturen der Diagnosegruppe insgesamt prominenter (im Sinne intensiver Anfärbung und klar abgrenzbarer Immunreaktivität) und die Strukturen fanden sich auch an anderen Stellen des Präparates in ähnlicher Form wieder (im Gegensatz zu rein fokalen Artefakten). Hinsichtlich der Färbequalität fiel kein Unterschied zwischen Submukosa und Muskularis auf. In der Umgebung der Submukosa waren neben positiven Ganglienzellen auch viele neuritische Strukturen in der Muscularis mucosae und in der Nähe submukösen Gefäße zu finden. Immunreaktive Strukturen der Muskularis beschränkten sich auf die Nervenplexus mit Ausnahme weniger tangential angeschnittener Neuriten. Artefakte waren häufig fokal betont, am Präparatrand, in der Mukosa sowie im Bindegewebe und in Gefäßwänden.

Vom subjektiven Standpunkt aus waren die Präparate der Diagnosegruppe „schwieriger“ auszuwerten, da sich neben eindeutiger Lewy-Pathologie reichlich Strukturen fanden, die zwar Immunreaktivität zeigten, jedoch teils schwer von artefiziellen Mustern abzugrenzen waren. So ließen sich in Grenzfällen putative solitäre, transversal angeschnittene LN nicht sicher von Artefakten wie schwarzem Formalinpigment unterscheiden. Im direkten Vergleich unserer Färbemethoden mittels Serienschnitten fand sich eine insgesamt ähnliche Färbequalität und -quantität aller Protokolle (Abbildung 20 A-D). So zeigten die drei in der Endauswertung genutzten Protokolle (Abbildung 20 A, C und D) sowie ein Protokoll mit der polyklonalen Variante des Antikörpers pSer129 aus den Vorversuchen (Abbildung 20 B) quantitativ und qualitativ ähnliche Ergebnisse. Auffällig war lediglich eine dezente Zytoplasma- und Myelinfärbung via 10D2, was jedoch zu keinem Zeitpunkt die Auswertung beeinträchtigte. Am Beispiel dieser Serienschnitte sowie auch entsprechend unserer Erfahrung in der endgültigen Auswertung der Schnitte zeigte sich das höchste Reaktivitätsniveau für den Antikörper pSer129 mk, was umso mehr hervortrat, wenn eine Vorbehandlung mittels PK gewählt wurde (Abbildung 20 C). pSer129 mk und pk waren ansonsten – in der IHC(!) – in ihrem Färbeverhalten identisch.

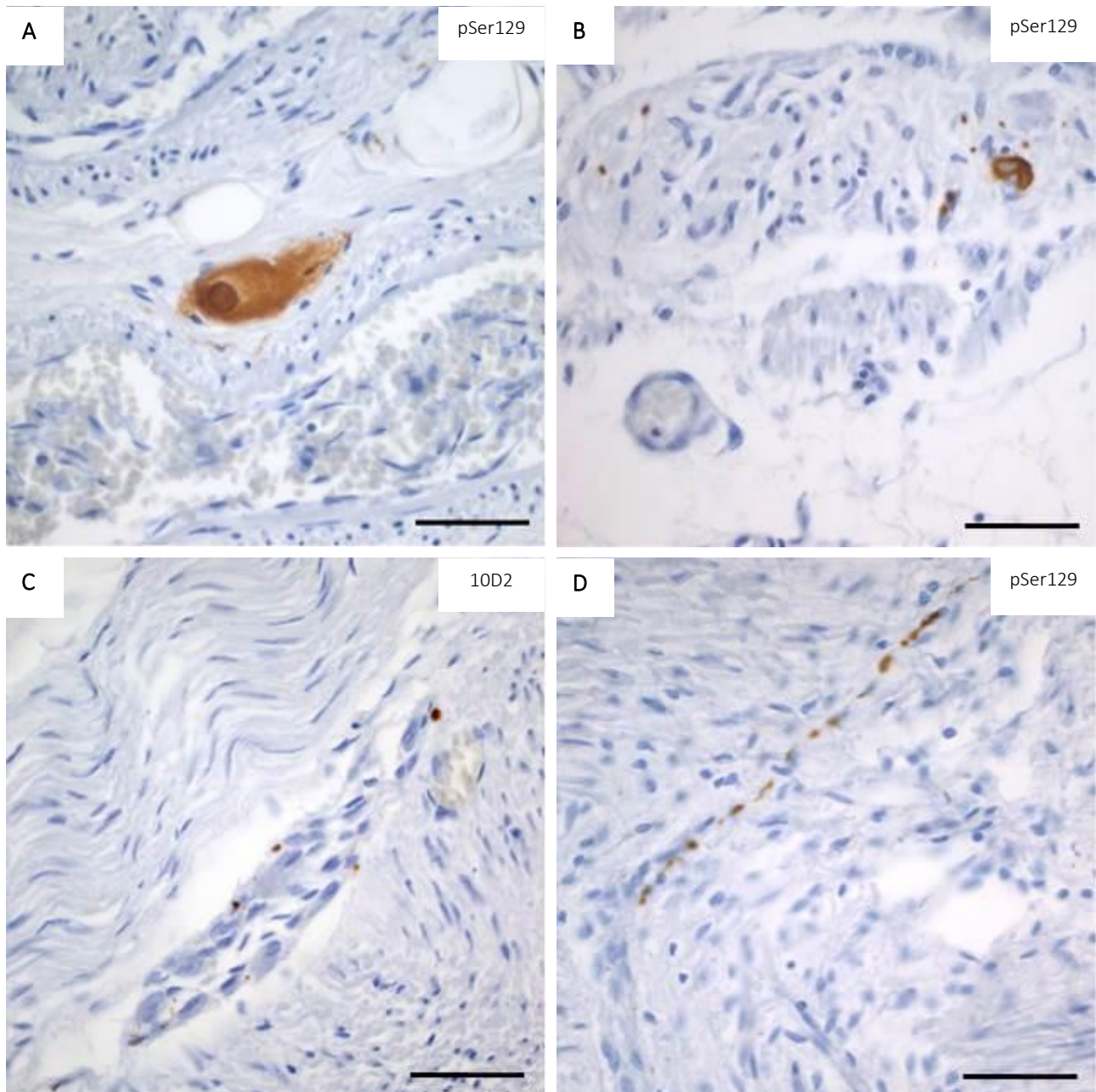


Abbildung 21: Immunreaktivität in Präparaten der Diagnosegruppe: Lewy-Pathologie des Gastrointestinaltrakts. 400-fache Vergrößerung (Balken je 50 μm). **A** Lewy-Körperchen mit kometenschweifartigem Ausläufer nahe submukösen Gefäßen des Ileums (DLB5; pSer129 1:10.000 ohne Vorbehandlung). **B** Lewy-Körperchen mit Kernaussparung in einem Nerv der ösophagealen Muskularis (PD4; pSer129 1:10.000 mit PK-Vorbehandlung). **C** Transversal angeschnittene Lewy-Neuriten im Plexus myentericus (DLB3; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung). **D** Ein tangential angeschnittener Lewy-Neurit im Verlauf durch die Muskularis des Jejunums in seiner typischen gewundenen Morphe (PDD2; pSer129 1:10.000 ohne Vorbehandlung).

Es ließen sich diverse Muster ausmachen, die sich in ihrer Ausprägung nicht (Abbildung 21 A, B, D) oder sehr selten (Abbildung 21 C) in Kontrollfällen wiederfanden. Dazu gehören Muster wie Immunreaktivität in Form von LB (Abbildung 21 A) sowie flächige Immunreaktivität des Zellsoma mit Kernaussparung (Abbildung 21 B), die zwar charakteristisch, aber nur sehr vereinzelt in der Diagnosegruppe zu finden waren. Häufiger fanden sich multiple transversal (Abbildung 21 C) oder vereinzelt tangential angeschnittene LN in den Nerven und Ganglien des Darmplexus sowie teils frei in der Muskularis (Abbildung 21 D). Insbesondere die DLB-Fälle wiesen äußerst prominente Ausprägungen der Lewy-Pathologie auf (vgl. Abbildung 21 A). Die folgenden Färbemuster waren in der Diagnosegruppe zu finden und entsprachen den im Voraus bestimmten Kriterien korrekter Färbung, anatomischer Zuordnung und Morphologie (siehe auch Tabelle 20 und Tabelle 21, Kapitel 5.2.5.1):

- ❖ **Lewy-Körperchen (LB):** Meist solitäre Einschlusskörperchen innerhalb der Nervenzellen des Plexus submucosus sive myentericus. Nicht immer sind die Ganglienzellen trivial identifizierbar, sodass eine Lage in der Muscularis mucosae oder perivaskulär imitiert werden kann (siehe z. B. Abbildung 21 A). Zwar sind sie charakteristisch und bereits in niedriger Vergrößerung erkennbar, jedoch finden sie sich im Vergleich zu Punkten und Neuriten seltener. Die LB sind tief dunkelbraun und klar abgrenzbar.
- ❖ **Lewy-Punkte:** Kleiner als die LB imponieren Lewy-Punkte als intrazelluläre, häufig multiple, dunkelbraune Zelleinschlüsse des Soma. Sie sind seltener als die LN und ohne hinreichende anatomische Information schwer von diesen zu unterscheiden.
- ❖ **Lewy-Neuriten (LN):** Diese lassen sich potentiell in allen Abschnitten des GIT und Darmwandschichten finden. Besonders häufig begleiten sie Gefäße oder finden sich in den Ganglien. Auch in der Muscularis mucosae fanden sich diese Strukturen reichlich. Die tangential angeschnittenen LN sind gewunden bis fadenförmig mit gelegentlichen Auftreibungen, womit sie eine unverwechselbare Gestalt aufweisen (Abbildung 21 D). Die häufigeren axialen (transversalen) Anschnitte hingegen sind als dunkelbraune Punkte erkennbar (Abbildung 21 B und C), jedoch mit unspezifischen Farblagerungen verwechselbar, wenn sie solitär vorliegen.

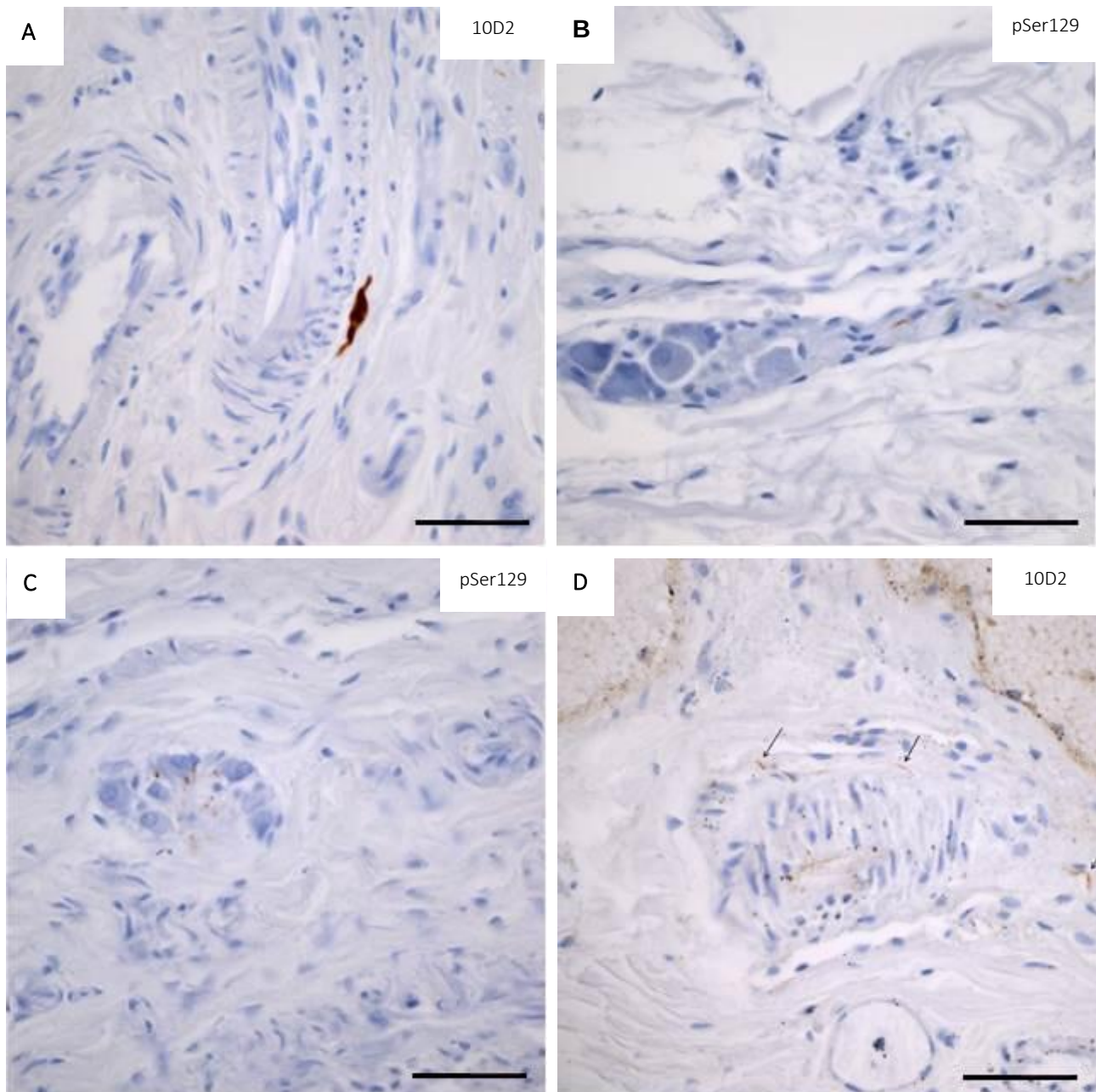


Abbildung 22: Lewy-Pathologie findet sich in der Immunhistochemie vereinzelt auch in Kontrollfällen. 400-fache Vergrößerung (Balken je 50 µm). **A** Gefäßnaher LN mit typischen Auftreibungen in der Submukosa des Jejunums (PSP4; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung). **B** Ein LN entspringt dem Plexus myentericus im Duodenum eines Patienten multiplen Hirninfarkten (HI1; pSer129 mk 1:10.000 ohne Vorbehandlung). **C** Transversal angeschnittene LN im Plexus submucosus (Selbes Präparat wie in A). **D** Neben Formalinpigment finden sich fragliche Lewy-Neuriten (Pfeile) in einem submukösen Nerven des Kolons (CBD3; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung).

Auch viele Strukturen der Kontrollgruppe erfüllten ein bis zwei der vordefinierten Positivkriterien, hatten also z. B. eine tiefbraune Färbung und typische Morphologie, jedoch eine unplausible Lokalisation und konnten somit als Artefakt von der Auswertung ausgeschlossen werden. In einigen Kontrollfällen fanden sich jedoch auch Reaktivitätsmuster, welche allen unserer im Voraus definierten Kriterien entsprachen (Abbildung 22). Vergleichsweise häufig waren dabei transversal (Abbildung 22 C), seltener tangential angeschnittene LN (Abbildung 22 A, B, D). LB fanden wir in keinen unserer Kontrollfälle. Die meisten dieser Fälle zeigten keinerlei Immunreaktivität, während einzelne Präparate an mehreren Stellen teils markante Muster (vgl. Abbildung 22 A) aufwiesen. Charakteristische Muster von Artefakten zu unterscheiden, war teils sehr schwierig, wie die in Abbildung 22 D gezeigten Nerven mit Formalin-Überlagerung und fraglichen neuritischen Strukturen (Pfeile) zeigen. Protokollspezifische Unterschiede ergaben sich hierbei nicht (vgl. Abbildung 22).

Insgesamt fanden sich in den verschiedenen Abschnitten des GIT die gleichen Muster wieder, die zuvor bereits in einer initialen Durchsicht der gastrischen Präparate entdeckt wurden. In Serienschnitten zum unmittelbaren Vergleich der Protokolle zeigten sich alle von diesen qualitativ und morphologisch ähnlich. Eine Ausnahme war lediglich die leicht erhöhte Reaktivität der Myelinscheiden und Zellkörper bei Verwendung des Antikörpers 10D2, was unsere Auswertung jedoch nicht beeinträchtigte. Zwar war die Differenzierung zwischen Artefakt und charakteristischer Reaktivität für einzelne Strukturen in der Diagnosegruppe schwieriger und auch in Kontrollfällen zeigten sich immunreaktive Muster. Jedoch stach die Diagnosegruppe mit einer hohen Dichte und markanten Ausprägung von Lewy-Pathologie hervor – besonders in den DLB-Fällen. Anhand vordefinierter Kriterien konnten wir für die IHC somit mehrere typische α Syn-Muster im GIT unserer Parkinson-, PDD- und DLB-Fälle definieren. Es bleibt zu bedenken, dass diese Muster – in der Immunhistochemie (!) – keine Exklusivität für die α -Synuklein-Aggregationskrankheiten beanspruchen.

6.1.3.2 Artefakte

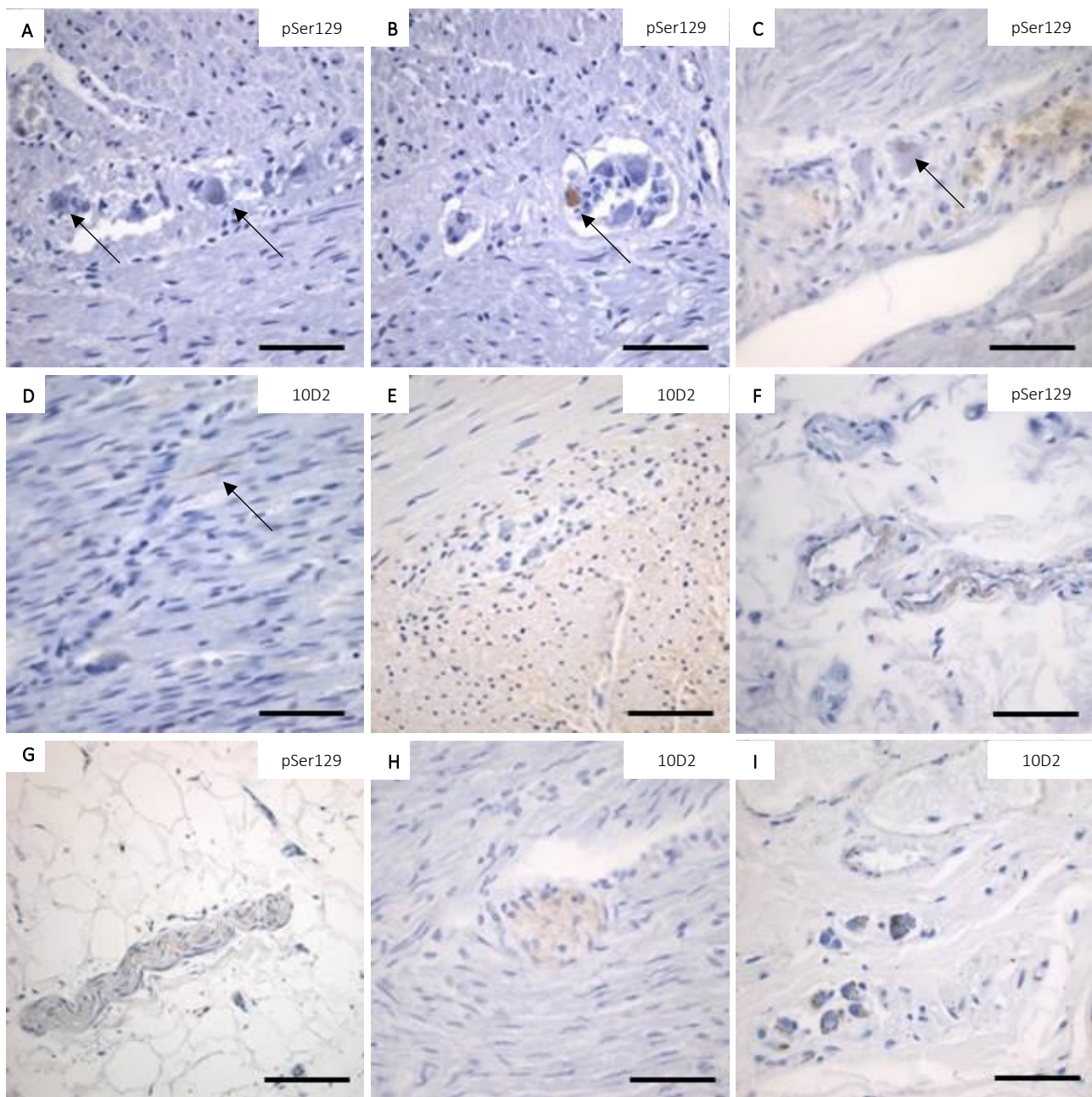


Abbildung 23: Immunhistochemische Artefakte können Merkmale der Lewy-Pathologie imitieren. Teilabbildung G in 200-facher Vergrößerung (Balken 100 µm), übrige 400-fach vergrößert (Balken je 50 µm). **A** Schwach immunreaktive Zellkerne (Pfeile) im Plexus myentericus des Kolons (PSP2; pSer129 mk 1:10.000 ohne Vorbehandlung). **B** Granulär-zytoplasmatische Immunreaktivität (Pfeil) einer Zelle des Plexus myentericus (selbes Präparat wie A). **C** Myelin- (links), Kern- (Pfeil) und Erythrozytenfärbung (rechts) im Plexus myentericus des Magens (PSP2, pSer129 mk 1:10.000 mit PK-Vorbehandlung). **D** Ein granuläres Muster (Pfeil) ähnlich einem LN, jedoch heller und ohne gewundene Morphologie, liegt frei in der Muskularis vor (vPD3; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung). **E** Einzelne hellgelbe extrazelluläre Punkte (oben) und Randartefakt (unten) bei ausgespartem Plexus myentericus des Magens (selbes Präparat wie in D). **F** Färbung der Basalmembranen submuköser Gefäße des Ileums (vPD3, pSer129 mk 1:10:000 ohne Vorbehandlung). **G** Diffuse Immunreaktivität eines tangential angeschnittenen peripheren Nerven in der Subserosa des Magens (HI1; pSer129 mk ohne Vorbehandlung). **H** Ähnliches Muster wie G an einem axial getroffenen Nerv in der Muskularis des Magens (PSP1; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung). **I** Dunkles Pigment an submukösen Gefäßen und in Zellen des Plexus submucosus im Kolon (PD4; 10D2 1:1.000 mit PK-Vorbehandlung).

Neben (Lewy-)Histopathologie fanden sich vielfältige Artefakte in der IHC. Diese Muster wurden vor Beginn der quantitativen Auswertung erfasst und als Negativkriterien systematisiert (Tabelle 21). Artefizielle Strukturen müssen sorgfältig von der Lewy-Pathologie differenziert werden, welche in Farbe (Abbildung 23 A bis I), anatomischer Lokalisation (Abbildung 23 A bis C, G bis I) oder Morphologie (Abbildung 23 B, D, G, I) imitiert werden kann. Folgende Färbemuster fanden sich in Kontrollfällen und Diagnosegruppe gleichermaßen, wichen in wenigstens einem Punkt von unseren Positivkriterien ab und wurden folglich als Artefakt erfasst:

- ❖ Homogene, helle Zytoplasma- oder Kernfärbung, besonders in Ganglienzellen (Abbildung 23 A).
- ❖ Hellgelbe Punkte, extrazellulär und ohne klare anatomische Prädilektion; heller als Lewy-Punkte und axiale LN (ähnlich Abbildung 23 E).
- ❖ Reaktivität der Basalmembran, intramural-vaskuläre Immunreaktivität (Abbildung 23 F).
- ❖ Granuläres Muster in Ganglienzellen (Abbildung 23 B), seltener frei und länglich angeschnitten in der Muskularis oder anderer Lokalisation anzutreffen (Abbildung 23 D).
- ❖ Myelinreaktivität: innerhalb gut definierter Nerven des GIT zeigten sich wiederholt diffuse, zytoplasmatische, hellgelbe Schlieren (Abbildung 23 G und H).
- ❖ Blutzellen: Makrophagen, Granulozyten, Erythrozyten waren in der Mukosa und den Gefäßen schwach bräunlich angefärbt (Abbildung 23 C, rechts).
- ❖ Extrazelluläre Schlieren und Randartefakte: Diffuse oder gleichmäßige, teils hell gepunktete Hintergrundfärbung. Häufig in der Muskularis, ansonsten aber ohne anatomische Prädilektion (prominent in Abbildung 23 E).
- ❖ Immunreaktivität exokriner Drüsen beobachteten wir nur in unseren Vorversuchen unter Verwendung von hoch konzentriertem monoklonalem pSer129 (1:2000).
- ❖ Überlagerungsartefakte stachen aus der Bildebene heraus und waren so leicht identifizierbar.
- ❖ Lufteinschlüsse entstanden gelegentlich im Trocknungsprozess und ließen insbesondere die Zellkerne der Nervenzellen artifiziell dunkel erscheinen, stachen jedoch ebenfalls aus der Bildebene heraus.
- ❖ Diffus verteilte hellgelbe Formalinschlieren und schwarzes Pigment (Abbildung 22 D sowie Abbildung 23 I).

Eine Kernfärbung fand sich insbesondere als Überfärbungsartefakt in höheren Antikörper-Konzentrationen (z. B. in Protokollen mittels monoklonalem pSer129 1:2.000) oder bei längerer Inkubationszeit (> 8-10 Minuten) in Ganglienzellen (Abbildung 23 A und C). Die Reaktivität der Basalmembranen war in manchen Fällen so stark ausgeprägt (Abbildung 23 F), dass Lewy-Neuriten in allen morphologischen Aspekten imitiert wurde. Ein fein-granuläres Muster in Ganglienzellen und seltener frei vorliegend und länglich in der Muskularis kann in der IHC zwar Lewy-Pathologie nachahmen (Abbildung 23 B und D). Jedoch sind diese Muster heller und weniger rund als Lewy-Körperchen (man vergleiche z. B. Abbildung 23 B mit Abbildung 21 A) bzw. weniger gewunden als die Lewy-Neuriten (man vergleiche z. B. Abbildung 23 D mit Abbildung 21 D oder Abbildung 22 A). Luftpfeile über Zellkernen fanden sich in Präparaten, die mit zu wenig Entellan zwischen Objektträger und Deckplättchen eingedeckt wurden (ähnlich Abbildung 23 A, jedoch dunkler). Überfärbungs- und Randartefakte sah man besonders in Präparaten, die im Färbeprozess wenig gespült wurden und dadurch angetrocknet sind, in geringem Maße aber in vielen Präparaten. Diffuse Formalinschlieren und schwarzes Pigment fanden sich regelmäßig und erschwerten bei starker Ausprägung die Auswertung einzelner Regionen der jeweiligen Präparate (Abbildung 22 D und Abbildung 23 I).

Wir fanden in den immunhistochemischen Färbungen somit Strukturen, die allen vorher festgelegten Kriterien der Färbung, anatomischen Zuordnung und Morphologie (siehe auch Tabelle 20 und Tabelle 21 im Kapitel 5.2.5) entsprachen. Selten entdeckten wir auch Immunreaktivität ähnlich Lewy-Pathologie in Kontrollfällen. Insbesondere Farbreaktionen, die neuritischen Strukturen in transversalem und tangentialem Anschnitt entsprachen fanden sich in mehreren Präparaten. Ausgeprägte LB und Nervenzellreaktionen mit Kernaussparung hingegen waren in der Diagnosegruppe zwar sehr selten, jedoch charakteristisch für diese. Daneben zeigten sich vielfältige Muster, die unsere Kriterien nur unvollständig erfüllten und somit zwar teils schwer, jedoch letztlich eindeutig abgrenzbar waren.

6.1.4 Paraffin-Embedded Tissue Blot

Im Vergleich zur IHC fiel im PET Blot sofort die geringere Dichte an Immunreaktivität auf. Gleichzeitig war die anatomische Auflösung physiologischer Strukturen geringer, da der PET Blot keinerlei Gegenfärbung verwendet. Während die Morphologie der immunreaktiven Strukturen (also LB, tangential LN sowie multiple axiale LN und Lewy-Punkte) grundsätzlich ähnlich zu der in der IHC war, fanden sich wesentliche Unterschiede hinsichtlich der beobachteten Artefakte. Genutzt wurden die Antikörper 10D2 und pSer129, wobei letzterer in Vorversuchen in monoklonaler (mk) und polyklonaler (pk) Variante getestet wurde. Anders als in der IHC wurde jedoch im PET Blot nur die polyklonale Variante für die Endversuche verwendet, da sich beim monoklonalen Antikörper auch in Kontrollfällen eine morphologisch von LN nicht unterscheidbare Kreuzreaktivität mit vaskulären Basalmembranen zeigte. Sofern nicht anders angegeben, beziehen sich daher Angaben zu pSer129 im PET Blot stets auf die polyklonale Variante. Farbreaktion und Morphologie der Durchgänge mittels 10D2 und beider getesteter pSer129-Varianten waren insgesamt vergleichbar.

6.1.4.1 Histopathologie

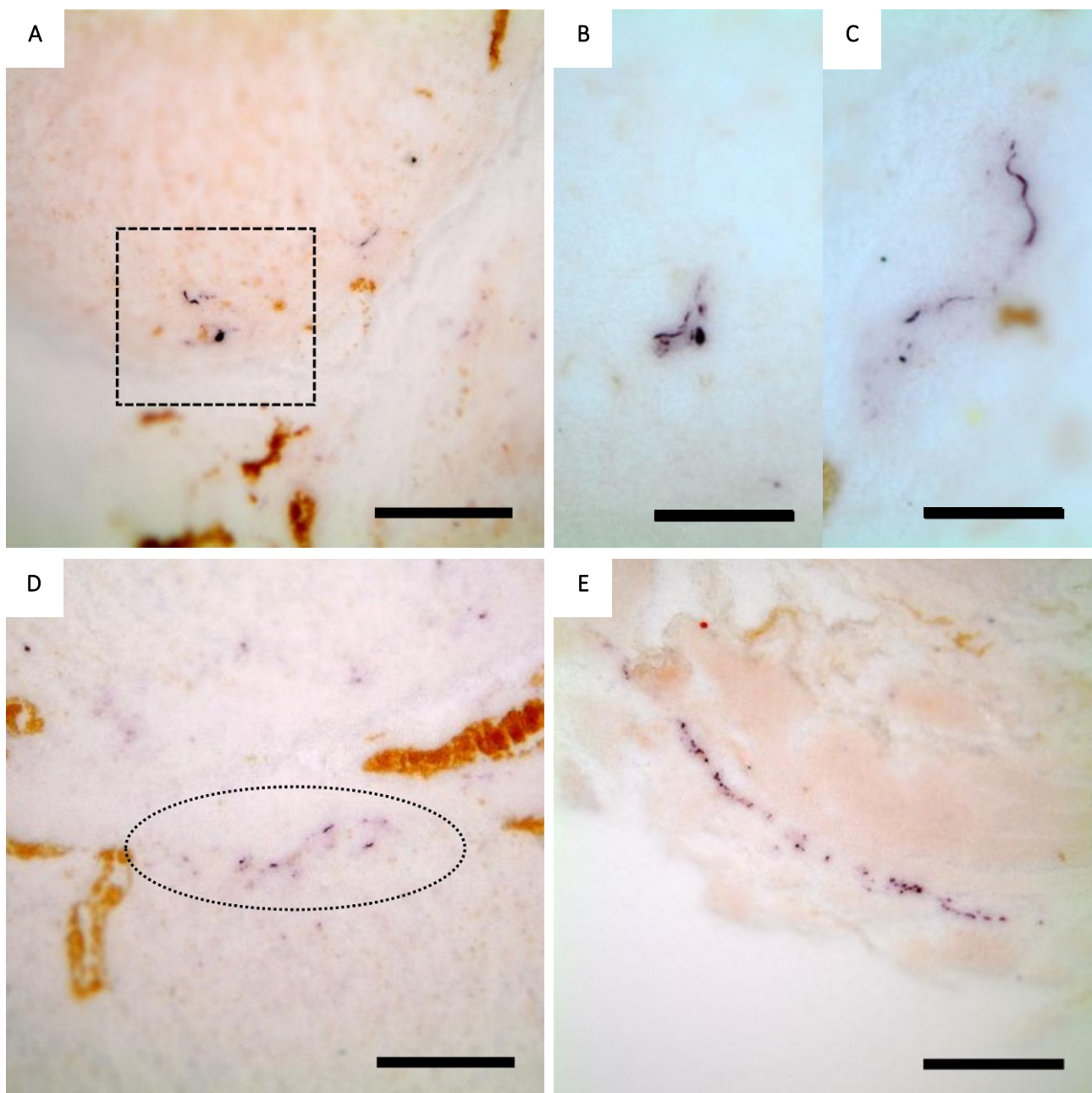


Abbildung 24: Muster der Aggregat-Pathologie in der Diagnosegruppe mittels PET Blot. A, D und E in 100-facher Vergrößerung (Balken je 200 µm), auch B 100-fach; C 200-fach vergrößert (Balken 100 µm). **A** Lewy-Pathologie in Form von LN und einem LB (violett) findet sich in der Muscularis mucosae des Magens. Die Submukosa verläuft unten links nach oben rechts mit Gefäßen (braun), umgeben von Mukosa (oben, unscharf und rechts. PDD3; 10D2 1:5.000). **B** Markante LB und LN in der Submukosa des Magens (DLB5; 10D2 1:5.000). **C** Ein LN liegt in gewundener Form in einem subserösen peripheren Nerven des Ileums (DLB3; pSer129 pk 1:10.000). **D** Immunreaktive Strukturen weisen auf den Plexus submucosus zwischen Gefäßen des Magens hin (PDD3; 10D2 1:5.000). **E** Ein prominent immunreaktiver Plexus myentericus verläuft zwischen Ring- und Längsmuskelschicht am Rande eines Ileum-Präparats (DLB4; 10D2 1:5.000).

Die tangential angeschnittenen LN (Abbildung 24 C) stellten sich als morphologisch verlässlichste Strukturen mittels 10D2 und (polyklonalem) pSer129 gleichermaßen heraus. Zwar waren diese im Vergleich zur IHC seltener, jedoch fanden sie sich in fast keinen Kontrollfällen. Ausgeprägte LB waren wie auch in der IHC selten. Die Exemplare in unserer Studie besaßen eine homogene tiefviolette Farbe und einen hellvioletten Hof, waren

leicht entrundet und am ehesten im Bereich der Submukosa anzutreffen (Abbildung 24 A und B). Der Plexus myentericus konnte gut aufgefunden werden und war leicht von seiner Umgebung abzugrenzen, da praktisch keine potentiell konfundierenden Strukturen in der Nähe lagen (Abbildung 24 E und Abbildung 26). In der Submukosa hingegen gab es zwar eine vergleichbare Dichte an Aggregat-Pathologie – insbesondere perivaskulär (Abbildung 25) – jedoch fand sich nur selten ein so klar abgrenzbarer Plexus submucosus wie in Abbildung 24 D. Aufgrund der mäßigen anatomischen Auflösung im PET Blot konnten axiale LN und Lewy-Punkte faktisch nicht voneinander unterschieden werden. Wie auch in der IHC befand sich ein relevanter Anteil an Immunreaktivität in Form von LN und LB auch im Bereich der Muskularis mucosae.

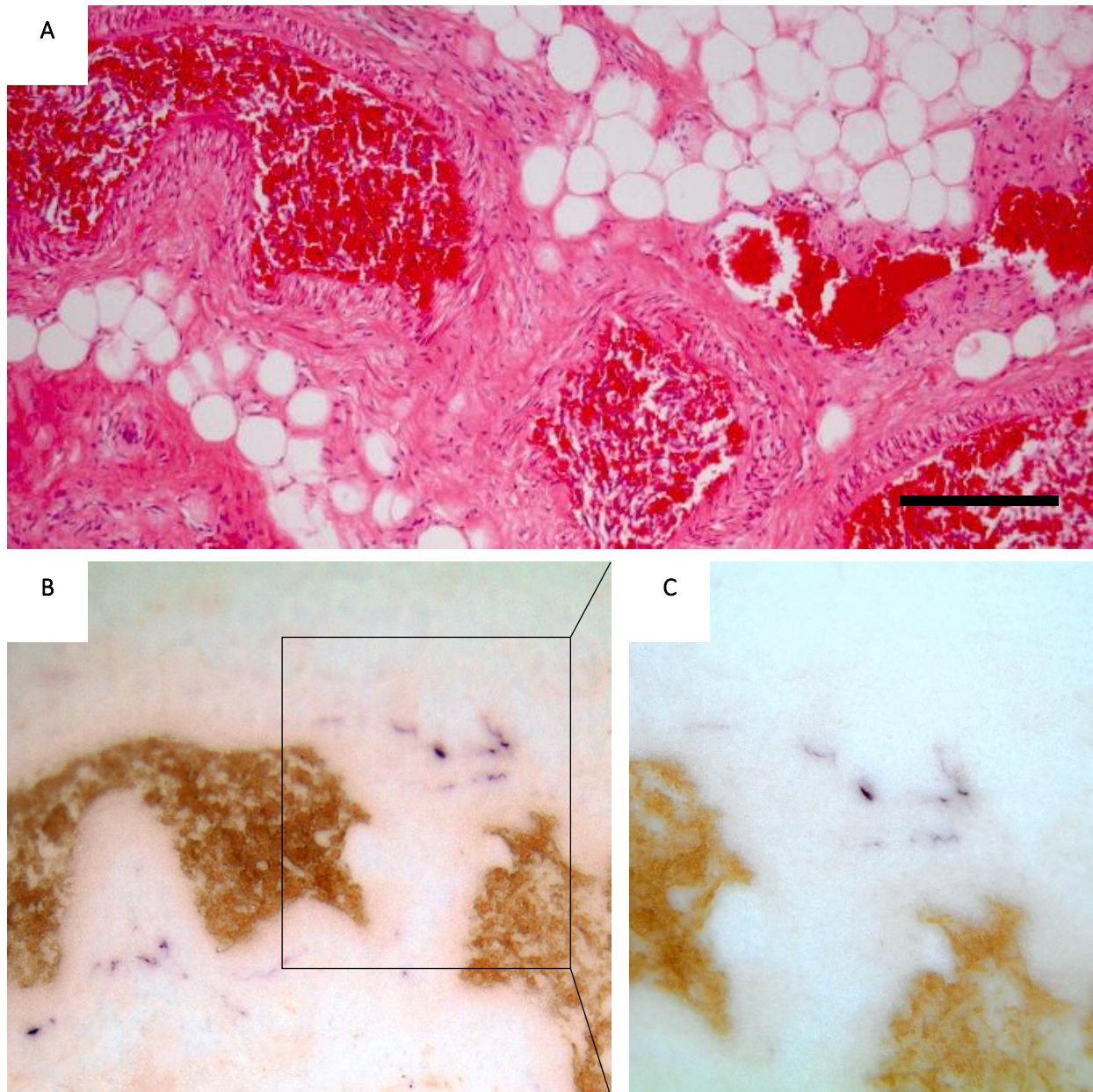


Abbildung 25: Die Aggregat-Pathologie in Form von Lewy-Neuriten fand sich am häufigsten perivaskulär. Submukosa des Magens, DLB5. **A** Zwei Gefäße der Submukosa dominieren den Bildausschnitt des H.-E.-Präparats (100-fache Vergrößerung; Balken 50 µm). **B** PET-Blot-Färbung via 10D2 1:5.000 auf gleicher Höhe. Es sind Ansammlungen tangential und axial angeschnittener Lewy-Neuriten (oben und links-unten) zu sehen (Vergrößerung wie in A). **C** Detailaufnahme geschlängelter Lewy-Neuriten aus B (200-fache Vergrößerung).

Im Folgenden sind die Färbemuster der Antikörper 10D2 und pSer129 pk aufgelistet, die vorwiegend in der Diagnosegruppe zu finden waren und den im Voraus bestimmten Kriterien korrekter Färbung, anatomischer Zuordnung und Morphologie entsprachen:

- **Lewy-Körperchen:** Größere dunkel-violette Punkte mit hell-violetter „Schatten“ oder „Hof“, annähernd der Größe von LB in der IHC oder etwas kleiner, mit homogener Farbgebung und leicht entrundeter Form. Anatomische Nähe zu Ganglien und Neuriten – teils in diese auslaufend, teils umgeben von punktförmiger Reaktivität. Sehr selten und am ehesten in den Plexus submucosus et myentericus gelegen, möglicherweise auch in der Muscularis mucosae (Abbildung 24 A und B).
- **Tangential angeschnittene Lewy-Neuriten:** Länglich-gewundene, oft diskontinuierliche und teils kegelförmig auslaufende Strukturen mit dunkel-violetter Farbe und hell-violett gefärbtem perineuritischen Gewebe (hell-violetter „Schatten“). Meist mit anatomischem Bezug zu Plexusgewebe oder in der Muscularis mucosae. Häufig perivaskulär, seltener frei vorliegend. Ähnlich den immunhistochemischen LN und auch in geringer Vergrößerung leicht zu erkennen (Abbildung 24 B und C sowie Abbildung 25 B und C).
- **Lewy-Punkte und axial angeschnittene Lewy-Neuriten:** Zusammenlagerung dunkel-violetter Punkte, häufig mit hell-violetter „Schatten“ oder „Hof“. Perivaskulär oder mit anatomischem Bezug zu neuronalen Strukturen der Darmplexus. Lewy-Punkte und -Neuriten lassen sich aufgrund der nur moderaten anatomischen Auflösung im PET Blot auch unter Zuhilfenahme von H.-E.-Färbung kaum voneinander abgrenzen (Abbildung 24 E und Abbildung 25 B).

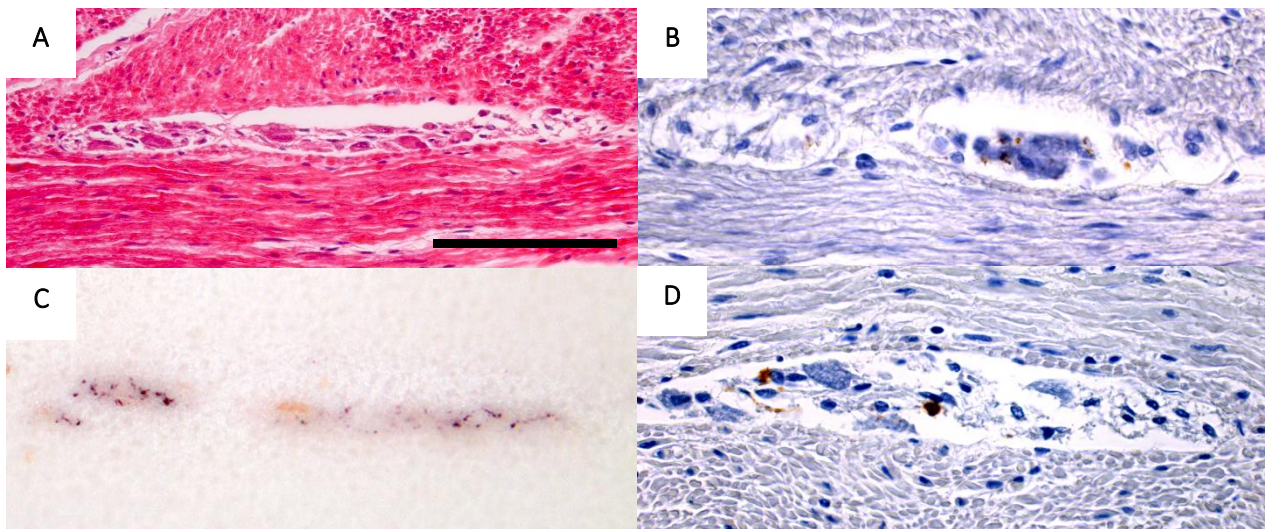


Abbildung 26: Die Immunreaktivität des Plexus myentericus war in allen Protokollen leicht auszumachen. Gegenüberstellung der Techniken H.-E., PET Blot und IHC. Kolon-Präparat des Falls DLB2, 400-fache Vergrößerung (Balken entspricht 50 μ m). **A** Bereits anhand der H.-E.-Färbung lassen sich die einzelnen Ganglienzellen des Plexus myentericus zwischen Ring- und Längsmuskelschicht gut abgrenzen. **B** In der IHC mit PK-Vorbehandlung finden sich einzelne immunreaktive Punkte (pSer129 mk 1:10.000). **C** Im PET Blot lässt sich die Morphologie des Ganglions nur noch anhand der Aggregat-Pathologie erkennen (pSer129 pk 1:10.000). **D** In einem Versuch ohne PK-Vorbehandlung zeigt sich in diesem Fall eine stärker ausgeprägte Immunreaktivität für phosphoryliertes α -Synuklein (pSer129 mk 1:10.000).

Anatomische Landmarken wie Gefäße (Abbildung 24 A und D sowie Abbildung 25) und Präparatränder (Abbildung 24 E) sowie auch ergänzende H.-E.-Präparate aus einer idealerweise wenige μm entfernten Schnittebene (Abbildung 25 A und Abbildung 26 A) waren wichtige Werkzeuge zur Befundung der Präparate im PET Blot. Sie dienten einerseits der Orientierung innerhalb eines mittels PET Blot gefärbten Präparates und andererseits beim Auffinden gleicher Strukturen in unterschiedlichen Protokollen (z. B. im Vergleich zwischen PET Blot und IHC, siehe Abbildung 26). Nicht zuletzt fanden sich auch die charakteristischen LN häufig nahe der als Landmarken nützlichen Gefäße der Submukosa (Abbildung 25) und Muskularis.

Zusammenfassend fanden sich im PET Blot in Morphologie und Anatomie der IHC analoge Strukturen, wenngleich in geringerer Dichte. Im Gegensatz zur Immunreaktivität in der IHC war die Aggregat-Pathologie im PET Blot von einem dunkel-violetten Farbton und einer hell-violetten Begleitreaktion des umliegenden Gewebes geprägt. Eine Unterscheidung zwischen intrazellulären Lewy-Punkten und axial angeschnittenen neuritischen Strukturen, wie wir sie in der IHC vorgenommen hatten, war aufgrund der geringeren anatomischen Auflösung nicht zuverlässig möglich. Verlässliche – da fast ausschließlich in der Diagnosegruppe auffindbare – Strukturen waren die tangential angeschnittenen, häufig perivaskulären Neuriten. Die Orientierung an Landmarken wie Gefäßen und natürlichen wie auch artefiziellen Präparaträndern erleichtert die Auswertung.

6.1.4.2 Artefakte

Hinsichtlich der Artefakte unterschieden sich die Antikörper 10D2 und pSer129 stärker. So fand sich besonders in muskulären und stark bindegewebshaltigen Abschnitten als typisches Artefakt des Antikörpers pSer129 in monoklonaler Variante ein „flusenartiges“ Muster diffuser Immunreaktivität (Abbildung 28). Dieses Muster war von Lewy-Neuriten hinsichtlich Färbequalität, Anatomie und Morphologie nicht hinreichend distinkt, weshalb wir für unsere Endversuche mittels PET Blot auf die polyklonale Variante des Antikörpers umstiegen, die besagte Artefakte bei gleicher Färbequalität nicht aufwies.

Es fanden sich diverse weitere für den PET Blot charakteristische Artefakte: Wir sahen diffuse hell-violette Schlieren, die durch Neuansetzen der Versuchslösungen und Einlage der Materialien in Natriumhydroxid in Folgeversuchen verschwanden. Seltener waren nach fehlerhafter Entparaffinierung braune Artefakte auf den Membranen erkennbar. Auch eine Wellung (erkennbar als Unschärfe in Abbildung 24 A und Abbildung 27 D) sahen wir in bindegewebsreichen enterischen Proben, jedoch nie in kortikalen Positivkontrollen. Bereits während der Entparaffinierung begann das gastrointestinale Gewebe, die Blot-Membranen zusammenzuziehen. Dieser Effekt konnte durch Beschweren der Präparate nachträglich nur partiell gemindert werden. Die Wellung der Membranen stellte letztlich selbst in starker Ausprägung kein größeres Hindernis für die Auswertung dar.

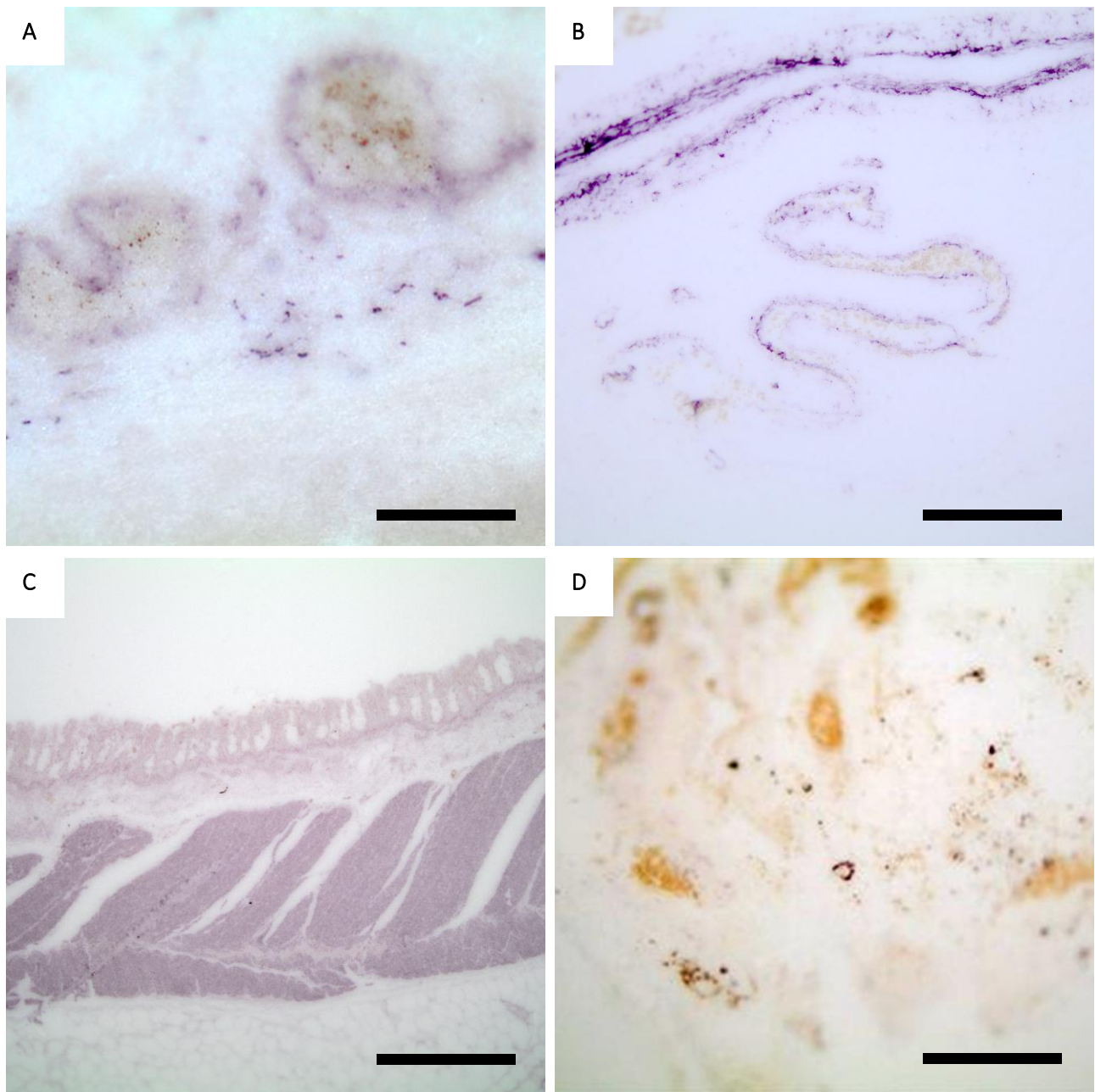


Abbildung 27: Artefakte im PET Blot können je nach Ausprägung die Auswertung erleichtern oder erschweren. 50-fache (C; Balken 400 μm), 100-fache (B und D; Balken je 200 μm) bzw. 200-fache Vergrößerung (A; Balken 100 μm). **A** Die „flusenartige“ Reaktivität an der Grenze zwischen Muskularis (unten) und Submukosa (oben) neben zwei submukösen Gefäßen des Ileums ist im PET Blot von immunreaktivem Plexusgewebe (vgl. auch Abbildung 24 D) nicht unterscheidbar (ALS1, pSer129 mk 1:10.000). **B** Intensive violette Basalmembran-reaktivität im Magen eines Kontrollfalls ist nicht mehr abgrenzbar von perivaskulären Lewy-Neuriten (AD1; pSer129 mk 1:10.000). **C** Während schwache Überfärbungsartefakte die Anatomie besser darstellen, führt eine zu starke Reaktion (hier: im Magen) zum Kontrastverlust zwischen physiologischem Gewebe und Immunreaktivität (PD2; LB509 1:2.000). **D** Gelbe Formalinschlieren und schwarzes Pigment erschweren die Suche nach Immunreaktivität, ist jedoch selbst nicht mit dieser verwechselbar. Eine Unschärfe (oben links) entsteht durch Wellung des Duodenum-Präparates (DLB5; pSer129 pk 1:10.000).

Die folgenden Färbemuster fanden sich im PET Blot via Antikörper 10D2 und pSer129 in Kontrollfällen und Diagnosegruppe gleichermaßen und unterschieden sich in wenigstens einem Punkt von unseren Positivkriterien. Sie wurden als Artefakt beschrieben und als Negativkriterien (Tabelle 23) systematisiert:

- Solitäre dunkel-violette bis schwarze Punkte mit violetter „Schatten“. Morphologisch identisch zu einzeln gelegenen, axial angeschnittenen LN und potentiell ubiquitär anzutreffen.
- Längliche oder punktförmige, tief-violette oder schwarze Strukturen ohne violetten „Schatten“.
- Zartviolette bis grobkörnig-gepunktete Formazan-Reaktion der Basalmembran (vgl. Abbildung 27 B).
- „Flusenartige“ Immunreaktivität mit violetten Punkten und leichter Hintergrundreaktion (Nur mittels pSer129 mk; Abbildung 27 A).
- Hell-violette, diffuse und recht gleichmäßige Färbung. Anatomischer Bezug zu Randbereichen des Präparates („Randartefakt“); besonders stark in Mukosa und Muskularis (Abbildung 27 C).
- Tiefschwarze bizarre, teils geometrische oder punkartige Formen ohne anatomischen Bezug.
- Violette, rötliche oder cyanblaue Farbpräzipitate ohne anatomischen Bezug. Die peripheren Anteile dieser Artefakte waren häufig stärker angefärbt als das Zentrum.
- Bräunliche Anfärbung von Erythrozyten (Abbildung 25 B und C sowie Abbildung 27 A).
- Konkrementfärbung im Darmlumen: meist bräunlich, selten mit violetten Elementen.
- Hellbraune flächige oder tropfenförmige Überlagerungen („Formalinartefakt“) und dunkelbraune bis schwarze Punkte („Pigment“) abhängig vom Präparat, jedoch ohne anatomische Prädilektion (Abbildung 27 D) und in der IHC identisch auffindbar.

Die solitär vorliegenden dunkel-violetten Punkte mit hell-violetter Hof ähneln zwar grundsätzlich axial angeschnittenen Axonen, finden sich jedoch in Diagnose- und Kontrollgruppe gleichermaßen einzeln vorliegend in der Mukosa wie auch Submukosa und Muskularis ohne klare anatomische Begrenztheit. Da wir uns somit nicht auf anatomische Informationen verlassen konnten, werteten wir nur Zusammenlagerungen aus mehreren immunreaktiven Punkten als immunreaktiv im Sinne unserer Positivkriterien. Ein besonders häufiges und die Auswertung relevant beeinträchtigendes Artefakt war die Reaktivität der Basalmembranen (Abbildung 27 A und B). Insbesondere in hoher Primär- oder Sekundärantikörper-Konzentration sowie unter monoklonalem Antikörper pSer129 kam es zur markanten Kreuzreaktion, die nicht mehr sicher von gefäßnahen LN oder anderer Aggregat-Pathologie abzugrenzen war. Randartefakte waren in der Regel kein Hindernis für die Auswertung, da diese bei dem nur in den Vorversuchen getesteten Antikörper LB509 in relevantem Umfang auftraten. In allen Fällen unserer Endversuche konnten ausreichend Loci im Präparat ohne Rand- und Überfärbungsartefakte gefunden werden und teilweise war eine leichte „Überfärbung“ der Auswertung zuträglich, da anatomische Landmarken so eine bessere Auflösung erfuhren. Formalinartefakte (Abbildung 27 D) schließlich waren ein geringeres Problem für die Auswertung als in der IHC-Technik, da sich die violette Formazanreaktion vom gelben Formalin und schwarzen Pigment unterschied.

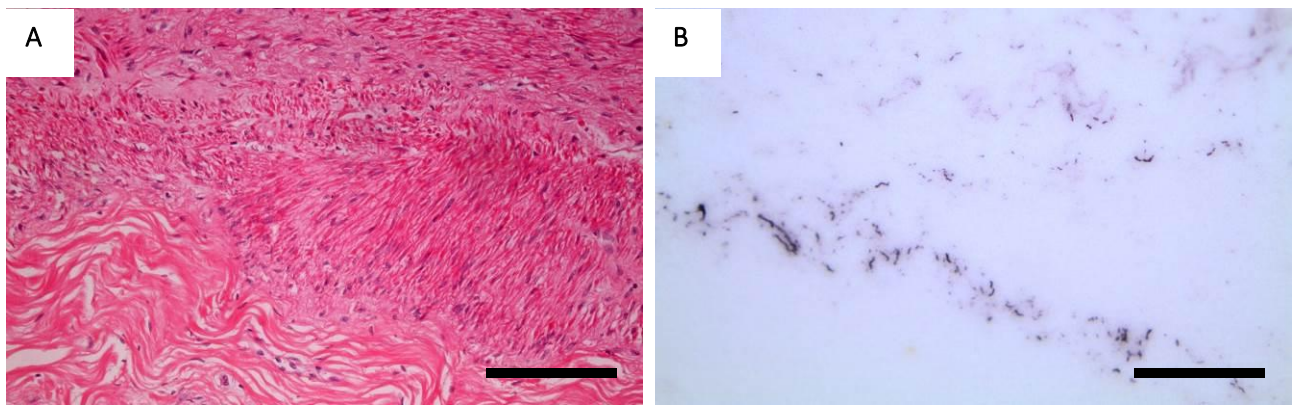


Abbildung 28: „Flusenartige“ Artefakte in den mittels monoklonaler Variante von pSer129 gefärbten Präparaten wiesen anatomischen Bezug zu Bindegewebsstraßen der Muskularis auf. Magen -Präparat des Falles AD1; 200-fache Vergrößerung (Balken je 100 µm). Links: H.-E-Färbung. Rechts: PET-Blot-Protokoll mittels pSer129 mk 1:10.000.

Eine „flusenartige“ Immunreaktivität mit Punkten und gewundenen Linien vor violetterm Hintergrund, teils über die gesamte Muskularis, aber auch in der Submukosa, zeigte sich ausschließlich bei Versuchen mittels monoklonaler Variante des Antikörpers pSer129. Bezüglich Morphologie, Farbgebung und Lokalisation war dieses Artefakt nicht von Ansammlungen von Lewy-Neuriten zu unterscheiden, fand sich jedoch in Diagnose- und Kontrollfällen gleichermaßen (Abbildung 27 A und Abbildung 28).

Wir sahen im PET Blot somit insgesamt eine mit der IHC vergleichbare Morphologie immunreaktiver Strukturen mit jedoch relevanten Unterschieden hinsichtlich der Artefakte. Dies führte zum Ausschluss des Antikörpers LB509 aus der Studie und pSer129 in monoklonaler Variante aus den Versuchen mittels PET Blot. Einerseits war das gelbe Formalinartefakt ein geringeres Hindernis als in der IHC und eine schwache Überfärbung physiologischer Strukturen konnte sich sogar positiv auf die Beurteilbarkeit der Präparate auswirken. Andererseits führten insbesondere das flusenartige Artefakt in Bindegewebsstraßen und eine grobkörnige Färbung der Basalmembranen zur Unbrauchbarkeit desjenigen Präparates, in dem sich diese Muster fanden. Diverse hier nicht ausführlich diskutierte Muster, z. B. Farbflecken und bizarr formierte Pigmentablagerungen, können angetroffen werden, gefährden die Auswertung jedoch nicht.

6.2 Quantitative Auswertung

Zur Ermittlung geeigneter Tests für die schließende Statistik erfolgte vorab eine Testung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Die Anzahl immunreaktiver Gesichtsfelder pro 10 HPF war dabei für keines der unserer Protokolle normalverteilt (Tabelle 26). Die geeigneten statistischen Tests auf statistische Signifikanz waren demnach je nach Fragestellung: (I) der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für verbundene Variablen, (II) der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Variablen sowie (III) der Friedman-Test für Mehr-Stichproben-Tests.

Tabelle 26: Die Werte für Immunreaktivität waren nicht normalverteilt. Diagnosegruppe (n = 20). Darstellung der Ergebnisse des Shapiro-Wilk-Tests nach Protokoll. Basis der Analyse waren die kumulierten Gesichtsfelder pro insgesamt 20 HPF (10 aus jeweils Submukosa und Muskularis).

Test auf Normalverteilung				
Protokoll				Shapiro-Wilk-Test
Vorbehandlung	Auswertung	Methode	Antikörper	Signifikanz
Keine	10 HPF	IHC	pSer129	0,029
Proteinase K			10D2	<,001
			pSer129	0,023
		PET Blot	10D2	<,001
			pSer129	<,001
Whole-slide			10D2	<,001
	pSer129	<,001		

Um einen Überblick über die Diagnose- und Kontrollgruppe zu erhalten und diese hinsichtlich epidemiologischer Gesichtspunkte näher einordnen zu können, wurde nun eine Analyse statistischer Eckdaten angeschlossen (siehe schon Tabelle 3, Kapitel 5.1.2). Unterschiede zwischen Diagnose- und Kontrollgruppe fanden sich hinsichtlich der Anzahl der Präparate sowie dem durchschnittlichen Zeitraum zwischen Diagnose und Tod. Beide Werte fielen in der Diagnosegruppe höher aus. Es fand sich auch ein Unterschied im Alter zum Diagnosezeitpunkt, welches in der Kontrollgruppe etwa vier Jahre höher war. Ähnlichkeiten fanden sich im Verhältnis der männlichen zu weiblichen Fällen sowie im Altersmedian und mittleren Alter der Fälle zum Todeszeitpunkt. Die Standardabweichung, welche für das mittlere Alter, das Alter zum Diagnosezeitpunkt und den Zeitraum von Diagnose bis Tod in Jahren berechnet wurde, war in allen Fällen höher in der Diagnosegruppe.

6.2.1 Bestimmung des α -Synuklein-Gradienten

Zunächst wurde nun erarbeitet, welche Abschnitte des GIT die höchste Immunreaktivität aufweisen, um für folgende Analysen vielversprechende Subgruppen auswählen zu können und die Frage zu untersuchen, welche Organe aufgrund hoher Dichte an Immunreaktivität vielversprechende Ziele zur Biopsiediagnostik darstellen könnten. Da pro Fall ein bis acht verschiedene Organabschnitte des GIT vorlagen (Details siehe Tabelle 55 und Tabelle 56 im Anhang), wurden zunächst die Mittelwerte der immunreaktiven Gesichtsfelder pro 10 HPF (die jeweilige „Immunreaktivitätsdichte“) je Organ und Protokoll berechnet. Dies sollte verhindern, dass die

heterogene Anzahl an Proben (z. B. wenige Ösophagi, viele Magen-Präparate) die Auswertung zu stark beeinträchtigt. Diese Berechnung wurde in einem ersten Schritt aufgeschlüsselt nach Protokoll für Diagnose- und Kontrollgruppe durchgeführt (Abbildung 29), dann in einem zweiten Schritt vergleichend zwischen Submukosa und Muskularis (Abbildung 30).

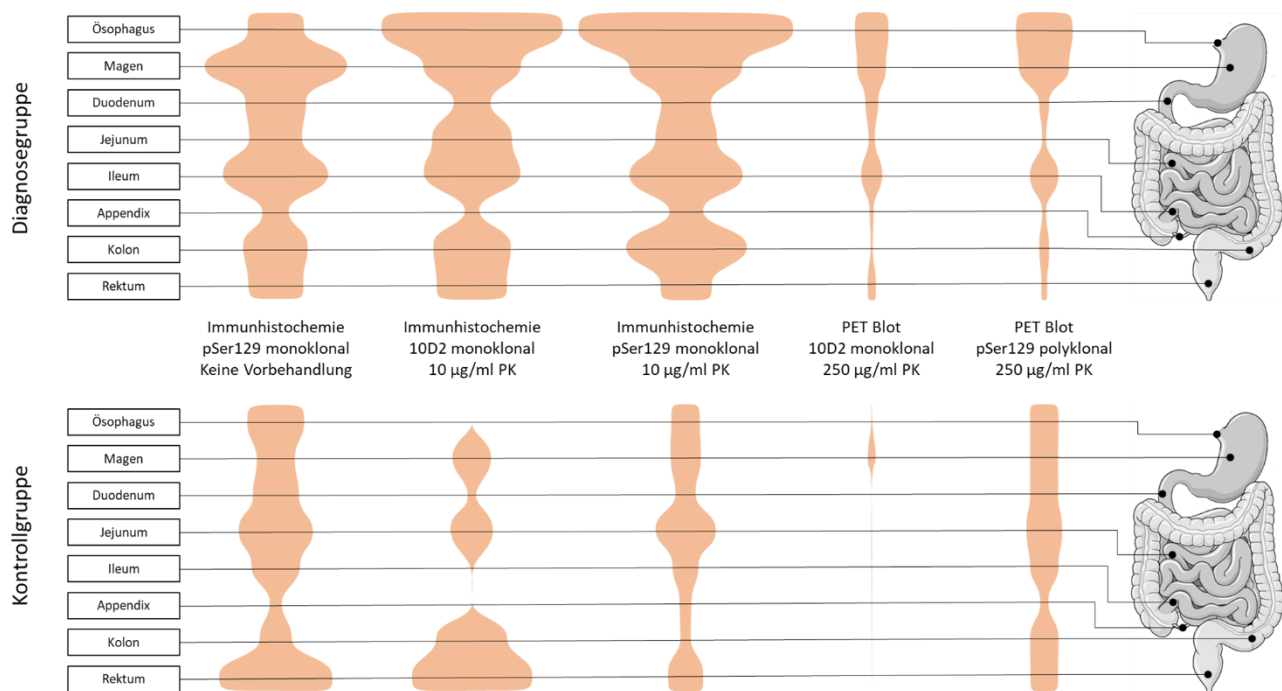


Abbildung 29: α -Synuklein-Verteilungsdichte, aufgeschlüsselt nach Protokoll und Organabschnitt: non-lineares Muster in der IHC und im PET Blot und wesentliche Unterschiede zwischen Diagnose- und Kontrollgruppe. Die relative Breite der Figuren entspricht den Mittelwerten immunreaktiver Gesichtsfelder je Organ und Protokoll (Detailwerte im Anhang in Tabelle 49 und Tabelle 50). Grundlage des Vergleichs bildeten je 20 Gesichtsfelder (10 in jeweils Submukosa und Muskularis) pro Präparat. Im Falle der Ösophagus-Präparate sei auf mögliche Verzerrungen durch die geringe Zahl der Präparate hingewiesen. Die rechtsstehende Grafik dient der Orientierung und stellt nicht den exakten Entnahmeort der Proben dar (Modifiziert nach Servier Medical Art templates, Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

Die Auswertung der immunreaktiven Gesichtsfelder pro 10 HPF in unterschiedlichen Abschnitten des GIT ergab in allen Protokollen ein non-lineares und mehrgipfeliges Muster (Abbildung 29). In der Diagnosegruppe erreichten Ösophagus, Magen und Ileum jeweils die höchste Dichte an Immunreaktivität (Details im Anhang in Tabelle 49). Dies wurde jedoch einerseits durch sehr hohe – stark protokollabhängige – Werte des Ösophagus relativiert. Andererseits erreichte in unserem IHC-Protokoll mittels pSer129 und PK-Vorbehandlung das Kolon eine höhere Dichte an Immunreaktivität als Magen und Ileum. Eine besonders geringe Immunreaktivitätsdichte innerhalb der Diagnosegruppe zeigte sich je nach Protokoll in der Appendix und dem Rektum. Mittlere Positionen nahmen Jejunum, Kolon und Duodenum ein. Diese zunächst in der IHC beobachteten Muster hielten der Kontrolle für Aggregate im PET Blot stand: auch hier zeigten sich – ausgehend von der Whole-slide-Evaluation – ein Muster mit hoher Immunreaktivität im Magen und Ileum sowie – erneut protokollabhängig – im Ösophagus bei intermediärer Dichte in Jejunum, Kolon und Duodenum; am wenigsten in Rektum und Appendix. Das Reaktivitätsniveau im Vergleich zwischen den Methoden war höher in der IHC als im PET Blot: Im Vergleich der via 10D2 gefärbten und mittels 10 High-power fields (HPF) ausgewerteten Protokolle erreichte z. B. Magen und Ileum eine je ca. 4-5-fach höhere Immunreaktivität in der IHC. Auch war

pSer129 in Diagnose- und Kontrollgruppe, IHC und PET Blot gleichermaßen stärker immunreaktiv.

In der Kontrollgruppe (Tabelle 50) war das Verteilungsmuster diffuser und ging mit einer wesentlich geringeren Gesamtzahl positiver relativer Gesichtsfelder pro 10 HPF einher. So fand sich z. B. in der IHC mittels 10D2 und PK-Vorbehandlung für den Magen ein etwa 3-fach höherer Mittelwert in der Diagnosegruppe im Vergleich zu Kontrollen. Via PET Blot fand sich – für den gleichen Organabschnitt und gleichen Antikörper – eine etwa 20-fach höhere Immunreaktivität im Vergleich zu Kontrollen. Das Verteilungsmuster selbst war uneindeutiger und wesentlich stärker protokollabhängig: Während in der IHC via pSer129 und PK-Vorbehandlung das Jejunum den bei weitem höchsten Mittelwert an Immunreaktivität aufwies, war in 10D2 das Jejunum im Mittelfeld mit nur einem Drittel der Immunreaktivität der Rektum-Präparate. Unter den IHC-Protokollen landeten je nach Protokoll Magen, Ileum, Ösophagus und Duodenum in intermediärer Stellung, Appendix und Kolon wiesen tendenziell die geringste Immunreaktivität auf. In den PET-Blot-Protokollen der Kontrollgruppe fiel ein außerordentlich geringes Immunreaktivitätsniveau auf: In der Immundetektion mittels pSer129 fand sich nur im Jejunum und in der Appendix jedwede Immunreaktivität. Mittels 10D2 zeigte sich die Immunreaktivität ausschließlich im Magen und auch dort nur äußerst wenig. Das Verteilungsmuster im PET Blot in Whole-slide-Evaluation war ausgesprochen diffus. Tendenziell fand sich eine höhere Dichte an Immunreaktivität in Jejunum und Appendix, weniger in Ileum und Magen, kaum in Ösophagus, Duodenum, Kolon und Rektum.

Insgesamt ließ sich somit in unserer Diagnosegruppe auch nach Kontrolle für Aggregate und Phosphorylierungsstatus ein mehrgipfeliges Muster mit hoher Immunreaktivität für α Syn in Magen und Ileum, teils auch Ösophagus und Kolon, finden. Weniger reaktive Strukturen fanden sich in den dazwischenliegenden Darmanteilen und sehr wenig in Rektum und Appendix. Kontrollfälle wiesen in der IHC zwar in verschiedenen Organabschnitten des GIT Immunreaktivität auf, jedoch war das Verteilungsmuster erheblich diffuser. In einem Protokoll via 10D2 unter Auswertung von 10 High-power fields fanden sich in Kontrollfällen fast keine immunreaktiven Strukturen.

Tabelle 27: In einem Ranking der Organabschnitte erzielten Jejunum, Magen und Ileum die vordersten Plätze. Diagnosegruppe (n = 85). Die Methode zur Erhebung ist ausführlich im Methodenteil beschrieben. Die Einzelfalldaten finden sich im Anhang (Tabelle 55 und Tabelle 56).

Ranking auf Einzelfallbasis							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot		Summe	Rang
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields			Whole-slide			
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129		
Jejunum	1	4	2	2	1	10	1
Magen	3	1	3	3	1	11	2
Ileum	2	3	4	1	2	12	3
Kolon	4	4	1	4	3	16	4
Rektum	3	2	5	6	5	21	5
Duodenum	2	5	6	5	4	22	6

Neben der Bestimmung der Immunreaktivitätsdichte im engeren Sinne erstellten wir komplementär ein Ranking auf Einzelfallbasis unter Beachtung der Ko-Reaktivität der Organabschnitte untereinander. Im Wesentlichen bestätigte dieses Ranking unsere bisher erhobenen Ergebnisse: Von den sechs miteinander verglichenen Organabschnitten mit ausreichender Zahl an Präparaten erreichte der Magen zwei Male den ersten Platz und war stets in der vorderen Hälfte des Rankings. Das ebenfalls in unserer bisherigen Auswertung stark immunreaktive Ileum erreichte einmal den ersten und zwei Male den zweiten Platz und fand sich nie auf den letzten beiden Plätzen. Gleichzeitig erreichte das Duodenum, das eine geringe Dichte an Immunreaktivität bewies, auch im Ranking einmal den letzten und zwei Male den vorletzten Platz; gleiches galt für das Rektum. Ein Unterschied zur Dichtebestimmung lag in der Stellung des Jejunums, welches im Ranking zwei Male den ersten und ebenfalls zwei Male den zweiten Platz erreichte, wohingegen es in der vorangegangenen Dichteanalyse nur intermediäres Reaktivitätsniveau aufwies. In der Ranganalyse aller Protokolle erreichte das Jejunum somit noch vor Magen und Ileum den höchsten Rang.

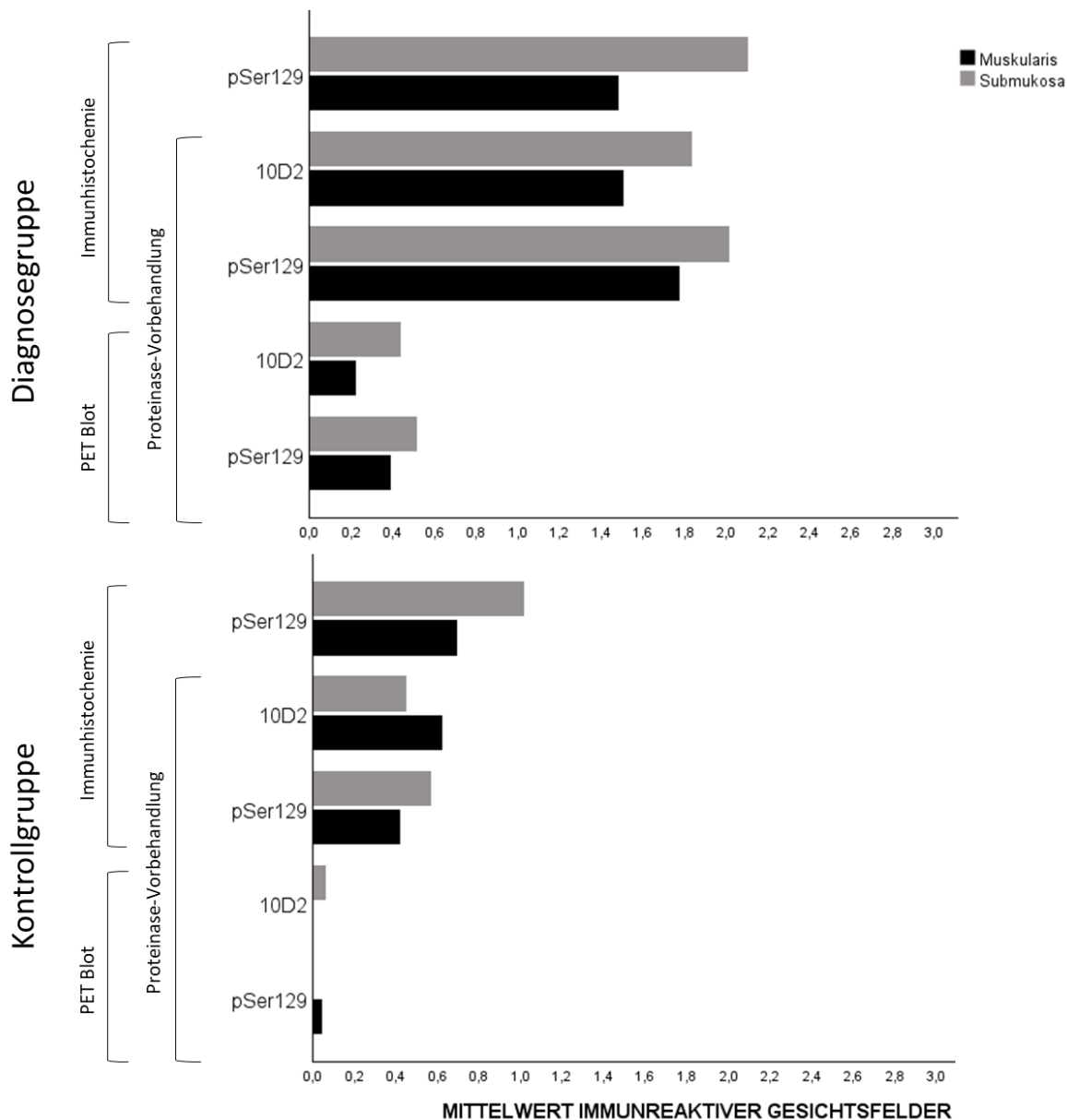


Abbildung 30: Erhöhte Immunreaktivität der Submukosa gegenüber der Muskularis. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder. Diese sind aufgeschlüsselt nach Diagnose- und Kontrollgruppe sowie nach Protokoll für unsere Auswertung von je zehn High-Power-Fields in der Submukosa respektive Muskularis (Für Details siehe Tabelle 51 und Tabelle 52 sowie Tabelle 53 und Tabelle 54).

Schließlich wurde neben dem Gradienten je Organ auch die Immunreaktivität im Vergleich zwischen Submukosa und Muskularis im Sinne eines axial zur enterischen Achse verlaufenden Gradienten bestimmt (Abbildung 30). Hierfür wurden die drei IHC- und zwei PET-Blot-Protokolle in Auswertung der je zehn High-power fields analysiert. Auffällig war in der Diagnosegruppe die unabhängig vom Protokoll stets etwas höhere Immunreaktivität der Submukosa gegenüber der Muskularis, wenngleich ohne statistische Signifikanz (Detailergebnisse hier nicht dargestellt). Die Mittelwerte der Immunreaktivität je Protokoll in der Submukosa und Muskularis lagen insgesamt nah beieinander. Im PET-Blot-Protokoll via 10D2 besaß die Submukosa zwar einen im Vergleich zur Muskularis doppelt so hohen Wert, jedoch ein insgesamt geringes Reaktivitätsniveau verglichen mit anderen Protokollen der Diagnosegruppe. Auch nach Kontrolle für Aggregat-Pathologie und

Phosphorylierungsstatus waren letztlich mehr immunreaktive Gesichtsfelder in der Submukosa zu finden. In der Kontrollgruppe hingegen ergab sich ein heterogenes Bild: Unter den IHC-Protokollen erreichte die Submukosa in den pSer129-Protokollen höhere Werte für Immunreaktivität, im 10D2-Protokoll war es umgekehrt. Mittels PET Blot zeigten sich minime Unterschiede und heterogene Ergebnisse bei gleichzeitig sehr geringem Reaktivitätsniveau.

Zusammenfassend war es uns möglich, Dichtegradienten für α -Synuklein sowohl im Längsschnitt (zwischen einzelnen Abschnitten des GIT) als auch im Querschnitt (zwischen Submukosa und Muskularis) zu bestimmen und ein Ranking der Koreaktivität zu erstellen. Während sich insgesamt ein non-lineares Verteilungsmuster immunreaktiver Strukturen zeigte, stachen Ösophagus, Magen und Ileum mit der höchsten sowie Appendix und Rektum mit der niedrigsten Reaktivität hervor. Das Ranking konnte diese Befunde bestätigen und zeigte außerdem eine besonders häufige Ko-Reaktivität des zwischen Magen und Ileum gelegenen Jejunums bei jedoch auffälliger Aussparung des Duodenums. Entlang der Darmwandschichten konnte ein schwacher Gradient zugunsten der Submukosa nachgewiesen werden. Diese Effekte waren sämtlich größer in der Diagnosegruppe als in der Kontrollgruppe, was mit einem insgesamt höheren Reaktivitätsniveau der Diagnosegruppe einherging.

6.2.2 Einzelfallanalyse

Für die Einzelfallanalyse wurden diejenigen Fälle ausgewählt, welche in mindestens zwei unserer Protokolle zu den Fällen mit der niedrigsten (Tabelle 28) bzw. höchsten (Tabelle 29) Dichte an Immunreaktivität zählten. Dabei zeigte sich, dass Fälle mit besonders niedriger Immunreaktivität auch ein niedriges Braak-Stadium aufwiesen. So hatten zwei von vier dieser Fälle dem Stadium „IV“ nach Braak bzw. „limbisch“ nach McKeith, wobei lediglich drei Fälle der Diagnosegruppe diesem niedrigen Stadium zuzuordnen waren. Auch der dritte Fall mit diesem niedrigen Stadium (hier nicht weiter aufgelistet) zeigte sich in den meisten Protokollen im Mittelwert immunreaktiver Gesichtsfelder immerhin unterdurchschnittlich.

Weiterhin war eine niedrige Immunreaktivität in der Einzelfallanalyse auch assoziiert mit jungem Alter zum Todeszeitpunkt: So waren die beiden jüngsten Fälle unserer Diagnosegruppe PD6 (50 Jahre) und PD7 (57 Jahre) nicht nur diejenigen Fälle mit dem niedrigsten neuropathologischen Stadium, sondern auch als einzige Parkinson-Fälle mit unter 70 Jahren verstorben. Jedoch handelte es sich den Patientenakten zufolge am ehesten um unnatürliche Todesarten und auch der älteste Patient DLB1 (87 Jahre) war in dieser Gruppe mit schwacher Immunreaktivität vorzufinden.

Tabelle 28: Die Fälle mit der niedrigsten Immunreaktivität waren mit niedrigem Braak-Stadium und jungem Alter zum Todeszeitpunkt assoziiert. Dargestellt sind Fälle, die in wenigstens zwei Protokollen zu den am schwächsten immunreaktiven gehörten.

Fall	Geschlecht	Krankheitsdauer	Alter	Todesursache	Stadium
DLB1	Männlich	NA	87	Pneumonie	V/VI (kortikal)
PD2	Männlich	NA	78	NA	V/VI (kortikal)
PD6	Weiblich	5 Jahre	50	Peritonitis	IV (limbisch)
PD7	Männlich	10 Jahre	57	Hirnblutung	IV (limbisch)

Fälle mit besonders starker Immunreaktivität hatten überdurchschnittlich häufig eine DLB-Diagnose und zeigten durchweg Neuropathologie im Endstadium. So fanden sich drei unserer sechs DLB-Patienten unter den Fällen mit höchster Dichte an Immunreaktivität. Allerdings ließ sich bei den restlichen DLB-Fällen kein vergleichbares Muster finden: einer fiel unter diejenigen Fälle mit der niedrigsten Immunreaktivität, während die übrigen sich im Mittelfeld bewegten. Nur einer der Fälle (PDD3) unter denjenigen mit der höchsten Immunreaktivität hatte formal keine DLB-Diagnose (wenngleich wir PDD als Teil des Spektrums werten, vgl. Kapitel 4.1). Dieser Fall wies den längsten Krankheitsverlauf auf (24 Jahre); eine weitere Korrelation zwischen hoher Immunreaktivität und langem Krankheitsverlauf war nicht auszumachen: die Fälle mit dem nächstlängsten Krankheitsverlauf, PD10 (22 Jahre) und PD5 (21 Jahre), waren unabhängig vom Protokoll durchweg im Mittelfeld hinsichtlich ihrer Immunreaktivität zu verorten.

Tabelle 29: Die Fälle mit der höchsten Immunreaktivität waren mit DLB-/PDD-Diagnose, hohem Braak-Stadium und Pneumonie als Todesursache assoziiert. Dargestellt sind Fälle, die in wenigstens zwei Protokollen am stärksten immunreaktiv waren.

Fall	Geschlecht	Krankheitsdauer	Alter	Todesursache	Stadium
DLB3	Weiblich	4 Jahre	59	Pneumonie	V/VI (kortikal)
PDD3	Weiblich	24 Jahre	73	Sepsis	V/VI (kortikal)
DLB4	Weiblich	9 Jahre	82	Pneumonie	V/VI (kortikal)
DLB5	Männlich	5 Jahre	71	Pneumonie	V/VI (kortikal)

Zusammenfassend fand sich in der Einzelfallanalyse eine Assoziation zwischen Immunreaktivität und neuropathologischem Stadium, nicht jedoch zur Länge des Krankheitsverlaufs. Fälle mit besonders hoher Immunreaktivität waren vornehmlich unter den DLB-Fällen.

6.2.3 Korrelationsanalyse

Basierend auf den klinischen Daten und der Anzahl immunreaktiver Gesichtsfelder pro 10 HPF wurde eine Korrelationsanalyse mit Aufschlüsselung nach genutztem Protokoll vorgenommen. Die statistischen Ergebnisse werden im Folgenden tabellarisch aufgeführt. Grafiken (z. B. lineare Regressionen) und Tabellen finden sich im Anhang (siehe Kapitel 8.1 und 8.2). Aufgrund begrenzter klinischer Daten war uns eine Korrelation mit Hoehn-Yahr-Stadium, UPDRS-Wert, MMST und Levodopa-Response nicht möglich. Eine Korrelation der Immunreaktivität mit dem Braak-Stadium unserer Fälle wurde im Rahmen der Einzelfallanalyse bereits diskutiert. Da das Endstadium V/VI stark überrepräsentiert war (17 von 20 Fällen), entschieden wir uns gegen eine weitergehende statistische Analyse diesbezüglich. Insgesamt konnten die Korrelationen zwischen immunreaktiven Gesichtsfeldern und folgenden Parametern näher untersucht werden: (I) Krankheitsdauer (Tabelle 30, Abbildung 33), (II) Alter (Tabelle 31, Abbildung 34) und (III) Demenzdiagnose (Tabelle 32). Außerdem wurden (IV) gastrointestinale Symptome mit Aufschlüsselung nach Obstipation, Dysarthrie und Dysphagie im Vergleich zwischen Diagnose- und Kontrollgruppe dargestellt (Tabelle 33).

Tabelle 30: In den meisten Protokollen zeigte sich keine Korrelation $r > 0,3$ zwischen der Krankheitsdauer und Immunreaktivität. Aufgeführt sind alle Fälle der Diagnosegruppe, bei denen die Krankheitsdauer von Diagnose bis Tod bekannt war ($n = 16$). Berechnung des linearen Zusammenhangs R nach Pearson. Für detaillierte Diagramme siehe auch Abbildung 33 im Anhang.

Korrelation: Krankheitsdauer zum Mittelwert immunreaktiver Felder pro 10 HPF					
Protokoll				Koeffizient	
Vorbehandlung	Auswertung	Methode	Antikörper	r	r²
Keine	10 HPF	IHC	pSer129	0,181	0,033
Proteinase K			10D2	0,612	0,375
			pSer129	0,140	0,020
		PET Blot	10D2	-0,320	0,102
			pSer129	-0,272	0,074
10D2			-0,212	0,045	
Whole-slide		pSer129	-0,325	0,106	

Zunächst wurde die Assoziation zwischen immunreaktiven Gesichtsfeldern und Krankheitsdauer untersucht. Ausreichend Daten für diese Testung waren für 16 unserer Fälle verfügbar. Nun wurden orientierend Dotplots mit linearer Regression und Konfidenzintervall von 95 % für unsere Protokolle erstellt (Abbildung 33) sowie der jeweilige Korrelationskoeffizient r nach Pearson und dessen Bestimmtheitsmaß r^2 berechnet (Tabelle 30). Ein mäßig positiver Korrelationskoeffizient zeigte sich im IHC-Protokoll via 10D2, ein schwach negativer hingegen im PET Blot mittels gleichem Antikörper und keinerlei Korrelation, wenn im PET Blot das ganze Präparat ausgewertet wurde. Für pSer129 fand sich in keinem Protokoll eine Korrelation $r > 0,3$. Das Bestimmtheitsmaß r^2 ergab für das IHC-Protokoll via 10D2 einen schwachen, für alle anderen Protokolle keinen linearen Zusammenhang.

Tabelle 31: Kein Protokoll zeigte eine Korrelation $r > 0,3$ zwischen Alter und Immunreaktivität. Diagnosegruppe (n = 20). Berechnung des linearen Zusammenhangs nach Pearson. Für detaillierte Diagramme siehe auch Abbildung 34 im Anhang.

Korrelation: Alter zum Mittelwert immunreaktiver Felder pro 10 HPF					
Protokoll				Koeffizient	
Vorbehand- lung	Auswer- tung	Me- thode	Antikör- per	r	r²
Keine	10 HPF	IHC	pSer129	0,045	0,002
Proteinase K			10D2	0,097	0,009
			pSer129	0,168	0,028
		PET Blot	10D2	0,031	0,001
			pSer129	-0,212	0,045
			10D2	0,083	0,007
	Whole- slide		pSer129	-0,261	0,068

Für die Bestimmung eines Zusammenhangs zwischen der Immunreaktivität für α Syn und dem Alter der Patienten zum Todeszeitpunkt (Tabelle 31) konnten wir die Daten aller 20 Patienten unserer Diagnosegruppe nutzen. Die Ergebnisse zur Analyse der Krankheitsdauer spiegelten sich dabei auch in dieser Auswertung wider: Kein Protokoll ergab eine Korrelation $r > 0,3$. Das Bestimmtheitsmaß r^2 ergab dementsprechend auch keinerlei Hinweis auf einen linearen Zusammenhang zwischen dem Mittelwert immunreaktiver Gesichtsfelder pro 10 HPF in den getesteten Protokollen und dem Alter der Patienten.

Tabelle 32: Protokollabhängige Korrelation zwischen Immunreaktivität und Demenz. Fälle der Diagnosegruppe, bei denen Informationen über das Auftreten einer Demenz bekannt war (n = 16).

Signifikanztestung: Demenz zu Mittelwert immunreaktiver Felder pro 10 HPF				
Protokoll				Mann-Whitney-U-Test
Vorbehandlung	Auswertung	Methode	Antikörper	
Keine	10 HPF	IHC	pSer129	0,023
Proteinase K			10D2	0,210
			pSer129	0,031
		PET Blot	10D2	0,005
			pSer129	0,003
			10D2	0,055
	Whole-slide		pSer129	0,023

Auch die Korrelation zwischen Immunreaktivität und Demenz, einer häufigen und schwerwiegenden nicht-motorischen Begleitdiagnose, wurde analysiert (Tabelle 32). In unserem Fallkollektiv fanden sich insgesamt 16 Patienten mit klinischen Daten über den Demenzstatus (davon 9 positiv, 7 negativ). Da es sich beim Demenzstatus um eine nominale Variable handelt, wurde anstatt einer linearen Regression der Mann-Whitney-U-Test (Exakte Signifikanz, zweiseitiger Test) verwendet zur Überprüfung der Nullhypothese, dass es keinen Unterschied in der Immunreaktivität zwischen Fällen mit und ohne Demenzdiagnose gibt. Diese Hypothese konnte statistisch hochsignifikant ($p < 0,01$) für die beiden PET-Blot-Protokolle in Auswertung von 10 High-

power fields zurückgewiesen werden. Einfach statistisch signifikant ($p < 0,05$) konnte sie für die beiden IHC-Protokolle und das PET-Blot-Protokoll in Whole-slide-Evaluation via pSer129 zurückgewiesen werden. Knapp statistisch nicht signifikant war das PET-Blot-Protokoll in Whole-slide-Evaluation, statistisch klar nicht signifikant das IHC-Protokoll via 10D2. Somit war das Ausmaß an Immunreaktivität der Protokolle mittels pSer129 sämtlich statistisch signifikant unterschiedlich zwischen Fällen mit und solchen ohne Demenzdiagnose. Beim Antikörper 10D2 hingegen fand sich eine gewisse Heterogenität.

Tabelle 33: Gastrointestinale Symptome fanden sich ähnlich häufig in Diagnose- (n = 9) und Kontrollgruppe (n = 10). Aufführung der laut Patientenakte mindestens einmal klinisch erfassten Symptome.

Symptom	Diagnosegruppe		Kontrollgruppe	
	n	%	n	%
Obstipation	5	25,00%	2	13,33%
Dysarthrie	3	15,00%	7	46,67%
Dysphagie	5	25,00%	8	53,33%

Aufgrund der Relevanz nicht-motorischer Symptome für den Krankheitsverlauf der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten (siehe Kapitel 4.3.1) wurden auch die gastrointestinalen Symptome gesichtet und zwischen Diagnose- und Kontrollgruppe verglichen. Systematisch retrospektiv erhoben wurden die klinischen Daten bezüglich Obstipation, Dysarthrie, Dysphagie und sonstiger gastrointestinaler Symptomatik aus der Krankenakte – meist dem jüngsten Arztbrief – der Patienten (Tabelle 33). Die Gesamtzahl aller erhobenen gastrointestinalen Symptome (inklusive z. B. auch Duodenalulzera und Divertikulitiden) war in der Kontrollgruppe prozentual höher. Unter den neun Patienten der Diagnose- und zehn Patienten der Kontrollgruppe mit dokumentierter gastrointestinaler Symptomatik fanden sich mehr Fälle in der Diagnosegruppe mit Obstipation. In der Kontrollgruppe hingegen zeigten sich jeweils mehr als doppelt so häufig Dysarthrie und Dysphagie. Insgesamt war die klinische Datenlage spärlich, insbesondere hinsichtlich der Angaben zur Obstipation; dies galt auch nach Einbezug indirekter Marker wie abführender Medikation. Demnach ließ sich keine Korrelation hinsichtlich gastrointestinaler Symptomatik im Vergleich zwischen unserer Diagnosegruppe und einer Kontrollgruppe mit neuropathologischen Differenzialdiagnosen feststellen – mit Ausnahme etwas höherer Obstipationsrate der Diagnosefälle.

Zusammenfassend fand sich in der Korrelationsanalyse in einem einzelnen Protokoll unserer Diagnosegruppe eine mäßige Korrelation zwischen Immunreaktivität und Krankheitsdauer und keinerlei Zusammenhang mit dem Alter zum Todeszeitpunkt. In der Analyse eines Zusammenhangs zwischen Reaktivitätsniveau und Demenz zeigten unsere Protokolle via pSer129 sämtlich statistisch signifikante Werte, was sich jedoch nicht gleichermaßen für den Antikörper 10D2 beobachten ließ. Es fand sich in unserem Fallkollektiv keine positive Korrelation zwischen der Diagnose einer α -Synuklein-Aggregationskrankheit zu nicht-motorischen Symptomen bei Dysarthrie und Dysphagie ausgenommen einer Neigung zur Obstipation bei jedoch unzureichender klinischer Datenlage.

6.2.4 Vergleich zwischen den Protokollen

Im Folgenden werden zuerst die einzelnen Protokolle hinsichtlich der Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder (Tabelle 34) miteinander verglichen. Im Anschluss erfolgt eine Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen den Protokollen (Abbildung 31). Eine Analyse immunreaktiver Präparate auf Einzelfallbasis erfolgt separat je für die IHC (Tabelle 35) und den PET Blot (Tabelle 36). Eine detaillierte Aufschlüsselung der Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder pro je 10 HPF („Reaktivitätsdichte“) nach Organabschnitt erfolgte bereits in einem früheren Abschnitt (siehe Kapitel 6.2.1).

Tabelle 34: Protokolle mittels pSer129 waren stärker immunreaktiv als solche via 10D2. Präparate der Diagnosegruppe (n = 85). Kumulative Werte aus Submukosa und Muskularis (jeweils 20 HPF oder Whole-slide-Evaluation). Die Zahlen entsprechen den protokollspezifischen Mittelwerten über alle Präparate.

Mittelwerte der Immunreaktivität und darauf basierende Ränge je Protokoll								
Gruppe	Methode	IHC			PET Blot			
	Auswertung	High-power fields					Whole-slide	
	Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
	Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Diagnose-Gruppe	Immunreaktivität	3,59	3,34	3,79	0,66	0,91	6,49	9,93
	Rang	2	3	1	5	4		
Kontroll-Gruppe	Immunreaktivität	1,71	1,07	0,99	0,06	0,04	0,41	0,52
	Rang	1	2	3	4	5		

An Tabelle 34 bestätigt sich, dass die IHC im Vergleich zum PET Blot – bei gleicher Auswertungstechnik – in der Diagnose- wie auch Kontrollgruppe stets höhere Mittelwerte der immunreaktiven Gesichtsfelder pro 10 HPF aufwies. Insbesondere die Protokolle mittels Antikörper pSer129 besaßen in der Diagnosegruppe stets höhere Werte als diejenigen Protokolle mittels 10D2. Dies galt weniger streng für die Kontrollgruppe, jedoch erreichte auch hier ein Protokoll mit pSer129 den höchsten Mittelwert. Gegensätzliche Ergebnisse in Diagnose- und Kontrollgruppe zeigten sich hingegen in der PK-Vorbehandlung: In der Diagnosegruppe fanden sich die höchsten Mittelwerte in den beiden Protokollen mit 10 µg/ml PK, weniger ohne Vorbehandlung und wesentlich weniger in den PET-Blot-Protokollen mit 250 µg/ml PK. In der Kontrollgruppe hingegen war die Immunreaktivität geringer je höher die PK-Konzentration wurde. Zusammenfassend waren alle pSer129-Protokolle stark immunreaktiv; die PET-Blot-Protokolle zeigten ein geringes Reaktivitätsniveau, welches in der Kontrollgruppe noch einmal mehr als eine Potenzstufe geringer ausfiel als in der Diagnosegruppe.

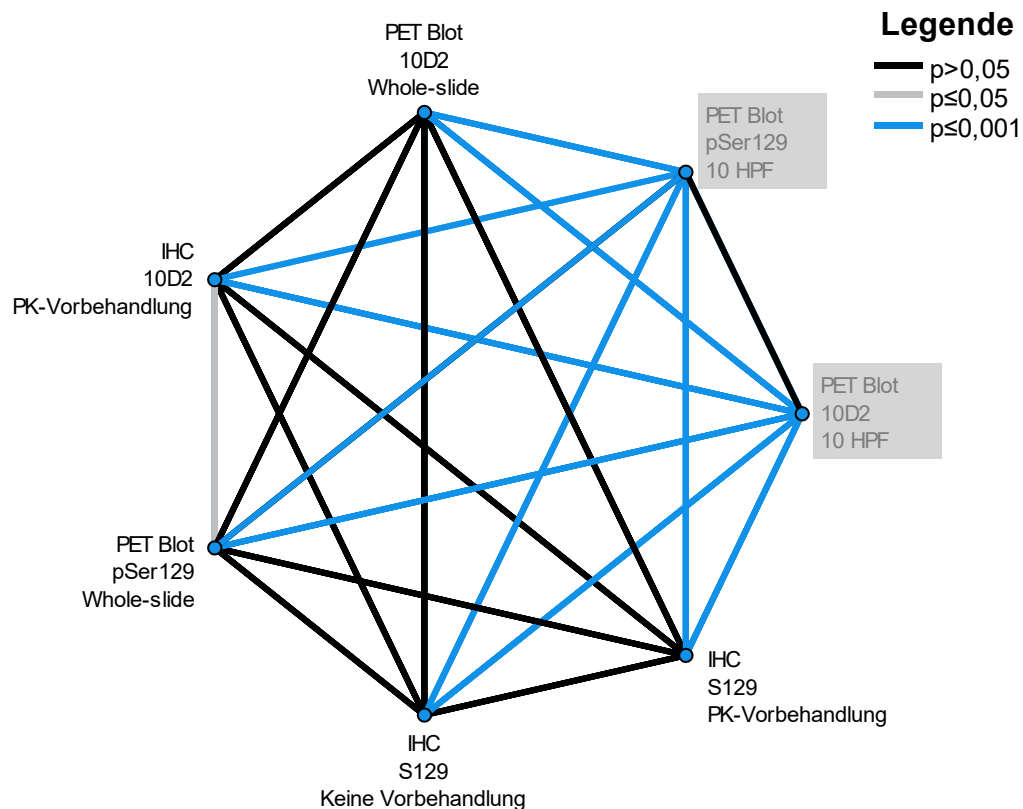


Abbildung 31: Statistisch hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot-Methoden, die mittels 10-HPF-Technik ausgewertet wurden (graue Kästen) und sämtlichen übrigen Protokollen. Zweifaktorielle Varianzanalyse für Ränge nach Friedman mit Bonferroni-Korrektur für multiple Testung. Diagnosegruppe (n = 20), Berechnung auf Grundlage der je 10+10 kumulierten Gesichtsfelder aus je Submukosa und Muskularis pro Präparat. Detailwerte im Anhang, Tabelle 59.

Da die Werte für Immunreaktivität für unsere Protokolle im direkten Vergleich (Tabelle 34) teils nah beieinanderlagen, suchten wir nach statistisch signifikanten Unterschieden mittels Friedman-Test als Globaltest für alle Protokolle der Diagnosegruppe. Berücksichtigt wurden alle Protokolle der Diagnosegruppe in Auswertung von 10 HPF (in jeweils Submukosa und Muskularis, d. h. kumulativ 20 HPF) sowie im Falle des PET Blot auch die Auswertung des ganzen Präparates. Es fanden sich mehrere Unterschiede zwischen den einzelnen Protokollen: statistisch hochsignifikant war der Vergleich (I) zwischen 10-HPF-Protokollen mit PET-Blot und allen IHC-Protokollen und (II) zwischen 10-HPF- und Whole-slide-Auswertung mittels PET-Blot, sowie einfach statistisch signifikant (III) zwischen dem 10D2-Protokoll der IHC und einem Protokoll via pSer129 im PET Blot via Whole-slide-Evaluation. Zwar gab es keine statistisch signifikanten Differenzen in der Immunreaktivität zwischen unseren Protokollen für die IHC und den PET Blot in Whole-slide-Evaluation; wird jedoch keine Bereinigung via Bonferroni-Korrektur für multiple Testung durchgeführt, so finden sich fast sämtlich statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Immunreaktivität zwischen der IHC und dem PET Blot (Tabelle 60). Keine statistisch signifikanten Unterschiede (unter den korrigierten Werten) fanden sich zwischen den IHC-Protokollen und PET-Blot-Protokollen in Whole-slide-Evaluation je untereinander.

Tabelle 35: Immunhistochemie: Circa die Hälfte der Präparate der Diagnose- (n = 85) und ein Viertel der Kontrollgruppe (n = 69) war immunreaktiv. Dargestellt ist die Anzahl der Präparate mit mindestens einem immunreaktiven Gesichtsfeld nach unseren Positivkriterien (Kapitel 5.2.5.1). Detaildarstellung im Anhang (Tabelle 57 und Tabelle 58).

Fallbasierter Vergleich der immunhistochemischen Protokolle						
Vorbehandlung	Antikörper	Gewebe	Diagnosegruppe		Kontrollgruppe	
			Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Keine	pSer129	Submukosa	48	37	21	48
		Muskularis	36	49	22	47
Proteinase K	10D2	Submukosa	43	42	11	58
		Muskularis	45	40	18	51
	pSer129	Submukosa	50	35	13	56
		Muskularis	42	43	14	55
Summe			264	246	99	315
Prozent			51,76%	48,24%	23,91%	76,09%

Weiterhin führten wir eine Analyse der einzelnen Protokolle auf Einzelfallbasis, d. h. hinsichtlich der Immunreaktivität je Präparat durch, angefangen mit den IHC-Protokollen (Tabelle 35). Hierzu wurde in Diagnose- und Kontrollgruppe betrachtet, ob sich in einem Protokoll jegliche Immunreaktivität („positiv“) oder keinerlei immunreaktive Gesichtsfelder („negativ“) fand – im Gegensatz zu Tabelle 34 wurde also die *Dichte* an Immunreaktivität nicht beachtet. Die Unterscheidung zwischen Submukosa und Muskularis in Tabelle 35 und Tabelle 36 erklärt sich durch die separate Auswertung dieser beiden Regionen.

Anhand Tabelle 35 lässt sich nun ablesen, dass unter den immunhistochemischen Verfahren in der Diagnosegruppe etwas mehr als jedes zweite Präparat immunreaktiv war, wohingegen dies auf weniger als jedes vierte Präparat der Kontrollgruppe zutraf. Dieses grundlegende Muster galt für alle immunhistochemischen Protokolle unabhängig vom verwendeten Antikörper, der Vorbehandlung und ausgewerteten Darmwandschicht etwa gleich. Somit bestätigte sich in der Analyse auf Einzelfallbasis, dass die immunhistochemischen Protokolle ein untereinander ähnliches Ausmaß an Immunreaktivität aufweisen und die Immunreaktivität in Kontrollfällen wesentlich schwächer ausgeprägt ist (vgl. auch Tabelle 34).

Tabelle 36: Im PET Blot ergibt sich eine höhere Immunreaktivität der Diagnosegruppe (n = 85) und eine niedrigere in Kontrollen (n = 69) via Whole-slide-Evaluation. Dargestellt ist die Anzahl der Präparate mit mindestens einem immunreaktiven Gesichtsfeld nach unseren Positivkriterien (Kapitel 5.2.5.2). Detaildarstellung im Anhang, Tabelle 57 und Tabelle 58.

Fallbasierter Vergleich der PET-Blot-Protokolle in zwei Auswertungstechniken						
Auswertung	Antikörper	Gewebe	Diagnosegruppe		Kontrollgruppe	
			Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
10 HPF	10D2	Submukosa	15	70	1	68
		Muskularis	13	72	0	69
	pSer129	Submukosa	17	68	0	69
		Muskularis	16	69	2	67
Summe			61	279	3	273
Prozent			17,94%	82,06%	1,09%	98,91%
Total	10D2	Submukosa	45	40	11	58
		Muskularis	47	38	7	62
	pSer129	Submukosa	53	32	10	59
		Muskularis	57	28	7	62
Summe			202	138	35	241
Prozent			59,41%	40,59%	12,68%	87,32%

Eine dazu analoge Analyse wurde nun auch für den PET Blot vorgenommen, dessen Ergebnisse von der IHC abwichen (Tabelle 36): Bei Auswertung von je 10 HPF sank der Anteil immunreaktiver Präparate der Diagnosegruppe stark, sodass sich eine etwa vierfach höheren Zahl „negativer“ Präparate ohne jegliche Immunreaktivität ergab (17,94 % vs. 82,06%). In der Kontrollgruppe fanden sich dafür auch erheblich weniger immunreaktive Präparate (1 % im PET Blot vs. 24 % in der IHC). Betrachtet man nun die Gesamtpräparat-Auswertung, so ist im Verhältnis zur IHC (vgl. Tabelle 35) einerseits die Anzahl immunreaktiver Präparate der Diagnosegruppe etwas höher (59,41 % vs. 51,76 %, also ein Plus von 7,65 %). Andererseits ist die Zahl immunreaktiver Präparate in der Kontrollgruppe um 11,23 % niedriger. Der PET Blot via Whole-slide-Evaluation erbrachte somit im fallbasierten Vergleich eine höhere Trennschärfe. Auch im PET Blot wies pSer129 in der Diagnosegruppe ein höheres Reaktivitätsniveau als 10D2 auf; in der Kontrollgruppe waren die beiden Antikörper in etwa äquivalent. Jedes dieser Ergebnisse galt unabhängig davon, ob die Auswertung von Submukosa oder Muskularis betrachtet wurde.

Alles in allem hatten Protokolle mittels pSer129 ein hohes Reaktivitätsniveau in der Diagnose- und Kontrollgruppe. Der PET Blot hatte ein geringeres Reaktivitätsniveau, dafür aber erheblich geringere Reaktivität in Kontrollfällen. Zwischen den einzelnen Antikörpern und Vorbehandlungen fanden sich geringe, statistisch nicht-signifikante Unterschiede. Lediglich hinsichtlich der Auswertungstechnik (10 HPF vs. Whole-slide) und Methode (IHC vs. PET Blot) gab es statistisch hochsignifikante Unterschiede in den immunreaktiven Gesichtsfeldern. In einer einzelfallbasierten Analyse bestätigte sich die höhere Immunreaktivität in der Diagnose- und niedrigere in der Kontrollgruppe via PET Blot in Whole-slide-Auswertung.

6.2.5 Sensitivität und Spezifität der Protokolle

Um eine Methode der Wahl ausmachen zu können, bestimmten wir Sensitivität und Spezifität unserer Protokolle mittels Kreuztabellen in SPSS (Version 27.0). Diese Analyse wurde zunächst für alle unserer Protokolle, dann auch aufgeschlüsselt für Submukosa und Muskularis sowie einzelne Organabschnitte des GIT durchgeführt. Detaillierte Kreuztabellen finden sich im Anhang (Kapitel 8.2). Schließlich wurden exemplarisch an Präparaten der Magen-Subgruppe verschiedene Szenarien zur Frage durchgespielt, wie viele immunreaktive Gesichtsfelder pro 10 HPF mindestens vorgefunden werden sollten, um eine möglichst sensitive und spezifische Diagnose stellen zu können.

Tabelle 37: Sensitivität und Spezifität waren höher im PET Blot und via pSer129. Detailwerte für die Präparate der Diagnosegruppe (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69) entnommen aus Kreuztabellen im Anhang (Tabelle 61 bis Tabelle 63). Kumulative Werte aus Submukosa und Muskularis. Ein Präparat galt dann als positiv, wenn mindestens ein Gesichtsfeld unsere Positivkriterien (vgl. Kapitel 5.2.5) erfüllte.

Sensitivität und Spezifität je Protokoll						
Vorbehandlung	Auswertung	Methode	Antikörper	Sensitivität	Spezifität	
Keine	High-power fields	IHC	pSer129	67,10%	52,20%	
Proteinase K			PET Blot	10D2	62,40%	69,60%
				pSer129	70,60%	69,60%
		10D2		25,90%	98,60%	
		pSer129		27,10%	97,10%	
		10D2		67,10%	76,80%	
Whole-slide		pSer129	74,10%	82,60%		

In der kumulativen Auswertung (Tabelle 37, Tabelle 61) stellte sich die Erfassung der Aggregat-Pathologie mittels PET-Blot-Protokoll, pSer129 und Whole-slide-Evaluation als gleichzeitig sensitiver und spezifischer heraus als sämtliche IHC-Protokolle. Besagtes Protokoll hatte auch die insgesamt höchste Sensitivität. Die höchste Spezifität wiesen die beiden PET-Blot-Protokolle in HPF-Auswertung auf (in dieser kumulativen Betrachtung: 20 HPF), bei jedoch wesentlich geringerer Sensitivität und dementsprechend hoher Falsch-Negativ-Rate von 72,9 % (pSer129) respektive 74,1 % (10D2). Auch unter den IHC-Protokollen besaß ein Protokoll mittels pSer129 mit PK-Vorbehandlung gleichzeitig die höchste Sensitivität und Spezifität.

Da für eine Biopsiediagnostik besonders die zum Lumen hin gelegenen Bereiche interessant sind, wurden die Analysen auch dediziert für die Submukosa durchgeführt (vgl. Tabelle 62 im Anhang). Die Ergebnisse waren (wie dies auch für die Muskularis gilt) im Wesentlichen identisch: Der PET Blot via pSer129 und Whole-slide-Evaluation führte unter allen Protokollen in der Sensitivität und war sensibler und spezifischer als die IHC-Protokolle; in der IHC hatte das Protokoll via pSer129 mit PK-Vorbehandlung die höchste Sensitivität und Spezifität. Im Vergleich zur kumulativen Auswertung war die Sensitivität einer isolierten Auswertung der Submukosa höher, die Spezifität aber geringer: So hatte z. B. das IHC-Protokoll via pSer129 und PK-Vorbehandlung eine 11,8 % höhere Sensitivität und 11,6 % niedrigere Spezifität als das gleiche Protokoll bei Auswertung der Submukosa allein. Das PET-Blot-Protokoll via pSer129 in Whole-slide-Evaluation erzielte in kumulativer Auswertung eine 11,8 % höhere Sensitivität bei nur 2,9 % niedrigerer Spezifität.

Da sich Protokolle mit PK-Vorbehandlung und Antikörper pSer129 als ausreichend sensitiv und spezifisch herausstellten, führten wir für diese Protokolle eine Subgruppenanalyse je Organabschnitt durch: Einerseits (I) für das PET-Blot-Protokoll via Whole-slide-Evaluation mit kumulierten Daten aus der Submukosa und Muskularis, um eine Resektatdiagnostik zu simulieren (Tabelle 38), dann (II) das gleiche Protokoll in Auswertung von zehn Gesichtsfeldern in der Submukosa, um eine oberflächliche (lumenseitige) Biopsie darzustellen (Tabelle 39), und schließlich (III) Immunhistochemie mittels pSer129 und PK-Vorbehandlung – ebenfalls beschränkt auf die Werte der Submukosa – als Vergleichsmethode zu II (Tabelle 40).

In der Whole-slide-Evaluation (folglich unter Einbezug der Submukosa und Muskularis) ergab sich eine Sensitivität zwischen 36,40 % (Rektum) und 100 % (Ösophagus und Ileum) sowie eine Spezifität zwischen 62,50 % (Jejunum) und 100 % (Ösophagus). Ösophagus, Jejunum und Ileum besaßen eine Sensitivität von über 80 %; Ösophagus, Magen, Duodenum und Kolon eine Spezifität von über 80 %. Bei Auswertung von zehn Gesichtsfeldern der Submukosa bei ansonsten identischem Protokoll ergab sich zwar eine Spezifität von 100 % in allen untersuchten Geweben, jedoch war die Sensitivität mit Werten zwischen 9,1 % (Jejunum und Rektum) und 50 % (Ösophagus) erheblich geringer. In der IHC ergaben sich für die Sensitivität Werte zwischen 35,7 % (Duodenum) und 100 % (Ösophagus) sowie für die Spezifität Werte zwischen 73,3 % (Ileum) und 100 % (Ösophagus). Schließt man nun angesichts der niedrigen Fallzahl ($n = 3$) die Ösophagus-Präparate aus, so ergab sich für keines unserer Protokolle in Aufschlüsselung nach Organabschnitt gleichzeitig eine Sensitivität und Spezifität von mehr als 80 %. Im PET Blot stach das Ileum heraus als einziger Organabschnitt mit exzellenter Sensitivität bei gleichzeitig moderater Spezifität. In der IHC erreichten jeweils Kolon und Rektum eine gleichzeitige Sensitivität und Spezifität von > 70 %.

Tabelle 38: Höchste Sensitivität in Ösophagus und Ileum, Höchste Spezifität in Ösophagus und Kolon. Vergleich einzelner Organabschnitte der Präparate der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69). Kumulierte Werte aus Submukosa und Muskularis. Man beachte im Folgenden die niedrige Fallzahl der Ösophagus-Präparate (n = 3). Detailwerte der kumulierten Auswertung im Anhang (Matrizen unter Tabelle 64, Kapitel 8.2). Das Protokoll simuliert die Ergebnisse einer Resektatdiagnostik.

PET Blot, pSer129, Whole-slide (Submukosa und Muskularis)		
Organ	Sensitivität	Spezifität
Oesophagus	100,00%	100,00%
Magen	62,50%	84,60%
Duodenum	50,00%	84,60%
Jejunum	81,80%	62,50%
Ileum	100,00%	66,70%
Appendix	50,00%	71,40%
Kolon	66,70%	87,50%
Rektum	36,40%	75,00%

Tabelle 39: Höchste Spezifität bei jedoch sehr geringer Sensitivität in allen Organabschnitten. Vergleich einzelner Organabschnitte der Präparate der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69). Das Protokoll simuliert die Ergebnisse einer lumenseitigen Biopsie mit anschließendem PET Blot.

PET Blot, pSer129, 10 HPF (Submukosa)		
Organ	Sensitivität	Spezifität
Oesophagus	50,0%	100,0%
Magen	37,5%	100,0%
Duodenum	14,3%	100,0%
Jejunum	9,1%	100,0%
Ileum	25,0%	100,0%
Appendix	16,7%	100,0%
Kolon	11,1%	100,0%
Rektum	9,1%	100,0%

Tabelle 40: Höchste Sensitivität in Ösophagus und Kolon, höchste Spezifität in Ösophagus und Appendix. Vergleich einzelner Organabschnitte der Präparate der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69). Das Protokoll simuliert die Ergebnisse einer lumenseitigen Biopsie mit anschließender Immunhistochemie.

IHC, pSer129, 10 HPF (Submukosa)		
Organ	Sensitivität	Spezifität
Oesophagus	100,0%	100,0%
Magen	50,0%	84,6%
Duodenum	35,7%	84,6%
Jejunum	54,5%	87,5%
Ileum	62,5%	73,3%
Appendix	50,0%	85,7%
Kolon	88,9%	75,0%
Rektum	72,7%	75,0%

Aufgrund der hohen Dichte an Immunreaktivität (Abbildung 29, Kapitel 6.2.1), moderater Sensitivität, hoher Spezifität und guter Erreichbarkeit für Biopsie-Verfahren finden sich im Folgenden die Detailwerte für Sensitivität und Spezifität exemplarisch für die Magen-Präparate. Hierfür wurden zwei verschiedene Szenarien getestet: (I) Ein einzelnes immunreaktives Gesichtsfeld von 10 bzw. 20 definiert die Diagnose einer α -Synuklein-Aggregationskrankheit (Tabelle 41) oder (II) erst ab 2/10 aus 10 bzw. 20 positiven HPF wird die Diagnose gestellt (Tabelle 42). In beiden Szenarien bestätigten sich unsere zuvor erarbeiteten Befunde (Tabelle 41, kumulative Werte): Der PET Blot via pSer129 und Whole-slide-Evaluation war verglichen mit anderen Verfahren sensibler. Auch die Spezifität der PET-Blot-Protokolle war stets höher als in der IHC. Die 10-HPF-Protokolle im PET Blot erzielten zwar höchste Spezifität, gleichzeitig jedoch die bei Weitem geringste Sensitivität aller Protokolle. 10D2 war weniger sensitiv und spezifisch als pSer129.

Tabelle 41: Auch in der Magen-Subgruppe zeigte der PET Blot in Whole-slide-Evaluation im Vergleich zur IHC eine höhere Sensitivität und Spezifität. Daten der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69).

Magen-Subgruppe, Szenario I: ≥ 1 immunreaktive von 10 HPF führen zur Diagnose								
Methode		Immunhistochemie			PET Blot			
Auswertung		10 HPF					Whole-slide	
Vorbehandlung		Keine	Proteinase K					
Antikörper		pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Submukosa	Sensitivität	56,3%	56,3%	50,0%	25,0%	37,5%	50,0%	68,8%
	Spezifität	76,9%	92,3%	84,6%	92,3%	100,0%	84,6%	84,6%
Muskularis	Sensitivität	62,5%	68,8%	75,0%	25,0%	25,0%	50,0%	81,3%
	Spezifität	61,5%	61,5%	69,2%	100,0%	100,0%	100,0%	84,6%
Kumulation	Sensitivität	81,3%	81,3%	75,0%	31,3%	37,5%	62,5%	93,8%
	Spezifität	53,8%	61,5%	61,5%	92,3%	100,0%	84,6%	76,9%

Tabelle 42: Werden $\geq 2/10$ bzw. $\geq 2/20$ (Kumulation) positive HPF vorausgesetzt, so vermindert sich die Sensitivität und steigt die Spezifität. Das PET-Blot-Protokoll mittels pSer129 erreichte nun $> 80\%$ Sensitivität und Spezifität. Daten der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69).

Magen-Subgruppe, Szenario II: ≥ 2 immunreaktive von 10 HPF führen zur Diagnose								
Methode		Immunhistochemie			PET Blot			
Auswertung		10 HPF					Whole-slide	
Vorbehandlung		Keine	Proteinase K					
Antikörper		pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Submukosa	Sensitivität	50,0%	43,8%	50,0%	18,8%	31,3%	37,5%	68,8%
	Spezifität	84,6%	92,3%	84,6%	92,3%	100,0%	92,3%	100,0%
Muskularis	Sensitivität	56,3%	50,0%	56,3%	6,3%	12,5%	31,3%	62,5%
	Spezifität	76,9%	76,9%	84,6%	100,0%	100,0%	100,0%	92,3%
Kumulation	Sensitivität	68,8%	62,5%	62,5%	25,0%	37,5%	50,0%	81,3%
	Spezifität	69,2%	76,9%	76,9%	92,3%	100,0%	92,3%	92,3%

Von Szenario (I) zu (II) nahm die Sensitivität ab und die Spezifität zu. Da in Szenario (II) bereits viele Protokolle eine Spezifität nahe 100 % erreichten, wurden strengere Bedingungen hier nicht mehr eigens aufgeführt (diese ergaben im Wesentlichen eine schwache Sensitivität bei kaum verbesserter Spezifität). Anhand des Protokolls mittels PET Blot und pSer129 (Whole-slide, kumulativ) lässt sich beispielhaft erkennen, dass von Szenario (I) zu (II) die Sensitivität um 12,5 % abnahm, die Spezifität dafür um 15,4 % stieg, sodass sich ein Protokoll mit über 80 % Sensitivität und Spezifität ergab. Im IHC-Protokoll mittels pSer129 und PK-Vorbehandlung unter Auswertung der Submukosa veränderten sich hingegen weder Sensitivität noch Spezifität.

In diesem Kapitel wurden verschiedene Organabschnitte, axiale Darmwandschichten und einzelne Protokolle hinsichtlich Sensitivität und Spezifität miteinander verglichen. Es erweiterte die Erkenntnisse der vorangegangenen Kapitel, dass Protokolle via pSer129 nicht nur stärker immunreaktiv sind als 10D2, sondern dass diese tatsächlich mit höherer Sensitivität und Spezifität einhergingen. Insbesondere ein Protokoll mittels PET Blot und pSer129 erreichte in allen Fällen Bestwerte für Sensitivität und Spezifität. Im direkten Vergleich unserer pSer129-Protokolle in Auswertung von je zehn Gesichtsfeldern zeigte sich in der Submukosa eine wesentlich geringere Sensitivität der PET-Blot-Protokolle. In Whole-slide-Evaluation kumulativer Werte ergab sich für die einzelnen Organabschnitte ein heterogenes Muster mit geringer Sensitivität im Duodenum, Rektum und in der Appendix; ansonsten ergaben sich aber eine moderate bis sehr hohe Sensitivität und moderate bis hohe Spezifität. In exemplarischer Darstellung des Magens zeigte sich schließlich, dass unter Voraussetzung mindestens eines positiven Gesichtsfeldes in der Auswertung Ergebnisse mit moderater bis hoher Sensitivität und Spezifität erreicht werden können. Indem strengere Anforderungen gestellt werden, kann die Spezifität auf Kosten der Sensitivität verbessert werden.

6.2.6 Berechnung einer Mindestbiopsiegröße

Die Mindestbiopsiegröße ließ sich aus den vorangegangenen semiquantitativen Ergebnissen errechnen. Grundlage bildeten die zehn zusammenhängenden Gesichtsfelder, die mittels IHC bzw. PET Blot je auf Immunreaktivität untersucht wurden und deren Fläche bekannt war. Detaillierte Tabellen zur Immunreaktivität in einzelnen Methoden und nach Organen finden sich im Anhang unter Kapitel 8.2. Die folgenden Ausführungen beziehen sich auf die absolute Zahl der Gesichtsfelder, die in der Auswertung von je zehn konsekutiven HPF als immunreaktiv nach unseren zuvor erarbeiteten Kriterien befundet wurden (siehe Kapitel 5.2.5). Vorangehend hatten sich Magen und Ileum bereits als GIT-Abschnitte mit hoher Immunreaktivität und guter Sensitivität herausgestellt (z. B. Abbildung 29 und Tabelle 38). Da der Magen mittels endoskopischer Verfahren gut erreichbar für eine Biopsieentnahme in vivo ist, wird dieses Organ im Folgenden beispielhaft hinsichtlich einer minimalen Biopsiegröße vorgestellt.

Tabelle 43: Mindestbiopsiegröße in der Submukosa: In > 50 % waren Biopsien im Zentimeterbereich nötig – im PET Blot meist > 32,8 mm². Angegeben ist die Fläche in mm², die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ein immunreaktives Gesichtsfeld enthält. Präparate der Diagnosegruppe (n = 85), Magen-Subgruppe.

Diagnosegruppe, Submukosa, 10 High-power fields					
Vorbehandlung	Keine		Proteinase K		
Methode	Immunhistochemie			PET Blot	
Fälle	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
PD1	5,66	> 32,8	4,52	> 32,8	> 32,8
PD2	32,8	32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD3	1,13	4,52	15,83	> 32,8	> 32,8
PD4	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	15,83
PD5	5,66	15,83	10,18	> 32,8	> 32,8
PD6	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD7	> 32,8	32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD8	> 32,8	15,83	2,26	> 32,8	3,39
PD9	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD10	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD11	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PDD1	> 32,8	15,83	> 32,8	32,8	> 32,8
PDD2	2,26	2,26	15,83	> 32,8	> 32,8
PDD3	3,39	3,39	6,79	15,83	15,83
DLB1	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
DLB2	2,26	5,66	4,52	10,18	10,18
DLB3	5,66	> 32,8	6,79	> 32,8	2,26
DLB4	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
DLB5	10,18	> 32,8	> 32,8	2,26	32,8
DLB6	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8

Tabelle 44: Auch in der Muskularis waren in den meisten Fällen Resektate in Zentimetergröße notwendig. Angegeben ist die Fläche in mm², die mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % ein immunreaktives Gesichtsfeld enthält. Präparate der Diagnosegruppe (n = 85), Magen-Subgruppe.

Diagnosegruppe, Muskularis, 10 High-power fields					
Vorbehandlung	Keine		Proteinase K		
Methode	Immunhistochemie			PET Blot	
Fälle	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
PD1	4,52	32,8	4,52	> 32,8	> 32,8
PD2	> 32,8	10,18	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD3	3,39	10,18	10,18	> 32,8	> 32,8
PD4	15,83	> 32,8	3,39	> 32,8	> 32,8
PD5	15,83	6,79	10,18	> 32,8	> 32,8
PD6	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD7	5,66	10,18	2,26	> 32,8	> 32,8
PD8	32,8	> 32,8	6,79	> 32,8	> 32,8
PD9	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD10	> 32,8	32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
PD11	> 32,8	10,18	32,8	> 32,8	> 32,8
PDD1	15,83	10,18	32,8	32,8	> 32,8
PDD2	1,13	2,26	15,83	32,8	> 32,8
PDD3	2,26	5,66	15,83	32,8	32,8
DLB1	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
DLB2	6,79	> 32,8	32,8	> 32,8	5,66
DLB3	> 32,8	32,8	3,39	> 32,8	5,66
DLB4	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8
DLB5	> 32,8	> 32,8	> 32,8	10,18	32,8
DLB6	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8	> 32,8

Aufgeführt ist in Tabelle 43 und Tabelle 44 je Fall diejenige Fläche, die mit 95 % Wahrscheinlichkeit mindestens ein Gesichtsfeld mit spezifischer Immunreaktivität enthält. So wäre z. B. in der Magen-Subgruppe bei Fall DLB2 in der IHC via Antikörper pSer129 mit PK-Vorbehandlung eine Submukosa-Biopsie von mindestens 4,52 mm² nötig, um mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % mindestens ein immunreaktives Gesichtsfeld zu sehen. In der Erhebung wird jedoch ersichtlich, dass in vielen Fällen durch Bewertung von je zehn Gesichtsfeldern keine Mindestbiopsiegröße ermittelt werden konnte. In diesen Fällen wurde die Biopsiegröße als > 32,8 mm² bewertet entsprechend der größten mit unserer Methode bestimmbaren Biopsie. Die Bestimmung einer Mindestbiopsiegröße je Protokoll über die Einzelfallbewertung hinaus war nicht zuverlässig möglich, da protokollabhängig teils die meisten Werte > 32,8 mm² betrugen. Für mehrere Fälle (PD6, PD9, DLB1, DLB4 und DLB6) war sogar in keinem unserer Protokolle eine Mindestbiopsiegröße bestimmbar. Aufgrund der daraus folgenden Verzerrung der Daten wurde die zunächst geplante Bestimmung eines einseitigen Konfidenzintervalls zur Festlegung der Mindestbiopsiegröße verworfen. Eine solche wäre für den PET Blot mangels Daten gar nicht und für die IHC zumindest nicht repräsentativ möglich. Die übrigen Daten lagen breit gestreut zwischen 1,13 mm² und 32,8 mm² mit wesentlich höheren Mindestbiopsiegrößen im PET Blot. Für mehr als die Hälfte der Präparate war eine Biopsiegröße von über einem Zentimeter nötig.

6.3 Staging

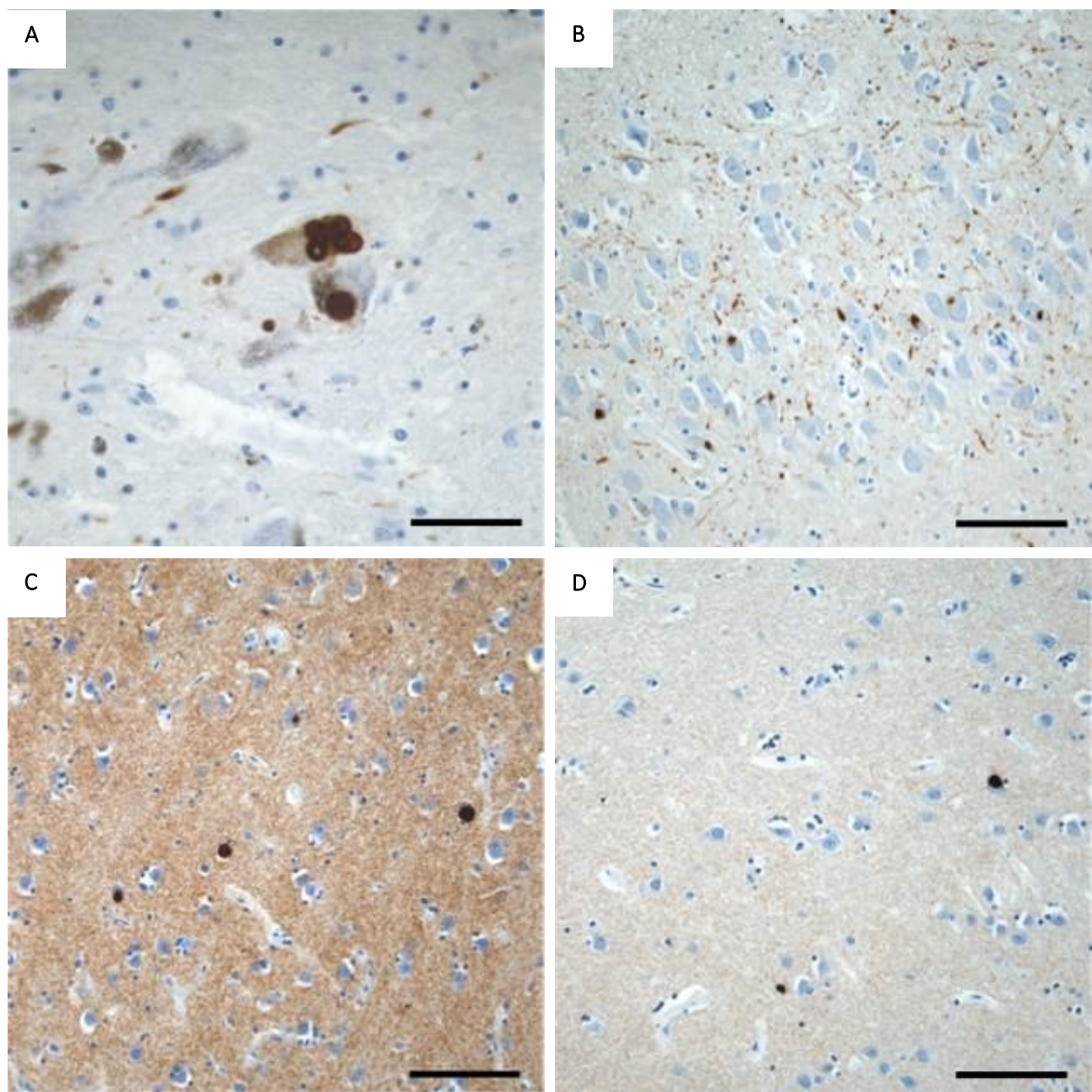


Abbildung 32: Beispiele zur Stadienauswertung nach Braak und McKeith. Alle Färbungen via Antikörper 10D2 mit PK-Vorbehandlung. **A** in 400-facher (Balken entspricht 50 μm), **B**, **C** und **D** in 200-facher Vergrößerung (Balken je 100 μm). **A** Multiple Lewy-Körperchen (LB) in pigmentierten Neuronen der Substantia nigra (DLB2, 10D2 1:500). Mittig sind in einem Neuron mindestens sechs LB abgrenzbar, morphologisch ähnlich der enterischen Ganglienzelle in Abbildung 11. **B** LB und retikuläres Muster aus vielen LN sowie schwache Hintergrundreaktivität im CA2-Teil des Ammonshorns (DLB2, 10D2 1:1.000). **C** vier LB, umgeben von starker Hintergrundreaktivität im äußeren Kortex des Gyrus cinguli (PD11, 10D2 1:1.000). **D** Gyrus frontalis medius, Grenze zwischen Medulla (oben links) und Kortex (unten rechts) mit zwei kortikalen LB sowie schwacher Hintergrundreaktivität (PD11, 10D2 1:1.000).

Das Staging ergab ein klares Überwiegen des Endstadiums V/VI nach BRAAK et al. (2003a) bzw. des kortikalen Stadiums nach MCKEITH et al. (2005) (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 4.4.2). Die meisten Hirnautopsien zeigten reichlich Immunreaktivität für α Syn (d. h. mindestens fünf immunreaktive Strukturen pro Hemigyrus) im Ammonshorn (besonders CA2 und transentorhinaler Kortex) sowie im Gyrus cinguli und Gyrus frontalis medius. Keine Immunreaktivität im Ammonshorn zeigte sich bei den Fällen DLB4 und PD6. Keinerlei Immunreaktivität für α Syn im Gyrus frontalis medius ergab sich für die Fälle PD6, PD7 und PD9, womit diese Fälle keine Endstadium-Pathologie erreichten (siehe Tabelle 4). Wir validierten diese Befunde für alle Fälle mit geringerem Stadium als V/VI nach Braak (bzw. kortikal nach McKeith) durch Sichtung (meist vorbestehender) PET-Blot-Membranen der entsprechenden Hirnregionen, was jedoch in keinem Fall das Ergebnis veränderte. Ein einzelner – vormals als PD klassifizierter – Fall zeigte von der Medulla oblongata bis zum Gyrus frontalis medius keinerlei Immunreaktivität. Das gleiche Muster fanden wir auch in PET Blots der gleichen Hirnareale, sodass dieser Fall aus der Diagnosegruppe ausgeschlossen und in der vorliegenden Studie nicht eingeschlossen wurde. DLB4 hingegen wies zwar keine Reaktivität im Ammonshorn auf, jedoch reichlich im Gyrus cinguli (> 5 Lewy-Körperchen pro Hemigyrus) und mäßig im Gyrus frontalis medius (3 Lewy-Körperchen pro Hemigyrus), sodass für diesen DLB-Fall stadiengetreu trotz diskontinuierlichem Verteilungsmuster ein kortikales Stadium nach McKeith festgestellt wurde. PD6 wies weder im Ammonshorn noch im Gyrus frontalis medius Immunreaktivität auf, jedoch reichlich in Medulla oblongata, Locus caeruleus, Substantia nigra und Gyrus cinguli (je > 5 Lewy-Körperchen pro Hemigyrus). Im PET Blot bestätigte sich das diskontinuierliche Verteilungsmuster bei diesem Parkinson-Fall, sodass aufgrund der Beteiligung des Gyrus cinguli ein Stadium IV nach Braak festgestellt wurde. PD7 und PD9 wiesen in der IHC wie auch im PET Blot ein kontinuierliches Verteilungsmuster auf mit Lewy-Pathologie in allen untersuchten Arealen von Medulla oblongata bis zum Gyrus cinguli, sodass auch für diese beiden Fälle ein Stadium IV nach Braak festgestellt wurde.

7 Diskussion

7.1 Umfang der Arbeit und Vergleich zu publizierten Studien

Die Anzahl unserer Proben ist moderat bis groß im Vergleich zur bestehenden Literatur. Zwar gibt es mehrere Studien mit höherer Fallzahl (BU et al., 2019), jedoch findet sich nur eine einzige mit vergleichbarem Umfang an untersuchten Abschnitten des GIT; diese analysierte im Bereich des Dünndarms nur wenige Präparate und unterschied nicht zwischen Duodenum, Jejunum und Ileum (STOKHOLM et al., 2016). VISANJI et al. (2015) untersuchten mit ähnlicher Fallzahl sowie mittels IHC und PET Blot Kolon-Biopsate hinsichtlich Sensitivität und Spezifität (VISANJI et al., 2015). Hierbei handelte es sich jedoch um Koloskopie-Stanzbiopsate, weshalb einerseits die Untersuchung auf ein einzelnes Organ beschränkt war, andererseits auch das Ausmaß der untersuchten Präparate erheblich geringer ausfiel. Die Biopsate bei VISANJI et al. (2015) umfassten technikbedingt überwiegend Mukosagewebe, während in der vorliegenden Dissertation auf der Basis neuroanatomischer Vorüberlegungen speziell Submukosa und Muskularis untersucht wurden. Mit moderater Fallzahl handelt es sich bei der vorliegenden Dissertation folglich um eine der umfangreichsten immunhistochemischen Arbeit hinsichtlich der Anzahl untersuchter Organe und ausgewerteten Plexusgewebes. Bei unserer Studie handelt es sich ferner um die bisher größte uns bekannte Untersuchung zur Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten des GIT mittels PET Blot.

Die einzigen beiden uns bekannten Arbeiten, die den GIT hinsichtlich Immunreaktivität für α Syn mittels PET Blot untersucht haben, wurden von VISANJI et al. (2015) respektive RUFFMANN et al. (2018) veröffentlicht. Positiv hervorzuheben an diesen Studien ist, dass Neben der Kontrolle für Aggregate jeweils Antikörper gegen natives wie auch phosphoryliertes α -Synuklein verwendet wurden. RUFFMANN et al. (2018) nutzten neben Stanzbiopsaten auch Resektate des Dünn- und Dickdarms, Magens und des Ösophagus. Keine der beiden Studien nutzte den von uns bevorzugten Antikörper 10D2 (Details zu den Studien siehe Tabelle 48 im Anhang). Limitationen umfassen den Fokus auf Mukosagewebe bei VISANJI et al. (2015) sowie den milden Proteinase-Verdau von nur 50 μ g/ml bei RUFFMANN et al. (2018). Reaktivitätsmuster wurden nur spärlich beschrieben und die wenigen Aufnahmen, die eine Immunreaktivität im PET Blot zeigen, beschränkten sich auf die Mukosa. In Anbetracht der Fallzahl, der Anzahl untersuchter Darmabschnitte und der detailliert in Bildern festgehaltenen Reaktivitätsmuster ordnen wir die vorliegende Dissertation somit letztlich als die umfassendste uns bekannte Studie zur Morphologie der α Syn-Pathologie im GIT ein.

Das von uns gewählte Patientenkollektiv war für PD typisch (LEES et al., 2009; MARTTILA, RINNE, 1991; MOISAN et al., 2016) hinsichtlich epidemiologischer Parameter wie Geschlechterverhältnis, Alter zum Diagnosezeitpunkt und Krankheitsdauer (siehe Tabelle 3, Kapitel „Quantitative Auswertung“). Auch die Subgruppe der DLB-Patienten zeigte typische epidemiologische Maße (MUELLER et al., 2019; VANN JONES, O'BRIEN, 2014) bezüglich Krankheitsdauer (5,5 Jahre) und Durchschnittsalter (73,7 Jahre), hatte jedoch einen höheren Anteil an Frauen (Verhältnis 1:1) als in vergleichbaren Kohorten. Durch das retrospektive, Fall-Kontroll-Design an Post-mortem-Gewebe wurden überwiegend Fälle mit Endstadium-Pathologie V/VI nach Braak eingeschlossen (siehe Kapitel 5.1.2). Diagnose- und Kontrollgruppe ähnelten sich im Geschlechterverhältnis und Altersmedian bzw. mittlerem Alter. Zusammenfassend stellen wir eine hohe interne

Validität unserer Gruppe fest, wobei die externe Validität – insbesondere die Übertragbarkeit auf Patientenkollektive im klinischen Setting – durch die überdurchschnittlich häufige Endstadium-Pathologie nach Braak eingeschränkt wird. Zur Validierung unserer Ergebnisse sind longitudinal angelegte klinische Studien nötig, welche Patienten in verschiedenen Stadien der Krankheit untersuchen. Insbesondere prospektive Untersuchungen am gastrointestinalen Nervensystem von Probanden ohne bekannte neurodegenerative Erkrankung sowie solchen mit Vorstadien wie z. B. REM-Schlaf-Verhaltensstörung (MAHOWALD, SCHENCK, 2018) sind nötig, um eine Frühdiagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten zu ermöglichen.

7.2 Diskussion der Forschungsfragen

7.2.1 Welche Reaktivitätsmuster finden sich im Gastrointestinaltrakt?

In den letzten Jahren wurden diverse Publikationen zur Morphologie der α Syn-Immunreaktivität im GIT veröffentlicht. Diese zeichneten sich vor allem durch große Heterogenität hinsichtlich der verwendeten Methodik aus. In einer systematischen Recherche in der MEDLINE-Database via PubMed konnten wir 19 Studien identifizieren, die ihre Ergebnisse in Bildaufnahmen festgehalten haben (siehe Tabelle 48 im Anhang). Hier zeigten sich große Unterschiede hinsichtlich Vorbehandlung, verwendeter Antikörper sowie Ausmaß (d. h. Größe im mm²) und Umfang (Anzahl untersuchter GIT-Abschnitte), was einen Vergleich der Ergebnisse erschwert. Als problematisch sehen wir insbesondere die Tatsache, dass nur drei Studien jegliche Kontrolle für Aggregate mittels Proteinase-Vorbehandlung durchgeführt haben, von denen wiederum eine Studie die Verfahren PET Blot und IHC verglich (RUFFMANN et al., 2018), eine ausschließlich den PET Blot nutzte (VISANJI et al., 2015) und eine ausschließlich die IHC (CORBILLÉ et al., 2016). 5 Studien nutzten eine unterlegene (BEACH et al., 2016b) Aufbereitung mittels Ameisensäure und 11 Studien beschrieben keinerlei Vorbehandlung. 8 Studien nutzten in Gegenüberstellung Antikörper gegen α Syn und phosphoryliertes α Syn. 9 Studien nutzten Stanzbiopsate, weshalb vorrangig auf α Syn-Muster der Mukosa beschriebene wurden, während Immunreaktivität der Muskularis nicht und solche der Submukosa allenfalls spärlich erfasst wurde.

In unserer Studie fanden wir mittels IHC folgende charakteristische Lokalisationen spezifischer Lewy-Pathologie: (I) perivaskuläre Neuriten, (II) ganglionäre Immunreaktivität im Plexus submucosus und myentericus sowie (III) frei vorliegende Neuriten vornehmlich in Muscularis mucosae sowie seltener in Ring- und Längsmuskelschicht. Ein „perivaskuläres“ Muster wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben und dort durchweg als unspezifisch bewertet (CORBILLÉ et al., 2016; RUFFMANN et al., 2018; SHIN et al., 2018). Wie den Bildern der genannten Publikationen zu entnehmen ist, handelt es sich jedoch um intramural-vaskuläre Reaktivität, teils vergleichbar mit der von uns beschriebenen Farbreaktion der Basalmembran in der IHC und dem PET Blot (siehe z. B. Abbildung 23 F), teils ähnlich Ablagerungen von Formalinpigment. Im engeren Sinne perivaskuläre Reaktivität – in Form gefäßnaher Neuriten – ist hiervon klar abzugrenzen und zeigte sich häufig in unserer Diagnosegruppe, wurde bisher jedoch in keiner uns bekannten morphologischen Studie des GIT beschrieben.

Ganglionäre Immunreaktivität hingegen gehört zu den am ausführlichsten beschriebenen Mustern (ALDECOA et al., 2015; BU et al., 2020; GOLD et al., 2013; GRAY et al., 2014; HARAPAN et al., 2020; ITO et al., 2014; LEE et al., 2018; PUNSONI et al., 2019; RUFFMANN et al., 2018; SPRENGER et al., 2015). Auch hier gilt es zwischen verschiedenen Reaktivitätsmustern zu differenzieren. So beschrieben einige Studien ein „diffuses“, „zytoplasmatisches“ oder auch „synaptisches“ Muster in Ganglienzellen (ALDECOA et al., 2015; BU et al., 2020; SHANNON et al., 2012a; SPRENGER et al., 2015), welches sich so in unseren Fällen nicht wiederfand. Allerdings zeigt dieses Muster Ähnlichkeit zu Positivkontrollen, die wir probeweise ohne PK-Vorbehandlung gefärbt haben und folglich ein ähnlich diffuses Muster im Nervengewebe aufwiesen (Abbildung 18 A). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die genannten Studien entweder keine Vorbehandlung (BU et al., 2020; SHANNON et al., 2012a; SPRENGER et al., 2015) oder Ameisensäure (ALDECOA et al., 2015) nutzten, was jeweils nicht dem Goldstandard zur Immundetektion der α Syn-Aggregate im GIT entspricht (BEACH et al., 2016b). Dementsprechend stellen wir die Hypothese auf, dass es sich bei diesen Mustern um Akkumulate des physiologischen α Syn handelt, die entsprechend als unspezifisch einzuordnen sind. Die Terminologie diffuser, zytoplasmatischer und synaptischer Ablagerungen scheint uns dabei zwar grundsätzlich morphologisch-topologisch korrekt zu sein in Bezug auf dieses vorwiegend präsynaptische Protein; jedoch müssen die in den genannten Studien dargestellten Akkumulate sorgfältig von der im PET Blot darstellbaren und pathophysiologisch relevanten synaptischen Aggregat-Pathologie abgegrenzt werden (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007).

Schließlich wurden auch frei vorliegende immunreaktive (Lewy-)Neuriten (LN), insbesondere in den muskulären Anteilen des Darms, beschrieben (CHUNG et al., 2016; ITO et al., 2014; SPRENGER et al., 2015). Die LN besitzen eine unverkennbare Gestalt und sind aus Studien des zentralen Nervensystems bekannt (SANDMANN-KEIL, BRAAK, 2005). Viele Arbeiten haben die LN im Darmgewebe entdeckt, jedoch meist nur im Mukosa- oder Plexusgewebe beschrieben (CHUNG et al., 2016; GOLD et al., 2013; GRAY et al., 2014; HARAPAN et al., 2020; ITO et al., 2014; LEE et al., 2018; RUFFMANN et al., 2018; SHANNON et al., 2012b; SHIN et al., 2017; SPRENGER et al., 2015). In unserer Studie hingegen fanden sich gerade die perivaskulär gelegenen Neuriten häufig und sind anatomisch vereinbar mit sympathischen Fasern, welche die gastrointestinalen Gefäße begleiten, um dort in Stresssituationen zur Vasokonstriktion beizutragen (FURNESS et al., 2014). Frühere Arbeiten haben herausgestellt, dass sich die α Syn-Pathologie des GIT über das Ganglion coeliacum und den Nucleus intermediolateralis des Rückenmarks bis in den Locus caeruleus in das ZNS ausbreiten kann (BRAAK et al., 2007; VAN DEN BERGE et al., 2019). Daher könnte diese bisher wenig diskutierte perivaskuläre α Syn-Pathologie darauf hinweisen, dass der Sympathikus an der Pathogenese der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten stärker als bisher angenommen beteiligt ist. Diese These wird weiter dadurch gestützt, dass wir das perivaskuläre Muster nicht nur in der IHC, sondern gerade in der für Aggregate kontrollierenden Methode PET Blot und gleichsam in Kontrolle für phosphoryliertes α Syn finden konnten. Fallstricke sind hier die transversal angeschnittenen Axone, welche als punktförmige Immunreaktivität leicht mit anderen Mustern verwechselt werden können. Dementsprechend empfehlen wir in der IHC wie auch im PET Blot die morphologisch besser identifizierbaren tangential angeschnittenen Lewy-Neuriten und ansonsten nur Ansammlungen der axial angeschnittenen Axone als spezifische Immunreaktivität zu interpretieren.

An Reaktivitätsmustern zeigten sich neben den LN auch Lewy-Körperchen (LB) sowie die intrazellulären Lewy-Punkte. Die LB wurden in mehreren morphologischen Studien des GIT beschrieben (ALDECOA et al., 2015; CHUNG et al., 2016; ITO et al., 2014; PUNSONI et al., 2019). ALDECOA et al. (2015) sprechen dabei auch von grobkörniger („coarse“) Färbung (ALDECOA et al., 2015), was die Morphologie unseres Erachtens gut beschreibt und klar von unspezifischen Mustern wie Myelinfärbung innerhalb der Ganglien und in peripheren Nerven abgrenzt. Dieser „grobkörnige“ Aspekt in der Farbgebung grenzt die dunkelbraunen Aggregate von der schwach gefärbten Umgebung wie auch von unspezifischen Mustern gut ab (vgl. Abbildung 21 A und Abbildung 22 A im Vergleich zu Abbildung 23 H). Schließlich konnten wir auch Lewy-Punkte (RUFFMANN et al., 2018; SHIN et al., 2017) beobachten, welche im Soma lokalisierbar am ehesten kleineren Formen der Lewy-Körperchen entsprechen und sorgfältig von den transversal angeschnittenen LN ähnlicher Morphologie abgegrenzt werden sollten.

In einer morphologischen Studie von SHIN et al. (2018) zur Untersuchung der nicht-neuronalen Immunreaktivität im GIT auf einen Antikörper gegen phosphoryliertes α Syn zeigten sich vier distinkte Artefakte: (I) Gepunktete Färbung der Gefäßwände, (II) diffuse bzw. granuläre Färbung des Zytoplasmas an Epithelzellen in der Mukosa des Magens (auch erwähnt von ALDECOA et al. (2015) und BUSSOLATI, LEONARDO (2008)), (III) diffuse Kernreaktivität in der Lamina propria der Mukosa sowie (IV) ein punktartiges Muster der Muscularis mucosae, das in einem einzelnen Fall gesehen wurde. Auch Färbungen des Präparatrandes (BUSSOLATI, LEONARDO, 2008) und freier Makrophagen (RUFFMANN et al., 2018; SPRENGER et al., 2015) zählen zu den bekannten Artefakten und fanden sich gleichsam in unserer Fallserie. Bis auf das „gepunktete“ Muster der Muscularis mucosae konnten wir alle dieser unspezifischen Muster bestätigen. Das gepunktete Muster ist nicht zu verwechseln mit den Lewy-Neuriten, die wir häufig in Parkinson- und DLB-Fällen mittels IHC und PET Blot in der Muscularis mucosae beobachten konnten und die sich durch eine charakteristische, geschlängelte Morphologie leicht erkennen lassen. Hinsichtlich der Gefäßwandreaktion wiederum stellen wir die Hypothese auf, dass es sich um eine artefizielle Immunreaktivität der Basalmembranen handelt, wie sie aus der neuropathologischen Routinediagnostik bekannt und häufig ist. Dieses Muster kann unserer Erfahrung nach in der IHC bei starker Ausprägung die Auswertung konfundieren und PET-Blot-Präparate praktisch unauswertbar machen, sodass hierauf in der Qualitätskontrolle besonderes Augenmerk gelegt werden muss. Es scheint sich um ein Artefakt des Färbeprozesses selbst zu handeln, da sich das Muster in Wiederholungen der Färbung vom selben Paraffinblock auf gleicher Höhe nie zeigte. Kreuzreaktivität der Mukosa konnten wir zwar beobachten, stellte jedoch kein Problem dar, da sich unsere Studie auf Muscularis mucosae, Submukosa und Muskularis sowie vereinzelt Subserosa und Muscularis mucosae beschränkte, während die Mukosa von der semiquantitativen Auswertung ausgeschlossen war. Eine Färbung des Präparatrandes ließ sich durch ausreichende Benetzung der Präparate mit Flüssigkeit während aller Schritte des Färbeprozesses verhindern. In der Auswertung ist ein solches Artefakt zwar hinderlich, lässt eine Auswertung nach dem von uns vorgeschlagenen Schema aus zehn High-Power-Fields jedoch dennoch zu, sofern diese außerhalb des überfärbten Bereichs gewählt werden.

Bisher nicht dezidiert beschrieben wurden unserer Kenntnis nach die folgenden unspezifischen Muster: (I) Zytoplasma-Färbung der Ganglienzellen, (II) Kernfärbung der Ganglienzellen (besonders in pSer129-Protokollen), (III) hellgelbe, meist extrazelluläre Punkte, (IV) tropfenförmige Strukturen, dunkelgrau und etwa in der Größe von Lewy-Körperchen, jedoch ohne anatomischen Bezug zu neuronalem Gewebe, (V) Blutzellen, die neben Makrophagen auch Granulozyten und Erythrozyten insbesondere in der Mukosa und den Gefäßen umfassen, (VI) flächige Schlieren, die andere Strukturen überdecken, (VII) Überlagerungsartefakte (d. h. Strukturen, die aus der Bildebene herausstechen), (VIII) Lufteinschlüsse, die teils eine Kernfärbung imitieren können sowie (IX) gelbe Formalinschlieren mit schwarzen Pigmenteinschlüssen. Es fanden sich im Wesentlichen keine Unterschiede in der unspezifischen Reaktivität zwischen den Protokollen 10D2 1:1.000 und pSer129 1:10.000. Vereinzelt Ganglienzellen wiesen in Kontrollfällen eine bräunliche Färbung des Zytoplasmas auf (Abbildung 23 B), die ähnlich auch in der Färbung mittels H.-E.-Technik erkennbar war. Wir stellen daher die Hypothese auf, dass es sich um Lipofuszin-Pigment im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses handelt. Diese unspezifische Immunreaktivität zeigt eine gleichmäßig-feine Verteilung im ganzen neuronalen Soma im Gegensatz zu den dunkleren und konzentrierten Einschlusskörperchen. Eine Kernfärbung zeigte sich nur unter Verwendung hoher Antikörper-Konzentrationen (z. B. pSer129 1:2.000). Hierzu sei angemerkt, dass das α -Synuklein – die Etymologie gibt den Fingerzeig – im Zellkern erstbeschrieben wurde (MAROTEAUX et al., 1988; YU et al., 2007) und dort physiologische Funktionen u. a. in der neuronalen Entwicklung (ZHONG et al., 2010) sowie der Bindung (KONTOPOULOS HUM MOL GENET. 2006GOERS et al., 2003) und Acetylierung (KONTOPOULOS HUM MOL GENET. 2006GOERS et al.) der Histone ausübt. Auf Basis (a) ausbleibender Immunreaktion in der von uns gewählten niedrigeren (1:10.000) Antikörper-Konzentration trotz exzellentem spezifischem Färbeverhalten in Fällen und Positivkontrollen und (b) physiologischem Vorkommen dieses primär präsynaptischen Proteins auch im Zellkern gehen wir folglich bei der Kernfärbung enteraler (Ganglien-)Zellen von Überfärbungsartefakten bzw. Kreuzreaktivität mit physiologischem α Syn aus. Die von uns beobachteten extrazellulären Punkte sind möglicherweise dem punktierten Muster der Muscularis mucosae ähnlich, welches von SHIN et al. (2018) in einem Fall beobachtet wurde und fanden sich auch bei uns nur in wenigen Fällen und an Stellen ohne anatomischen Bezug zu Nervengewebe. Auch die extrazellulären Tropfen stellen kein Hindernis zur Auswertung dar, sofern die Anatomie des GIT beachtet wird. Die übrigen Muster (V) bis (IX) wurden – mit Ausnahme der Makrophagen als typische Artefakte der IHC – in den von uns gesichteten Publikationen nicht erwähnt. Nichtsdestotrotz erscheint uns die Kenntnis und systematische Beschreibung solcher Artefakte – analog z. B. zur Auswertungsroutine eines EEG (vgl. ZSCHOCKE 2012, Kapitel 20) – essentiell, um spezifische Muster besser abgrenzen und bewerten zu können.

Im PET Blot zeigten sich – bei insgesamt geringerer anatomischer Auflösung – grundsätzlich Muster, die mit der IHC vergleichbar waren. Die perivaskuläre Immunreaktivität war wesentlich stärker ausgeprägt als die ganglionäre und frei vorliegende. Das häufigste Reaktivitätsmuster war die Färbung von LN. VISANJI et al. (2015) haben in ihrer Studie über die α Syn-Aggregate der Darmmukosa feine Netzwerke beschrieben, welche sich in der IHC und im PET Blot fanden und nach PK-Verdau teilweise erhalten blieben (VISANJI et al., 2015). RUFFMANN et al. (2018) hingegen haben einerseits ein „perikryptales“ Muster beschrieben (d. h.

Immunreaktivität entlang der Drüsen oder Krypten der Mukosa), andererseits auch ein „kolokalisiertes“ Muster, welches (unabhängig von der Morphologie) durch ähnliche Färbung in PET-Blot- und IHC-Präparaten definiert ist. Diese Reaktivitätsmuster wurden mit Bezug auf VISANJI et al. (2015) als vergleichbare und „grobkörnige“ Aggregate, vorwiegend in der Mukosa und sonst ohne spezifische anatomische Lokalisation charakterisiert (RUFFMANN et al., 2018). Wir konnten diese Muster in unserer Fallserie sämtlich nicht nachvollziehen, was an den Unterschieden in der Vorbehandlung und unserem Fokus auf die Strukturen der Submukosa und Muskularis liegen mag.

Unsere Ergebnisse beschreiben erstmals gezielt die Immunreaktivität der Submukosa und Muskularis mittels PET Blot. Die von uns erarbeiteten Muster wiesen dabei insgesamt größere Ähnlichkeit zu immunhistochemischen Studien des GIT auf als zu denen von VISANJI et al. (2015) und RUFFMANN et al. (2018). So fanden wir im PET Blot morphologische Analoga zu den aus IHC- und H.-E.-Färbung bekannten LB und LN, die sich am häufigsten gefäßbegleitend, auch im Plexus myentericus und submucosus und seltener in der Muskularis mucosae (Abbildung 24 A-D) zeigten. Insbesondere violette „Schatten“ sowie anatomische Landmarken und der gewundene Verlauf neuritischer Strukturen waren in unseren Vorversuchen charakteristisch für die Diagnosegruppe. Dahingegen zeigten sich Muster wie solitäre immunreaktive Punkte, Basalmembranreaktivität, flächige und bizarre Muster gleichermaßen in Kontrollfällen. Die Diskrepanzen zu den beiden oben genannten Studien könnten teils durch die Verwendung unterschiedlicher gegen α Syn gerichteter Antikörper zustande kommen. Da besagte Studien im Gegensatz zu den von uns genutzten Vollwandpräparaten Stanzbiopsien nutzten und sich auch deskriptiv auf die Mukosa fokussierten sind folglich andere Strukturen im Präparat zu erwarten: Da das Nervensystem des GIT überwiegend in den Plexus der Submukosa und Muskularis angeordnet ist, stellen wir die Hypothese auf, dass die Mukosa nicht geeignet ist zur neuropathologischen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten, was durch die geringe Sensitivität und Spezifität in den Ergebnissen von VISANJI et al. (2015) und RUFFMANN et al. (2018) weiter gestützt wird.

Unspezifische Immunreaktivitätsmuster im GIT mittels PET Blot wurden bisher kaum beschrieben. Während RUFFMANN et al. (2018) noch eine Färbung der Epithelzellen in der Mukosa des Magens erwähnen, bleibt in der Studie von VISANJI et al. (2015) unklar, inwiefern Artefakte herausgearbeitet wurden. Obwohl die Mukosa nicht explizit Gegenstand der vorliegenden Dissertation war, konnte tatsächlich eine unspezifische Färbung einzelner Mukosazellen beobachtet werden. Solitäre dunkle Punkte mit violetttem Schatten waren in Diagnose- und Kontrollgruppe gleichermaßen sporadisch zu sehen, war es uns oftmals nicht mehr möglich zu bestimmen, ob es sich um unspezifische Farblagerung oder axial angeschnittene LN handelt. Wir geben daher in Analogie zur IHC die Empfehlung ab, diese nur dann als spezifische Immunreaktivität zu werten, wenn mehrere dieser Punkte in plausibler Lokalisation (z. B. in Gefäß- oder Plexusnähe) zusammengelagert vorkommen. Die klinisch wohl relevanteste unspezifische Reaktion im PET-Blot-Verfahren war jedoch eine teils extensive Reaktion der Gefäßwände, vergleichbar mit einem Phänomen, das bereits SHIN et al. (2018) in der IHC festgestellt haben. Diese Kreuzreaktivität reicht von zartvioletter Färbung bis zu einem grobkörnig-dunklen Muster und ist aufgrund der gewundenen Form leicht verwechselbar mit perivaskulären Lewy-Neuriten. Wir stellen die Hypothese auf, dass es sich bei diesem Muster in Analogie zur IHC um ein Präzipitat

des immunreaktiven Farbstoffes (in diesem Falle eine Formazan-Reaktion) an der vaskulären Basalmembran und Bindegewebszügen handelt. Unter Verwendung der monoklonalen (mk) Variante des Antikörpers pSer129 (EP1536Y) fand sich eine morphologisch ähnliche, „flusenartige“ Färbung mit violetterm Schatten und teils flächig ausgebreitet in einzelnen Gebieten der Muscularis mucosae, Submukosa und Muskularis. Dieses Färbephänomen stellte einen besonderen Fallstrick in der Auswertung dar, da die „Flusen“ morphologisch schwer von Ansammlungen von Lewy-Neuriten unterscheidbar sind. Sie fanden sich vermehrt innerhalb der Bindegewebsstraßen der Muskularis, weswegen wir die Hypothese aufstellen, dass es sich um Bindegewebsartefakte handelt. Da sich dieses Muster in verschiedenen Verdünnungsstufen und unter Testung mehrerer Sekundärantikörper an Kontrollfällen (z. B. AD1) wiederfand, schließen wir, dass pSer129 mk nicht geeignet ist zur neuropathologischen Untersuchung des GIT und stets die polyklonale (pk) Variante genutzt werden sollte. Weitere für den PET Blot spezifische Fallstricke waren flächig braune Artefakte bei fehlerhafter Entparaffinierung sowie ein (besonders bei heißen Temperaturen im Labor häufiger) Bakterienbefall der Arbeitsmaterialien, welcher mit violetten Ablagerungen einhergeht und durch Reinigung der Boxen in NaOH vermieden werden kann. Darüber hinaus fanden sich weitere unspezifische Muster unter Verwendung der beiden Antikörper 10D2 und pSer129 pk, die unseres Wissens bisher sämtlich unbeschrieben sind (es sei auf das Kapitel „Ergebnisse“ verwiesen). Formalinartefakte schränkten dabei die Auswertbarkeit der PET-Blot-Präparate im Gegensatz zur IHC keineswegs ein, da die schwarz-gelben Überlagerungen leicht von der violetten Reaktivität abgrenzbar waren.

Zusammenfassend konnten wir unsere Ergebnisse mit 19 Studien identifizieren, die mittels PET Blot und/oder IHC Immunreaktivitätsmuster des GIT beschrieben und mit Bildanhängen publiziert haben. Während sich einige Studien teils explizit mit der Identifikation unspezifischer Muster auseinandergesetzt und die (Neuro-)Anatomie des GIT beachtet haben (RUFFMANN et al., 2018; SHIN et al., 2018), beschrieben andere keinerlei Artefakte, was Fragen hinsichtlich der Bewertungskriterien in diesen Studien aufwirft (BU et al., 2020; VISANJI et al., 2015). Wir konnten zeigen, dass sich in der Betrachtung von Submukosa und Muskularis eine morphologisch ähnliche Immunreaktivität in der IHC und im PET Blot zeigt. Insbesondere für den PET Blot konnten wir jedoch auch diverse unseres Wissens bislang unbeschriebene Muster aufzeigen, von denen insbesondere die perivaskulären Lewy-Neuriten in unserer Studie häufig waren und bislang kaum in der Literatur diskutiert wurden. Hierbei könnte es sich z. B. um Ausläufer des sympathischen Nervensystems handeln, das seit geraumer Zeit als Prädilektionsstelle der Parkinson-Pathologie bekannt ist (HERZOG, 1928) und zunehmend als komplementärer Pathway der α Syn-Ausbreitung diskutiert wird (BRAAK et al., 2007; VAN DEN BERGE et al., 2019).

7.2.2 Folgt das α -Synuklein-Verteilungsmuster einem Gradienten?

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass sich in allen Abschnitten des GIT Akkumulate von phosphoryliertem und unphosphoryliertem α Syn finden. Die Dichte an Immunreaktivität war dabei in der IHC wesentlich höher als im PET Blot im Vergleich von je zehn konsekutiven Gesichtsfeldern, was aufgrund des hohen Maßes an nicht-aggregiertem α Syn in der IHC jedoch für sich genommen noch keine pathophysiologischen Rückschlüsse zulässt. In der IHC und dem PET Blot ergab sich für unsere Diagnosegruppe ein vergleichbarer,

komplexer Verteilungsgradient mit der höchsten α Syn-Prävalenz im Magen und Ileum und der geringsten im Duodenum, dem Rektum und der Appendix (Abbildung 29). Andere Arbeitsgruppen haben einen von oral nach aboral abnehmenden („rostro-kaudalen“) Gradienten für Lewy-Pathologie (WAKABAYASHI et al., 1988), α Syn-Akkumulate (ANNERINO et al., 2012; CHUNG et al., 2016; POUCKET et al., 2012b) und phosphoryliertes α Syn (BEACH et al., 2010; POUCKET et al., 2012b) postuliert. Diese Studien sind somit einerseits hinsichtlich ihres Untersuchungsgegenstandes heterogen, nutzten andererseits aber auch unterschiedliche Färbemethoden, Vorbehandlungen und Auswertungsmethoden und analysierten selten alle Organe des GIT, sodass darauf hingewiesen werden muss, dass diese nur eingeschränkt untereinander und mit unserer Studie vergleichbar sind.

Eine Diskussion des Verteilungsmusters entlang der axialen Darmwandschichten (Mukosa, Submukosa, Muskularis etc.) erfolgte in der Literatur bislang spärlich. Einzelne Studien fanden die größte Dichte an α Syn (ANNERINO et al., 2012) bzw. phosphoryliertem α Syn (BEACH et al., 2009; POUCKET et al., 2012a) im Plexus myentericus, gefolgt von der Submukosa und weniger Immunreaktivität in der übrigen Muskularis, Mukosa und (Sub-)Serosa. Eine Studie fand in der Submukosa und Muskularis eine etwa gleiche Dichte an α Syn (BEACH et al., 2016b). Uns ist keine Studie bekannt, die bislang ein (z. B. mittels PET Blot) für Aggregate kontrolliertes Verteilungsmuster beschrieben hätte. Ferner handelt es sich bei unserer Studie um die erste uns bekannte, die dieses Muster weiter nach einzelnen Organabschnitten des GIT aufschlüsselt. Wir fanden in IHC und PET Blot gleichermaßen einen statistisch nicht-signifikanten Gradienten zugunsten der Submukosa, was mit den immunhistochemischen Ergebnissen von BEACH et al. (2016b) grundsätzlich übereinstimmt. Diskrepanzen zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen können einerseits methodisch bedingt sein, andererseits auch durch die bei uns häufigen LN nahe submukösen Gefäßen und der Muscularis mucosae bedingt sein, da sich die genannten Studien spezifisch auf ganglionäre Reaktivität fokussierten.

Die höchste Dichte an Lewy-Pathologie findet sich laut Literatur – und übereinstimmend mit unseren Ergebnissen – im distalen Ösophagus und Magen (WAKABAYASHI et al., 1988). Insbesondere der Magen wird daher und aufgrund neuroanatomischer Überlegungen auch als Ursprungsort der Pathogenese diskutiert (BRAAK et al., 2006b). Ähnlich unserer Studie fanden BEACH et al. (2010) auch eine relevant erhöhte α Syn-Dichte im Ileum, womit sich eine mögliche zweite Prädilektionsstelle der Pathologie ergibt. Dieser Befund am prionoiden α Syn wird gestützt durch den Analogieschluss von Studien zum Verteilungsmuster des PrP^{Sc}, welches sich im Tiermodell am frühesten im Ileum fand und von dort über das autonome Nervensystem retrograd ausbreitete (MCBRIDE et al., 2001). Im Duodenum und Jejunum findet sich laut Literatur eine mäßige α Syn-Immunreaktivität (BEACH et al., 2010) bzw. eine geringe Dichte an Lewy-Pathologie (WAKABAYASHI et al., 1988). Diese GIT-Abschnitte wurden nach unserem Kenntnisstand bisher kaum in der Literatur bezüglich Pathophysiologie oder diagnostischem Nutzen diskutiert und in einigen Studien auch gesammelt als „Dünndarm“ ohne weitere Aufschlüsselung diskutiert (ANNERINO et al., 2012; CHUNG et al., 2016). Da in unseren IHC-Protokollen das Jejunum – interessanterweise aber nicht das angrenzende Duodenum – ausgesprochen hohe Werte für Immunreaktivität aufwies, erachten wir eine solche Subsummierung als unangebracht; es scheint relevante Schwankungen hinsichtlich α Syn-Akkumulaten auch innerhalb des Dünndarms zu geben. Die Appendix hingegen erfuhr in letzter Zeit stärkere Beachtung

(KILLINGER, LABRIE, 2019; LU et al., 2020), ohne dass es unseres Wissens nach eine Studie gäbe, welche die Appendix mit anderen Organen des GIT hinsichtlich der α Syn-Dichte verglichen hätte. Dieses neue Interesse an der Appendix basiert wesentlich auf Registerstudien, die eine niedrigere Erkrankungsrate an PD nach Appendektomie festgestellt haben (KILLINGER et al., 2018; LIU et al., 2020), was jedoch in einer Metastudie nicht bestätigt werden konnte (LU et al., 2019). Auch unsere Ergebnisse sprechen aufgrund der geringen Immunreaktivität für α Syn – und besonders an aggregiertem – gegen eine pathophysiologische und diagnostische Bedeutung des Wurmfortsatzes, aber auch des Duodenums und Jejunums α Syn (siehe auch PET-Blot-Protokolle in Abbildung 29).

Hinsichtlich der Immunreaktivität innerhalb des Kolons gibt es widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur. So fand sich zwar in einer Studie eine hohe Dichte an α Syn in diesem Abschnitt des GIT (ANNERINO et al., 2012). Jedoch ergab sich für das Kolon in einer älteren Studie wenig Lewy-Pathologie (WAKABAYASHI et al., 1988) und auch in Studien, die für Phosphorylierung kontrollierten und eine PK-Vorbehandlung in der IHC nutzten, zeigte sich vergleichsweise wenig Immunreaktivität (BEACH et al., 2010; CHUNG et al., 2016). Es finden sich auch Studien, welche eine Spezifität der Pathologie von 100 % beschreiben (BEACH et al., 2016b; SHANNON et al., 2012a; SHANNON et al., 2012b), neben solchen, die aufgrund fehlender Spezifität von einer Etablierung der Kolon-Pathologie als Biomarker abraten (CHUNG et al., 2016; VISANJI et al., 2015). In unserer Studie fand sich im Kolon im Vergleich zu anderen Teilen des GIT eine moderate Immunreaktivität. Das Rektum schließlich zeigte in unserer wie auch anderen Studien ein relativ geringes Maß an α Syn-Immunreaktivität (ANNERINO et al., 2012; BEACH et al., 2010; POUCKET et al., 2012b; WAKABAYASHI et al., 1988). In Anbetracht geringer Dichte an aggregiertem α Syn in Kolon und Rektum können wir auch für diese Organabschnitte keine weitergehenden Hinweise auf pathophysiologische Relevanz beisteuern.

Obwohl die Ergebnisse früherer Arbeiten somit mit unseren grundsätzlich übereinstimmen, möchten wir gegen einen „rostro-kaudalen“ α Syn-Gradienten im engeren Sinne argumentieren. Die Annahme eines solchen Gradienten fußt auf mindestens zwei, in der Literatur mehr oder minder explizit vertretenen, Prämissen: (a) Die bisherigen (Autopsie-)Studien zeigten einen solchen Gradienten und (b) das α Syn-Verteilungsmuster folge dem Innervationsmuster des Vagusnerven. Demnach sollten vagal stark innervierte Gebiete wie der Magen besonders anfällig sein sowohl für α Syn-Fehlfaltung als auch für dessen Aufnahme in Vagus-Efferenzen, über die das Protein retrograd ins ZNS einfallen könnte.

Jedoch sehen wir (a) in den wenigen anderen Studien, die den GIT in extenso analysiert haben (ANNERINO et al., 2012; BEACH et al., 2010; WAKABAYASHI et al., 1988) sowie auch in unserer eigenen Studie (siehe Abbildung 29), kein stetiges Muster. Vielmehr zeigt sich kaum Lewy-Pathologie im oberen Ösophagus (WAKABAYASHI et al., 1988) und neben dem Magen findet sich – auch in unserer Studie – ein weiteres Maximum an aggregiertem α Syn im Ileum (BEACH et al., 2010). In einer Studie fand sich zwar nur ein einzelner Gipfel des Gradienten im Magen, während die restlichen GIT-Abschnitte eine eher homogene (und geringe) Menge an Immunreaktivität aufwiesen (ANNERINO et al., 2012); jedoch ist dies gleichermaßen mit einem mehr oder minder stetigen „Gradienten“ nicht vereinbar.

Tabelle 45: Im Rattenmodell lässt der prozentuale Anteil vagal innervierter myenterischer Ganglien keinen stetigen rostro-kaudalen Gradienten erkennen (BERTHOUD et al., 1990). Angegeben sind jeweils Organ, Organabschnitt sowie Prozentwert $\pm$ Standardabweichung der je sechs untersuchten Ratten.

Organ	Abschnitt	%
Magen	Fundus	100
	Korpus	100
	Antrum	100
Duodenum	D1	96 $\pm$ 5
	D3	86 $\pm$ 11
	D5	73 $\pm$ 7
	D8	56 $\pm$ 9
Jejunum	J20	24 $\pm$ 5
	J40	40 $\pm$ 7
	J60	40 $\pm$ 4
	J80	35 $\pm$ 5
Ileum	Distal	35 $\pm$ 4
Zökum	Apex	66 $\pm$ 7
	Korpus	65 $\pm$ 7
Kolon	Aszendens	51 $\pm$ 4
	Transversum	20 $\pm$ 6
	Descendens	16 $\pm$ 6
Rektum	Proximal	0

Und (b) folgt auch die Vagusnerv-Innervation unseres Wissens keinem strengen „rostro-kaudalen“ Gradienten (siehe Tabelle 45). BERTHOUD et al. (1990) beschrieben mittels Rattenmodell das Innervationsmuster des Vagusnerven im GIT zwar als am ehesten rostro-kaudal abnehmend, allerdings zeigte sich wenig Innervation im Jejunum und Ileum bei gleichzeitig starker Versorgung des Zökums und aufsteigenden Kolons, was der Annahme eines stetigen Gradienten entgegensteht, sofern nicht Messfehler unterstellt werden. Auch die geringe Innervation des Ileums ist schwer mit unseren Ergebnissen einer hohen Dichte an aggregiertem α Syn in diesem Organ vereinbar. Eine Verwirrung bezüglich der Vagus-Innervation mag zustande gekommen sein durch eine anatomische Studie von HOPKINS et al. (1996), welche mehrfach misinterpretiert wurde, sie beweise einen rostro-kaudalen Gradienten der Vagusinnervation (CHUNG et al., 2016; VISANJI et al., 2014). Dabei wurde diese Studie lediglich als Beweis der großflächigen Projektion des Magens auf den Nucleus dorsalis nervi vagi in die Diskussion eingebracht (BRAAK et al., 2006b); und auch dieser Vagus Kern wird längst nicht mehr als obligate Triggersite der α Syn-Pathologie angesehen (ATTEMS, JELLINGER, 2008; KALAITZAKIS et al., 2008b).

Somit schließen wir, dass (a) sich aus der publizierten Literatur kein stetiger α Syn-Gradient herauslesen lässt und (b) die in mehreren Studien behauptete Vagus-Innervation weder der tatsächlichen Innervation noch dem Verteilungsmuster des nativen, phosphorylierten oder aggregierten α Syn entspricht. Wir sehen vielmehr ein non-lineares und mehrgipfeliges Verteilungsmuster. Die Maxima besonders der Immunreaktivität für aggregiertes α Syn finden sich dabei in Organabschnitten des GIT, welche als für Prion- bzw. „prionoiden“ Erkrankungen pathophysiologisch relevant diskutiert werden, nämlich dem Magen (BRAAK et al., 2006b) und dem Ileum (MCBRIDE et al., 2001). Ob die vagale Innervation dabei eine Rolle spielt, bleibt für uns aus den oben genannten Gründen zumindest unklar. Auch andere Autoren haben das Konzept des Vagal Highway (BREEN et al., 2019) angezweifelt, u. a. in der Reanalyse einer dänischen Registerstudie,

in der sich herausstellte, dass eine Vagotomie das Parkinson-Risiko entgegen früheren Ergebnissen (SVENSSON et al., 2015) statistisch nicht signifikant reduziert (TYSNES et al., 2015). In Analogie zur Ausbreitung von PrP^{Sc} wurde auch darauf hingewiesen, dass der Vagusnerv neben dem sympathischen Nervensystem nur einer unter mehreren Wegen in das ZNS sein könnte. So kann z. B. PrP^{Sc} auch über Nervi splanchnici und Ganglion coeliacum bis zum Nucleus intermediolateralis retrograd in das ZNS einfallen (MCBRIDE et al., 2001). Weiterhin fand sich Lewy-Pathologie in diesem sympathischen Pathway in Autopsieproben von Parkinson-Fällen (BRAAK et al., 2007; WAKABAYASHI, TAKAHASHI, 1997) wie auch induziert im Modell wieder (VAN DEN BERGE et al., 2019).

Es ergeben sich drei logische Alternativen bezüglich des von BRAAK et al. (2006b) vorgeschlagenen Ausbreitungsmusters (BEEKES, 2021): (I) Die α Syn-Pathologie beginnt simultan an mehreren Prädilektionsstellen des zentralen und/oder peripheren Nervensystems (multizentrische Hypothese), (II) das Nervensystem des GIT ist vor dem ZNS befallen (zentripetale oder Body-first-Hypothese) oder (III) das ZNS ist zuerst befallen (zentrifugale oder Brain-first-Hypothese). Schließlich sollte auch bedacht werden, dass die enterische Symptomatik nicht nur dezentral durch α Syn-Ablagerungen im Darm entstehen können, sondern auch eine zentrale Fehlsteuerung (z. B. des dorsalen Vaguskerns) vielerlei Symptome adäquat erklären könnte. Da Tiermodelle die humane Pathophysiologie der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten nur unvollständig rekapitulieren (CHIA et al., 2020), bildgebende Verfahren nur indirekte Schlüsse auf die Histopathologie zulassen und auch Autopsiestudien inhärenten Limitationen unterliegen (MARAGANORE et al., 1999), bleibt der Startpunkt wie auch der longitudinale Verlauf der α Syn-Ausbreitung letztlich ungeklärt. Neben der Entwicklung geeigneter Modellorganismen (bzw. zunehmend vielversprechender humaner Organoiden) empfehlen wir, auch alternative Konzepte ernst zu nehmen, welche beispielsweise einen multifokalen Beginn der α Syn-Fehlfaltung postulieren (ROLLI-DERKINDEREN et al., 2020).

7.2.3 Korreliert das Ausmaß an α -Synuklein-Pathologie mit der Erkrankungsdauer?

In unserer Studie konnten wir die Korrelation zwischen Immunreaktivität (IHC, pSer129 mk 1:10.000) und einerseits (I) der Krankheitsdauer und (II) dem Alter zum Todeszeitpunkt bestimmen sowie andererseits auch zu weiterführenden klinischen Parametern wie (III) Demenzdiagnose und (IV) gastrointestinalen Beschwerden. Eine (protokollabhängige) statistische Signifikanz ergab lediglich die Korrelation mit einer Demenzdiagnose, weiterhin zeigte sich eine (statistisch nicht-signifikante) Neigung zur Obstipation. Die gleichzeitig fehlende Korrelation mit der Krankheitsdauer entspricht dem Ergebnis bisheriger Studien, die die Glandula submandibularis (BEACH et al., 2016a), das zentrale Nervensystem (GOMEZ-TORTOSA et al., 1999) und den GIT (BEACH et al., 2009; LEBOUVIER et al., 2010b) auf Lewy-Pathologie untersucht haben. In der Korrelationsanalyse zwischen Immunreaktivität und Alter fand sich teils eine inverse (BEACH et al., 2009), teils eine schwach positive ($r = 0,395$; $p = 0,02$) Korrelation (LEBOUVIER et al., 2010b). Es bleibt jedoch unklar, wie diese Ergebnisse hinsichtlich Krankheitsdauer und Alter zu interpretieren sind. Möglicherweise sind die Ergebnisse artefiziell zu erklären, da es sich bei den genannten Studien wie auch bei unserer eigenen um retrospektive Arbeiten an Autopsieproben mit vorwiegender Endstadium-Pathologie handelt. Eine Demenz

konnte zwar mit vermehrten kortikalen LB korreliert werden (HURTIG et al., 2000), jedoch ist dieses Ergebnis durchaus umstritten (PARKKINEN et al., 2005). In unserer Studie korrelierte gastrointestinales α Syn nur in seiner phosphorylierten Form (IHC und PET Blot via pSer129), nicht jedoch in nativer Konformation (IHC und PET Blot via 10D2) statistisch einfach signifikant ($p < 0,05$ ohne Korrektur für multiple Testung) mit einer Demenzdiagnose. In der Korrelation von Obstipation und Diagnose eines M. Parkinson zeigten zwar einige Studien einen Zusammenhang (LEBOUVIER et al., 2010b; LEE et al., 2018), jedoch fand sich keinerlei statistische Signifikanz mehr, sobald die GIT-Symptomatik mit der Dichte an phosphoryliertem α Syn korreliert wurde (LEE et al., 2018). Auch in unserer Studie zeigte sich keine statistisch signifikante Korrelation zwischen gastrointestinaler Symptomatik und Diagnose eines M. Parkinson; obstripiert waren unsere Fälle der Diagnosegruppe zwar häufiger als Kontrollen, jedoch muss dies durch die spärliche klinische Datenlage relativiert werden. Die geringe Korrelation mit klinischer Symptomatik könnte auf die Auswahl der Kontrollen zurückzuführen sein. Denn während LEBOUVIER et al. (2010b) „gesunde Probanden“ rekrutierten und LEE et al. (2018) von „Neurologisch intakten Subjekten“ sprechen, finden sich bei uns primär differentialdiagnostische Fälle (z. B. Supranukleäre Blickparese oder Multisystematrophie). Diese befinden sich in einem klinisch vergleichbaren Setting mit eingeschränkter Mobilität und häufigen Hospitalisationen, was z. B. Obstipation wesentlich begünstigt (DE GIORGIO et al., 2015).

Eine fehlende Korrelation der Immunreaktivität mit Krankheitsdauer, Alter und Demenzdiagnose sowie auch eine fehlende Korrelation zwischen Diagnose und GIT-Symptomatik verstärken die Zweifel an einer unmittelbar pathogenen Rolle der α Syn-Ablagerungen an der Pathogenese der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Bis heute sind LB in ihrer pathophysiologischen Bedeutung nicht entschlüsselt und könnten unseres Wissens nach protektiv wie auch destruktiv auf neuronales Gewebe wirken (CALNE, MIZUNO, 2004; CHARTIER, DUYCKAERTS, 2018) oder gar ein reines Epiphänomen darstellen (KILLINGER, KORDOWER, 2019). So entwickeln alternde Ratten regelhaft α Syn- und tau-Akkumulate im Auerbach-Plexus ohne entsprechende klinische Symptome zu zeigen (PHILLIPS et al., 2009). Zwar wurden Mikro-Aggregate überzeugend mit der Degeneration der Synapsen des ZNS in Verbindung gebracht, jedoch macht die in der IHC typischerweise beobachtete Lewy-Pathologie nur den kleinsten Anteil des α Syn innerhalb der Nervenzellen aus (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007). Eine hohe Last an Lewy-Pathologie kann somit nicht selbstverständlich als Kennzeichen für eine hohe Last an präsynaptischem aggregiertem α Syn herangezogen werden. In der IHC und im für die pathologischen Aggregate kontrollierenden PET Blot ergab sich gleichermaßen eine fehlende Korrelation mit klinischen Parametern, sodass die Bedeutung peripherer α Syn-Aggregate für die klinisch relevante Neurodegeneration in Frage gestellt werden kann und eine zentrale Genese peripherer Symptome verstärkt diskutiert werden sollte.

7.2.4 Wie groß muss eine Biopsie mindestens sein?

Nachdem bislang primär morphologische und pathophysiologische Fragestellungen bearbeitet wurden, soll nun die Diagnostik hinsichtlich Probenumfang thematisiert werden: reichen womöglich Appendektomien oder Biopsien im Rahmen der Routine-Koloskopie aus oder sind Vollwandresektate zur zuverlässigen Diagnostik notwendig? Uns sind bis heute keine Studien bekannt, die diese Frage systematisch untersucht hätten. Zur

Beantwortung berechneten wir zunächst die Fläche in mm², welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % mindestens ein immunreaktives Gesichtsfeld enthält (Tabelle 43 und Tabelle 44). Die Analyse wurde beispielhaft für die Subgruppe aller Magen-Präparate der Diagnosegruppe durchgeführt, da sich in dieser eine hohe Dichte an aggregiertem α Syn fand und eine Stanzbiopsie (im Gegensatz z. B. zum Ileum) vergleichsweise leicht im Rahmen einer Gastroskopie durchführbar ist.

Die IHC-Verfahren benötigten insgesamt eine geringere Biopsiegröße zur Detektion eines immunreaktiven Gesichtsfelds im Vergleich zu PET Blot. Zugrunde liegt die relativ geringe Dichte an immunreaktiven Strukturen in den PET-Blot-Präparaten, was jedoch keineswegs als Nachteil der Methode, sondern im Gegenteil gerade im Rahmen der spezifischeren Aggregatdetektion interpretiert werden muss. Es erfolgte der Vergleich der einzelnen Protokolle unter Beachtung der axialen Darmwandschichten. Hier stach die IHC mittels pSer129 und 10 μ g/ml PK-Vorbehandlung in Auswertung der Muskularis heraus, die es ermöglichte, in 12 der 20 Fälle nach Auswertung von zehn Gesichtsfeldern eine Diagnose zu stellen. Das zuverlässigste PET-Blot-Protokoll war die Auswertung der Submukosa mittels Antikörper pSer129, in dem für 6 der 20 Fälle nach Auswertung von zehn HPF eine Diagnose möglich war. Somit war keines unserer Protokolle in Auswertung je zehn zusammenhängender Gesichtsfelder in der Lage, zuverlässig die Diagnose einer α -Synuklein-Aggregationskrankheit bestätigten, insbesondere in der IHC ist trotz prima facie geringerer notwendiger Gewebemenge die Spezifität der hieraus erreichten Diagnose in Frage zu stellen.

Die in dieser Arbeit vorgenommene Auswertung mittels je zehn HPF entspricht im Wesentlichen der Gesamtgröße einer üblichen Biopsie. Unsere Gesichtsfelder bei 200-facher Vergrößerung besaßen eine Größe von je 1,131 mm², d. h. insgesamt 11,31 mm² bei zehn konsekutiven Gesichtsfeldern. Die Biopsiegrößen einer exemplarischen Studie zur Untersuchung des enterischen Nervensystems mittels Stanzbiopsien lagen mit 8 bis 11,8 mm² im vergleichbaren Rahmen (LEBOUVIER et al., 2010a). Die Gesamtgröße eines unserer Protokolle mit Auswertung via zehn Gesichtsfeldern läge also am oberen Ende dessen, was in Routinebiopsien üblich ist, lässt in diesem Ausmaß aber dennoch keine sichere Diagnose für Parkinson-, DLB- und PDD-Patienten zu. Erschwerend kommt hinzu, dass von endoluminal durchgeführte Stanz- oder Zangenbiopsien vorwiegend Mukosa-Gewebe enthalten (SÁNCHEZ-FERRO et al., 2015; VISANJI et al., 2015) mit nur geringen Anteilen der Submukosa und typischerweise ohne Gewebe der Muskularis. Um unsere Ergebnisse zu replizieren, wären entsprechend mindestens 12 mm² Gewebe der Submukosa respektive der Muskularis nötig, was einer ganzen Reihe von Stanzbiopsien bzw. einem Resektat entspräche. Wir schließen daraus, dass Stanz- oder Zangenbiopsien üblicher Größe sowie deren Auswertung mittels IHC oder PET Blot zur Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten nicht geeignet sind. Eine mögliche Alternative stellen Resektate des GIT dar, wie sie in viszeralchirurgischen Eingriffen beiläufig anfallen. Eine solche Resektat-Diagnostik könnte einerseits bei Patienten mit unklarem Parkinson-Syndrom und anstehender Operation geplant und andererseits durch Aufarbeitung bereits vorhandener Proben aus früheren Eingriffen durchgeführt werden. Auf diese Weise entstünde ein neues Werkzeug, um die nach wie vor geringe diagnostische Sicherheit (RIZZO et al., 2016) in der Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten zu erhöhen, z. B. durch Abgrenzung zu Parkinson-Plus-Syndromen oder weiteren Bewegungsstörungen wie dem Essentiellen Tremor (plus).

7.2.5 Welches ist das neuropathologische Diagnostikverfahren der Wahl?

Tabelle 46: Methoden zur gastrointestinalen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Angegeben sind je die auf unseren Ergebnissen basierende Empfehlung, eine unterlegene Alternative sowie aus unserer Erfahrung stark unterlegene oder ungeeignete Methodik.

	Erste Wahl	Zweite Wahl	Nicht empfohlen
Methode	PET Blot	Immunhistochemie	---
Antikörper und Verdünnung	pSer129 1:10.000 (PET Blot nur polyklonal)	10D2	pSer129 1:10.000 monoklonal (PET Blot)
Vorbehandlung	250 μ g/ml Proteinase K	≥ 10 μ g/ml Proteinase K	Keine Vorbehandlung oder Ameisensäure
Organabschnitt	Magen, Ileum, Ösophagus	Kolon, Jejunum	Duodenum, Appendix, Rektum
Lokalisation	Muscularis Mucosae, Submukosa, Tunica muscularis, Subserosa	Submukosa oder Tunica muscularis	Bewertung der Mukosa allein
Ausmaß	Möglichst umfangreiche Resektate	Resektate im Zentimeterbereich	Stanz- oder Zangenbiopsien
Auswertung	Gesamtpräparat ≥ 2 positive	10 HPF in der IHC ≥ 1 positives	10 HPF im PET Blot
Interpretation/ Diagnosestellung	Gesichtsfelder pro 10 HPF unter Beachtung von Artefakten	Gesichtsfeld pro 10 HPF unter Beachtung von Artefakten	Jegliche Immunreaktivität führt zur Diagnose

Unsere Überlegungen zur adäquaten Methodik sind in Tabelle 36 zusammengefasst und sollen im Folgenden erläutert werden. Die einzelnen Ergebnisse waren abhängig von der Färbemethode (IHC vs. PET Blot) sowie geringer vom jeweiligen Antikörper (10D2 vs. pSer129). Es besteht sekundär auch eine Abhängigkeit von der Vorbehandlung, da der PET Blot und die IHC sich im Wesentlichen durch die Proteinase-K-Konzentration – im PET Blot 250 μ g/ml im Vergleich zu 10 μ g/ml bzw. keine Vorbehandlung in der IHC – unterscheiden. Geeignete Organe scheinen insbesondere Magen und Ileum zu sein (Empfehlung 4.), da sich in diesen die höchste Dichte an aggregiertem α Syn fand (Abbildung 29) und diese auch zu einer adäquaten Sensitivität und Spezifität führte (Tabelle 38). Duodenum, Appendix und Rektum zeigten hingegen kaum Immunreaktivität; Kolon und Jejunum nahmen eine intermediäre Stellung ein sowohl hinsichtlich Immunreaktivität als auch hinsichtlich Sensitivität und Spezifität. Submukosa und Muskularis erwiesen sich als miteinander vergleichbar geeignete Ziele bei statistisch nicht-signifikant höherer Immunreaktivität in der Submukosa. Resektate erwiesen sich als geeigneter als Stanz- oder Zangenbiopsate (siehe vorangegangenes Kapitel; Empfehlung 6).

Die höchste Dichte an Immunreaktivität im Vergleich je zehn konsekutiver Gesichtsfelder fand sich in unserer Diagnosegruppe bei einem IHC-Protokoll mittels monoklonalem Antikörper pSer129 1:10.000 und PK-Vorbehandlung, wenngleich statistisch nicht-signifikant zu anderen IHC-Protokollen (siehe Abbildung 31). Die geringste Dichte ergab sich im PET Blot in den Protokollen unter Auswertung von 10 HPF (Tabelle 34 und Tabelle 49), da nur der aggregierte Anteil des α Syn dargestellt wurde. In dieser vergleichenden Auswertung zeigte sich für das Ileum ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Immunreaktivität der PET-Blot- und IHC-Protokolle (Tabelle 59). Hinsichtlich Sensitivität und Spezifität war das IHC-Protokoll mittels pSer129 ohne Vorbehandlung jedoch trotz hoher Dichte an Immunreaktivität den Protokollen mit PK-Verdau unterlegen (Tabelle 34 und Tabelle 37). Dies spricht erneut für eine relevante unspezifische Immunreaktion dieses Protokolls ohne jegliche Kontrolle für Aggregatpathologie.

In einem Beispielprotokoll des Magens erreichte das PET-Blot-Protokoll (Empfehlung 1. und 3.) via pSer129 und systematischer Whole-slide-Evaluation der Submukosa und Muskularis (Empfehlung 5.) mit 93,8 % die beste Sensitivität und gleichzeitig mit 76,9% eine der IHC überlegene Spezifität (Tabelle 41). In einem Szenario, in dem mindestens 2/10 spezifisch immunreaktive Gesichtsfelder zur Diagnose erforderlich waren, erreichte das gleiche Protokoll mit 81,3 % Sensitivität und 92,3 % Spezifität in beiden Kategorien gute bis exzellente Werte. Die IHC-Protokolle waren durchweg unterlegen. Die PET-Blot-Protokolle in Auswertung von je zehn Gesichtsfeldern zeigten bei 100 % Spezifität eine stark unterlegene Sensitivität. 10D2 war pSer129 in Sensitivität und Spezifität protokollabhängig gleichwertig bis leicht unterlegen. Wir schlussfolgern, dass pSer129 dem Antikörper 10D2 zur Untersuchung des GIT auf α -Synuklein-Aggregationskrankheiten vorzuziehen ist (Empfehlung 2.). Die Auswertung des gesamten Präparates ist der Auswertung von 10 HPF überlegen (Empfehlung 7.). Je nach klinischer Fragestellung können zur Diagnostik einer α -Synuklein-Aggregationskrankheit strengere Anforderungen in Form von mindestens 2/10 spezifisch immunreaktiven Gesichtsfeldern gestellt werden, um die Spezifität zu verbessern und im PET Blot nahe 100 % zu bringen (Empfehlung 8.; Tabelle 42). Dies wird insbesondere für die klinisch relevante Abgrenzung von anderen Bewegungsstörungen relevant sein, wofür eine verminderte Sensitivität in Kauf genommen werden mag.

In einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe zur α Syn-Neuropathologie der Glandula submandibularis (GORBACHUK, 2023) 10D2 gegenüber pSer129 in Sensitivität und Spezifität überlegen, was von den hier vorgelegten Ergebnissen abweicht. Dies könnte durch Kreuzreaktivität mit Antigenen des Zellkerns oder Proteinen der Unterkieferspeicheldrüse bedingt sein, da es sich hierbei um eine bekannte Schwäche der Antikörper gegen phosphoryliertes α Syn handelt (FAYYAD et al., 2020). Allerdings zeigte sich in unseren Vorversuchen mit der monoklonalen Variante des Antikörpers (ab51253 bzw. EP1536Y) auch starke unspezifische Kreuzreaktivität des Präparates, was diesen im PET Blot zur Untersuchung von Präparaten des GIT disqualifizierte. Dies galt jedoch nicht für die IHC und im PET Blot konnte die polyklonale Variante (ab59264) problemlos etabliert werden. Die Phosphorylierung an Serin 129 wurde als „dominante pathologische Modifikation“ beschrieben (ANDERSON et al., 2006). Jedoch sehen wir trotz leichter Überlegenheit dieses Antikörpers keine „krankheitsspezifischen Pathologie“ für enterische Präparate, da die Spezifität gegenüber 10D2 nicht überlegen war. Dennoch ergibt sich mit pSer129 aufgrund seiner hohen Sensitivität ein attraktiver Antikörper zur Untersuchung des GIT auf α -Synuklein-Aggregationskrankheiten.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur ist durch den Umstand erschwert, dass die Methoden zwischen Arbeitsgruppen und einzelnen Studien äußerst heterogen sind (Auflistung in Tabelle 48 im Anhang). Zwei Studien, welche für Phosphorylierungsstatus kontrolliert via Proteinase K für Aggregate je nach Konzentration zumindest teilkontrolliert haben, konnten Angaben zur Sensitivität und Spezifität machen: In einer immunhistochemischen Studie fand sich unter mehreren Färbemethoden und unterschiedlichen Untersuchern keine Methode, die gleichzeitig eine Sensitivität und Spezifität von über 80 % aufwies (CORBILLÉ et al., 2016). Dies trifft auch auf unsere IHC-Versuche zu, unter denen ein Protokoll via pSer129 und PK-Vorbehandlung mit 70,60 % Sensitivität und 69,60 % Spezifität die höchsten Werte erreichte; auch im PET Blot in Whole-slide-Evaluation blieben wir mit 74,10 % Sensitivität und 82,60 % Spezifität hinter dem Ideal zurück (Tabelle 37). Lediglich in einer Subanalyse der Magen-Präparate und mit mindestens 2/10 positiven Gesichtsfeldern als Anforderung an eine Diagnose konnte das genannte PET-Blot-Protokoll eine Sensitivität von 81,3 % und Spezifität von 92,3 % aufbringen. In einer anderen Studie, welche auch den PET Blot als Methode nutzte, fand sich eine Spezifität von 67 % und Sensitivität von 39 % gegen aggregiertes α Syn, gegen aggregiertes und phosphoryliertes α Syn sogar nur 14 % Sensitivität (RUFFMANN et al., 2018). RUFFMANN et al. (2018) wies ebenfalls darauf hin, dass bisherige Studien mit Spezifitäten zwischen 0 % und 100 % hochgradig heterogen waren. Diese Unterschiede könnten dadurch zustande kommen, dass diese Studien verschiedene Gewebe mit entsprechend unterschiedlicher α Syn-Prävalenz (vgl. Abbildung 29) untersucht und miteinander verglichen haben. So nutzten z. B. die beiden zuletzt genannten Studien Stanzbiopsate des Kolons (CORBILLÉ et al., 2016) bzw. verschiedene Resektatgewebe, davon 62 % Kolon (RUFFMANN et al., 2018). Unsere Werte hingegen ergaben sich aus post-mortem gewonnenen Resektaten für sämtliche Abschnitte des GIT aufgeschlüsselt. Weiterhin wurden auch unterschiedliche Vorbehandlungen und Antikörper genutzt, was die Vergleichbarkeit weiter erschwert. Leider wurden auch nur selten die als positiv bzw. negativ gewerteten Muster morphologisch definiert, weshalb je nach Studie die Artefaktlastigkeit kaum abschätzbar ist. Schließlich können auch Sensitivität und Spezifität je nach auswertendem Forscher bzw. Labor erheblich schwanken (BEACH et al., 2016b; CORBILLÉ et al., 2016). Wir empfehlen daher für die klinische Praxis, bei der neuropathologischen Beurteilung die Auswertung nur durch mit der Neuropathologie des GIT gut vertraute (Neuro-)Pathologen durchführen zu lassen. Auch ist eine gute Kenntnis morphologischer Charakteristika der α Syn-Pathologie und typischer Artefakte notwendig, wobei wir auf unsere Ergebnisse und die weiterer Arbeitsgruppen (CHUNG et al., 2016; RUFFMANN et al., 2018; SHIN et al., 2018) verweisen.

Welches ist nun das diagnostische Verfahren der Wahl? Aufgrund guter Werte bezüglich Sensitivität und Spezifität empfehlen wir den Antikörper pSer129 zur Anwendung im PET Blot mit 250 μ g/ml Proteinase-Vorbehandlung. Hierbei sollte das gesamte Präparat systematisch entlang der erfassten Submukosa und Muscularis mucosae sowie entlang des Plexus myentericus zwischen Ring- und Längsmuskelschicht auf Immunreaktivität untersucht werden. Mindestens eine Struktur sollte dabei Immunreaktivität mit a) klar definierter Morphologie, b) plausibler anatomischer Lage und c) passender Farbgebung aufweisen. Der befundende Forscher oder Pathologe sollte besonderes Augenmerk auf artefizielle Reaktivitätsmuster legen, welche durch Verwechslung mit spezifischer Immunreaktivität die Auswertung verfälschen können. Die IHC-Protokolle ohne Vorbehandlung können wir nicht und auch diejenigen mit nur eingeschränkt zur enterischen

Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten empfehlen. Ein sicherer Aggregatnachweis (z. B. mittels PET Blot mit striktem Verdau nicht aggregierten α -Synukleins) ist aufgrund der geringen α -Synuklein-Aggregatlast im GIT anhand von Biopsien nicht sinnvoll.

7.3 Zusammenfassung: Gastrointestinale Biopsien als Biomarker?

In der Erforschung der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten wurde seit Mitte der 2000er-Jahre vermehrt der Darm als potentieller Ausgangspunkt der Ätiopathogenese diskutiert. Dies mag mit den in dieser Zeit publizierten Ergebnissen zum prionoiden Verhalten des α Syn (KORDOWER et al., 2008; LI et al., 2008) und zum Staging (BEACH et al., 2009; BRAAK et al., 2006b) zusammenhängen, die schließlich zur Dual-Hit-Hypothese (HAWKES et al., 2007, 2009) und der aktuellen Diskussion um einen „Body-First-Parkinson“ führten (BORGHAMMER, VAN DEN BERGE, 2019; HORSAGER et al., 2020). Ein Ziel unserer Studie war es, explorativ Färbemuster und α Syn-Gradienten zu befunden und eine Korrelationsanalyse durchzuführen, um die Pathophysiologie der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten besser zu verstehen und krankheitsspezifische Muster zur Verbesserung der neuropathologischen Diagnostik aufzufinden. Im Folgenden sollen unsere Forschungsfragen kompakt beantwortet werden:

- ❖ Welche spezifischen und unspezifischen Färbemuster finden sich im Gastrointestinaltrakt?

Lewy-Neuriten waren aufgrund ihrer eindeutigen Morphologie leicht abgrenzbar als spezifischer Marker der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Auch der „grobkörnige“ Aspekt der Lewy-Pathologie in Ganglien war bei uns wie auch in früheren Publikationen ein zuverlässiges Muster. Durch Analogie zu unseren ZNS-Autopsieproben ohne Vorbehandlung konnten wir ein häufig beschriebenes „synaptisches“ Muster der Ganglien als am ehesten artefiziell, d. h. durch fehlende Kontrolle für Aggregate bedingt, herausstellen. Insbesondere mit der Methode PET Blot fanden sich bisher keine Studien, welche systematisch die Morphologie der α Syn-Pathologie außerhalb der Mukosa beschrieben. Diesbezüglich konnten wir besonders die zur IHC analoge grobkörnige Pathologie sowie die (gefäßbegleitenden) Lewy-Neuriten als spezifische Pathologie herausarbeiten. Im PET Blot beschrieben wir diverse unspezifische Muster wie z. B. Basalmembranreaktivität. Auch ein „flusenartiges“ Muster, welches nur unter Verwendung der monoklonalen Variante des Antikörpers pSer129 auftrat, muss strikt von spezifischer Immunreaktivität unterschieden werden. Im Rahmen der neuropathologischen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten mittels Präparaten des GIT muss gezielt auf Artefakte geachtet werden, um einen hohen Qualitätsstandard sicherstellen zu können.

- ❖ Folgt das α -Synuklein-Verteilungsmuster einem Gradienten?

Entlang des GIT stachen insbesondere Magen und Ileum mit hoher Dichte an Immunreaktivität heraus, was auch der Kontrolle für Aggregate und Phosphorylierung standhielt. Beide Organe werden in Bezug auf die „prionoiden“ α -Synuklein-Aggregationskrankheiten wie auch auf PrP^{Sc} als pathophysiologisch relevante Triggerpunkte der α Syn-Pathologie diskutiert. Zur Appendix wie auch zum Kolon hingegen fanden sich widersprüchliche Ergebnisse. Obwohl vielfach von einem rostro-kaudal abnehmenden Gradienten der α Syn-Verteilung entsprechend dem putativen Innervationsmuster des Vagusnerven gesprochen wurde, konnten wir diesen Gradienten weder in einer Analyse der Literatur nachvollziehen noch das daraus abzuleitende α Syn-

Verteilungsmuster replizieren. In der Muskularis und Submukosa zeigte sich eine vergleichbare Menge an Immunreaktivität. Es fand sich jedoch ein statistisch nicht-signifikanter Gradient zugunsten der Submukosa. Während in der Muskularis Immunreaktivität am häufigsten innerhalb des Plexus myentericus zu finden war, entdeckten wir in der Submukosa – insbesondere im PET-Blot-Verfahren – häufig perivaskuläre Lewy-Neuriten. Wir postulieren somit einen non-linearen Gradienten gleichsam für Gesamt- α Syn sowie jeweils aggregierte und phosphorylierte Form des Proteins. Lokale Maxima finden sich im Ösophagus, Magen und Ileum mit gleichförmiger Verteilung im enterischen Nervensystem zwischen Submukosa und Muskularis.

❖ Korreliert das Ausmaß der α -Synuklein-Pathologie mit der Erkrankungsdauer?

Wir fanden keinerlei Korrelation zwischen Alter, Krankheitsdauer, Demenz und gastrointestinaler Symptomatik mit der α Syn-Immunreaktivität des GIT unter Verwendung der Methoden IHC und PET Blot. Die fehlende Korrelation mit Alter und Krankheitsdauer ist möglicherweise auf die in unserer Diagnosegruppe überwiegende Endstadium-Pathologie nach Braak zurückzuführen und gut mit früheren Untersuchungen vereinbar. Dass jedoch entgegen früheren Untersuchungen auch keinerlei Korrelation zwischen Immunreaktivität und GIT-Symptomen vorliegt, könnte mit der Auswahl unserer Kontrollen zusammenhängen: im Gegensatz zu vielen epidemiologischen Studien waren unsere Kontrollen keine gesunden Probanden, sondern ein dediziert aufgrund differentialdiagnostischer Überlegungen ausgewähltes Kollektiv mit Patienten, welche zum Erkrankungszeitpunkt vergleichbare Risikofaktoren für Symptome wie Obstipation aufwiesen. Die fehlenden Korrelationen stellen nicht zuletzt die kausal-pathophysiologische Rolle der im GIT auffindbare Lewy-Pathologie, auch nach Kontrolle für Phosphorylierung und Aggregate, in Frage.

❖ Wie groß muss eine Biopsie mindestens sein?

Anhand von zehn Gesichtsfeldern war in keinem unserer Protokolle eine hinreichend sichere Diagnostik möglich. Da auch Stanz- und Zangenbiopsien typischerweise nur geringe Anteile an Submukosa bzw. Muskularis enthalten, schließen wir, dass Biopsien nicht geeignet zur gastrointestinalen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten sind. Vollwandresektate sind die offensichtliche Alternative. Diese können als Nebenprodukt viszeralchirurgischer Eingriffe prospektiv gewonnen oder aus zurückliegenden Operationen aufgearbeitet werden. Zur Erforschung einerseits der diagnostischen und andererseits der prädiktiven Wertigkeit viszeralchirurgischer Resektate in der Routinediagnostik empfehlen wir nun klinisch-prospektive Studien. Wir präferieren ein Design, welches auch Aussagen hinsichtlich einer potentiellen Frühdiagnostik zulässt, z. B. durch Einschluss von Patienten mit REM-Schlaf-Verhaltensstörung.

❖ Welches ist das neuropathologische Diagnostikverfahren der Wahl?

Sowohl Muskularis als auch Submukosa sind unter Beachtung der spezifischen α Syn-Pathologie adäquate Ziele neuropathologischer Diagnostik. Besonders Ileum, Magen und Ösophagus, in geringerem Ausmaß aber auch Jejunum und Kolon lassen prinzipiell bei Patienten mit α -Synuklein-Aggregationskrankheit pathologische Proteinablagerungen im enterischen Nervensystem erkennen. In einem Protokoll mittels Whole-Slide-Evaluation der Submukosa und Muskularis des Magens (PET Blot mit 250 μ g/ml PK, pSer129) konnten wir unter Voraussetzung von mindestens 2/10 positiven Gesichtsfeldern pro Resektat eine Sensitivität von

81,3 % und Spezifität von 92,3 % erreichen. Ein immunhistochemisches Protokoll (IHC, 10 µg/ml PK, pSer129) besaß in Auswertung von zehn Gesichtsfeldern und ansonsten gleichen Voraussetzungen eine niedrigere Sensitivität von 62,5 % und Spezifität von 76,9 % (Tabelle 42). Protokolle mittels 10D2 sowie solche ohne Proteinase-Vorbehandlung sehen wir als unterlegene Methoden an. Insgesamt ist also der PET Blot eine überlegene Methode hinsichtlich Sensitivität und Spezifität, was sich durch die adäquate Kontrolle für die spezifische Aggregat-Pathologie erklären lässt. Jedoch muss beachtet werden, dass es sich um eine arbeitsintensive Methode handelt, welche zwar durchaus in den Laboralltag integriert werden kann, jedoch entsprechende Expertise und Kapazitäten erfordert. Für die IHC wie auch für den PET Blot sind die Kenntnis über spezifische und unspezifische Reaktivitätsmuster des GIT unerlässlich.

7.4 Limitationen

Diese Studie unterliegt als neuropathologische Fall-Kontroll-Studie (d. h. retrospektive Querschnittsstudie an Post-mortem-Gewebe) notwendigen Limitationen. Bestimmte Fragen hinsichtlich der Pathophysiologie, wie z. B. über die Ausbreitung der Lewy-Pathologie, sowie auch klinische Fragestellungen nach einer möglichen Frühdiagnostik können aufgrund dieser Designentscheidung in unserer Studie nicht abschließend beantwortet werden. Darüber hinaus zeigten die meisten unserer Patienten ein hohes Braak-Stadium (siehe Kapitel „Staging“), was nicht dem typischen Kollektiv einer neurologischen Klinik entspricht. Wir gehen auch von einem Selektions-Bias aus, da in früheren Studien unter anderem für die Faktoren „atypische Symptome“, „männliches Geschlecht“, „Tod in jungem Alter“ und „Todesort (insbesondere im Krankenhaus) gezeigt wurde, dass sie mit einer höheren Autopsierate bei Parkinson-Patienten einhergehen (MARAGANORE et al., 1999). Schwache Ausprägungen und insbesondere subklinische Verläufe sind somit in unserer Studie unterrepräsentiert. Da unsere Präparate durch dieselben Forscher gefärbt (JS) und ausgewertet (JS und WSS) wurden, liegt keine Verblindung bezüglich der Diagnose und des jeweils betrachteten Organs vor. Dieser Limitation wurde durch eine regelmäßige, gegenseitige Validierung der Auswertungsergebnisse im Vier-Augen-Prinzip sowie durch eine Verschlüsselung der Fälle in Fallnummern partiell entgegengewirkt. Unsere Diagnosefälle waren sämtlich 50 Jahre alt oder älter, was zwar zu einer Homogenität unserer Gruppe und guter Vergleichbarkeit zu unseren Kontrollfällen führt, jedoch die externe Validität – insbesondere in Hinblick auf eine Frühdiagnostik an jungen Patienten – einschränkt. Schließlich haben wir die Mukosa aufgrund bekannter Artefaktlastigkeit und geringer Dichte an neuronalen Strukturen bewusst nicht ausgewertet, was jedoch ebenso die Vergleichbarkeit mit anderen Studien, insbesondere solchen, deren Ergebnisse sich auf Biopsatgewebe beziehen, einschränkt.

Diesen Limitationen stehen diverse Stärken unserer Forschung gegenüber. So haben wir für aggregiertes – und nicht bloß akkumuliertes – α Syn kontrolliert, indem wir mit PET Blot eine etablierte und aggregat-spezifische Methode genutzt und diese dem bisherigen Goldstandard IHC mit Proteinase-K-Verdau (BEACH et al., 2016b) gegenübergestellt haben. Die Vorbehandlung via Proteinase K war dabei einheitlich definiert mit jeweils 0 oder 10 µg/ml in der IHC bzw. 250 µg/ml im PET Blot. Durch die Verwendung von Antikörpern sowohl gegen α Syn (10D2) als auch gegen phosphoryliertes α -Synuklein (pSer129) konnten wir für die meistdiskutierte posttranslationale Modifikation kontrollieren. Durch Nutzung der IHC einerseits und des

PET Blot in Kombination mit H.-E.-Präparaten andererseits konnte jederzeit eine gute anatomische Auflösung in der Auswertung gewährleistet werden. Um unsere Methodik möglichst transparent zu gestalten, haben wir dabei in einem ersten Schritt spezifische und unspezifische Reaktivitätsmuster herausgearbeitet und in Bilderserien festgehalten, bevor eine quantitative Auswertung dieser nun wohldefinierten Muster stattfand. Eine Auswertung der Präparate sowohl durch den Doktoranden als auch durch einen Facharzt für Neuropathologie erhöhte die Inter-Rater-Reliabilität unserer Ergebnisse. Die Homogenität der Diagnosegruppe bezüglich Braak-Stadien und höherem Alter spricht für eine gute interne Validität der Studie. Die statistische Ähnlichkeit zwischen den Fällen und von uns gewählten Kontrollen mit neurodegenerativen Differenzialdiagnosen kontrolliert für diverse Confounder wie z. B. Polypharmazie und Bettlägerigkeit. Hierdurch kann eine vergleichbare Lebens- und Krankheitssituation der Fälle angenommen werden, was im Gegensatz zu gesunden Kontrollprobanden steht, welche in epidemiologischen Studien häufig als Vergleich genutzt werden. Da sich unsere Studie an publizierten Empfehlungen bezüglich der Methodik (BEACH et al., 2016b; RUFFMANN, PARKKINEN, 2016) orientiert, die Braak-Stadien und übliche statistischen Maße bestimmt hat, ist in diesen Aspekten eine bestmögliche Vergleichbarkeit mit der ansonsten heterogenen Literatur gegeben. Insbesondere konnten wir nach Vorversuchen an Darmpräparaten ein ähnliches Protokoll wie GORBACHUK (2023) etablieren, die mit ihrer Analyse der Glandula submandibularis bereits eine vielversprechende diagnostische Option präsentieren konnten. Insgesamt halten wir unsere Studie somit trotz inhärenter Schwächen des retrospektiven Designs, Bias und unvollständiger Verblindung für einen relevanten Beitrag zur Biomarker-Forschung an den α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Wir uns erhoffen uns, dass sie durch die konsequent transparente Methodik und präzise bildmorphologische Dokumentation ihren Platz in der Literatur finden wird.

7.5 Ausblick

Diese Dissertation hatte das Ziel, anhand der Auswertung von Proben des GIT zu zeigen, inwiefern diese als Biomarker zur neuropathologischen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten genutzt werden können. Die hier geleistete Grundlagenforschung soll zum besseren Design klinisch-neuropathologischer Studien zur Früherkennung und Biomarker-Suche der neurodegenerativen Krankheiten beitragen. Der Darm wird als Ursprung des Krankheitsprozesses diskutiert (BRAAK et al., 2006b) und es konnte gezeigt werden, dass phosphoryliertes α -Synuklein bis zu 20 Jahre vor Diagnose im GIT mittels IHC detektierbar ist (STOKHOLM et al., 2016). Dies macht eine enterische Frühdiagnostik plausibel und in Hinblick auf die bisher nicht zufriedenstellenden Möglichkeiten der klinischen Diagnostik (RIZZO et al., 2016) wünschenswert. So könnte die derzeit primär klinische Diagnostik künftig sinnvoll durch die Aufarbeitung gastrointestinaler Resektatgewebe ergänzt werden. Eine frühe und akkurate Diagnostik ist schließlich auch für die Entwicklung krankheitsmodifizierender Therapien (DAWSON, DAWSON, 2019) und Prävention (BERG et al., 2022) essentiell. Zumindest konzeptionell ist eine solche Therapie auch denkbar, da z. B. für PD eine Phase (potentiell reversibler) synaptischer Dysfunktion nachgewiesen wurde, welche dem Zelltod dopaminerger Neurone vorangeht (KRAMER, SCHULZ-SCHAEFFER, 2007). Dementsprechend könnte eine kausale Therapie des PD und potentiell weiterer neurodegenerativer Krankheiten bereits in diesem Stadium ansetzen.

Schließlich bestünde auch für die nicht-motorischen Symptome mittels Frühdiagnostik erstmalig die Möglichkeit, diese systematisch unter Berücksichtigung ihrer Pathophysiologie zu therapieren. Gegebenenfalls könnte auch eine konventionelle Therapie (z. B. mittels MAO-Hemmern oder Levodopa mit peripherem Decarboxylasehemmer) bereits früh in niedriger Dosis oder geringer Frequenz begonnen werden (POSTUMA, BERG, 2019).

Der PET Blot kann in neuropathologischen Laboren parallel zur konventionellen Diagnostik wie der IHC und dem Western-Blot durchgeführt werden, da die benötigten Materialien und Techniken grundsätzlich ähnlich sind. Das Verfahren ist sensitiver als die IHC zur Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten bei gleichzeitig überlegener Aggregatdetektion und besserer anatomischer Auflösung als andere Blot-Verfahren. Somit handelt es sich um ein im neuropathologischen Alltag praktikables Verfahren zum Nachweis von α Syn, welches unter anderem an gastrointestinalen Präparaten sowie der Glandula submandibularis die klinischen Daten sinnvoll ergänzen kann. Neben den genannten Zielorganen gibt es weitere Lokalisationen wie Blut (FOULDS et al., 2013) und Liquor (KALIA, 2018), welche in Zukunft als Biomarker Unterstützung in der Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten wie PD, DLB und PDD bieten könnten (OKUZUMI et al., 2023). Prospektive klinische Studien mit Einschluss früher (prä-)klinischer Stadien sind nun notwendig, um unsere Ergebnisse in vivo zu validieren und den zeitlichen Aspekt einer potentiellen Frühdiagnostik untersuchen zu können.

Neben dem enterischen Fokus auf frühdiagnostische Maßnahmen gibt es eine Fülle alternativer Methoden, Targets und potentiellen Biomarkern. Breit diskutiert sind hierunter einerseits dermale Färbungen auf α Syn, welche für phosphoryliertes α Syn kontrolliert in Patienten mit PD und REM-Schlaf-Verhaltensstörung eine Sensitivität von 55.6 % bzw. 80 % bei gleichzeitig exzellenter Spezifität nachweisen konnten (DOPPLER et al., 2017; PENG et al., 2023). Kritisch anzumerken bleibt jedoch, dass bislang kaum eine Kontrolle für Aggregate erfolgte. Auch fehlt derzeit ein pathophysiologisches Modell, das plausibel darlegt, weshalb das Protein in der Haut früher als in anderen Organen nachweisbar sein sollte. Äußerst erwähnenswert sind weiterhin die rezenten diagnostischen Erfolge an Serum-Proben (OKUZUMI et al., 2023), welche erste Autoren bereits zum Einläuten einer neuen Ära der Biomarker im PD verleiteten (BERG, KLEIN, 2023). Hier wurden ähnlich unserer Studie methodische Anleihen aus der Prionforschung genommen, um α Syn-Aggregate darzustellen. Ob sich diese vielversprechenden Ergebnisse an weiteren Kohorten bestätigen lassen, ob sich ein weiterer diagnostischer Nutzen durch Kontrolle für phosphoryliertes α Syn einstellt und ob die Methodik auch zur Frühdiagnostik geeignet ist, verfolgen wir mit Interesse.

Hinsichtlich der Pathophysiologie fanden sich in unserem Kollektiv wie auch in weiteren (JELLINGER, 2019) relevante Unterschiede zur von BRAAK et al. (2004) vorgeschlagenen Hypothese einer („rostro-kaudalen“) Ausbreitung entlang neuroanatomischer Bahnen. Nicht zuletzt die vielzitierte Prion-Hypothese (BRUNDIN, MELKI, 2017) steht damit zur Diskussion (BEEKES, 2021; SURMEIER et al., 2017). Und auch die in der IHC mikroskopisch sichtbare Lewy-Pathologie wird längst in seiner pathophysiologischen Relevanz in Frage gestellt (CALNE, MIZUNO, 2004) sowie mittlerweile als wahrscheinliches pathologisches Agens abgelöst zugunsten der synaptischen α Syn-Aggregatpathologie (SCHULZ-SCHAEFFER, 2015). Offen bleibt ein umfassendes Modell der Ätiopathogenese der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten. Unter anderem

selektive neuronaler Vulnerabilität (WONG et al., 2019) sowie autoimmun-inflammatorische (TAN et al., 2020), exogen-toxische (BROWN, 2019) und genetische Ansätze (SINGLETON et al., 2017) sind derzeit wertvolle und allmählich konfluierende Beiträge auf der Suche nach einem neuen Paradigma jenseits der Braak-Hypothesen.

Schließlich bestehen anhaltende Kontroversen angesichts der zunehmenden Erfolge in der frühen Diagnostik neurodegenerativer Krankheiten (FULDA, LYKENS, 2006; URSIN et al., 2021). Dies gilt nicht zuletzt für den paradigmatischen Fall der prädiktiven Huntington-Diagnostik (CRAUFURD, HARRIS, 1986; GOLDMAN, 2020; WIGGINS et al., 1992). Ein solides ethisches Fundament wird folglich unerlässlich sein, um eine verantwortungsvolle Anwendung der neuen Technologien erreichen zu können. Methodisch bietet sich hierzu neben der langfristigen Technikfolgenabschätzung ein Rechtfertigungsdiskurs (GETHMANN, SANDER, 1999) als präemptive Maßnahme gegenüber der Entstehung moralischer Konflikte an. Als diskursive Instrumente stehen hierzu nicht nur die theoretisch bestens fundierten Paradigmen der kantischen Pflichtethik (KANT, 1785, 1797), die diversen Spielarten der Nutzenethik (BENTHAM, 1780; MILL, 1861; SIDGWICK, 1874) und auch der (neo-)aristotelischen Tugendethik (FREDE, 2020; MACINTYRE, 1981; NUSSBAUM, 1987) zur Verfügung. Gerade die besonders klinisch-ethisch etablierte Prinzipienethik (BEAUCHAMP, CHILDRESS, 2019) in Verbindung mit systematischer Kasuistik (JÜTTE, 1992; OTTE, 2003), einem starken Bezug zur Alltagsmoral (SCHNEEWIND, 1963; SIDGWICK, 1874; SINGER, 1986; SLOTE, 1985) und Fragen des ärztlichen Ethos (ASSOCIATION, 2013; PARSA-PARSI, 2017) werden unabdingbar sein, um eine Frühdiagnostik überzeugend zu rechtfertigen. Erste empirisch-ethische Grundlagen hierzu wurden aus den Reihen der Neurologie selbst heraus bereits geschaffen (SCHAEFFER et al., 2020; SCHAEFFER et al., 2021) und lassen auf die rasche Entwicklung eines diskursiv konzipierten, umfassenden und praxistauglichen normativen Rahmens hoffen.

8 Anhang

8.1 Abbildungen

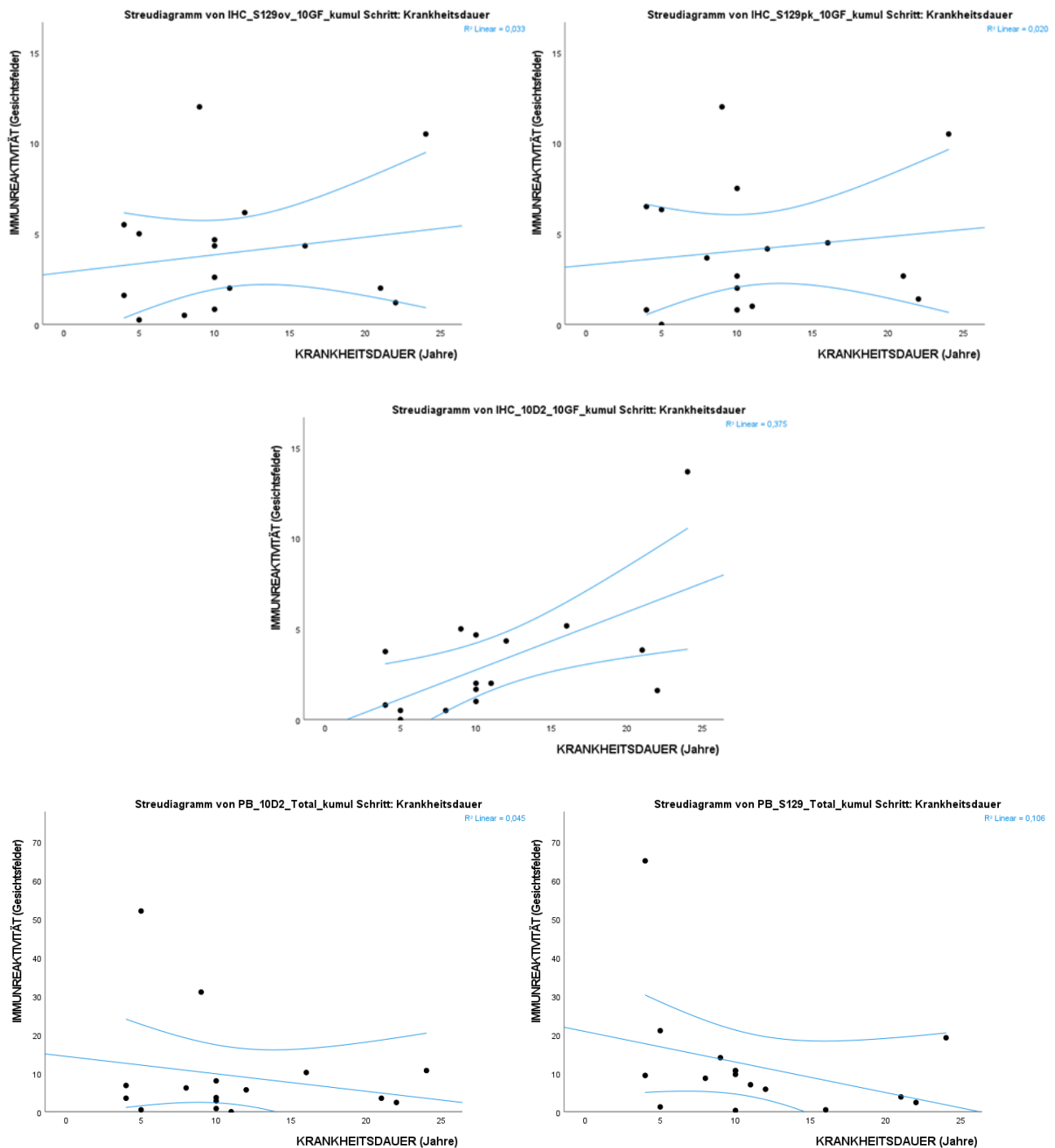


Abbildung 33: Korrelation zwischen Immunreaktivität und Krankheitsdauer: Mäßig positiver Trend in der IHC via 10D2, jedoch fehlende Übereinstimmung mit dem PET Blot. Fälle der Diagnosegruppe, bei denen die Krankheitsdauer von Diagnose bis Tod bekannt war ($n = 16$). Lineare Regression nach Pearson inklusive 95%-Konfidenzintervall sowie davon abgeleitetes Bestimmtheitsmaß r^2 . Obere drei: IHC-Protokolle. Untere zwei: PET-Blot-Protokolle (Whole-slide-Evaluation). Kumulierte Werte aus Submukosa und Muskularis. Kompakte Darstellung in Tabelle 30.

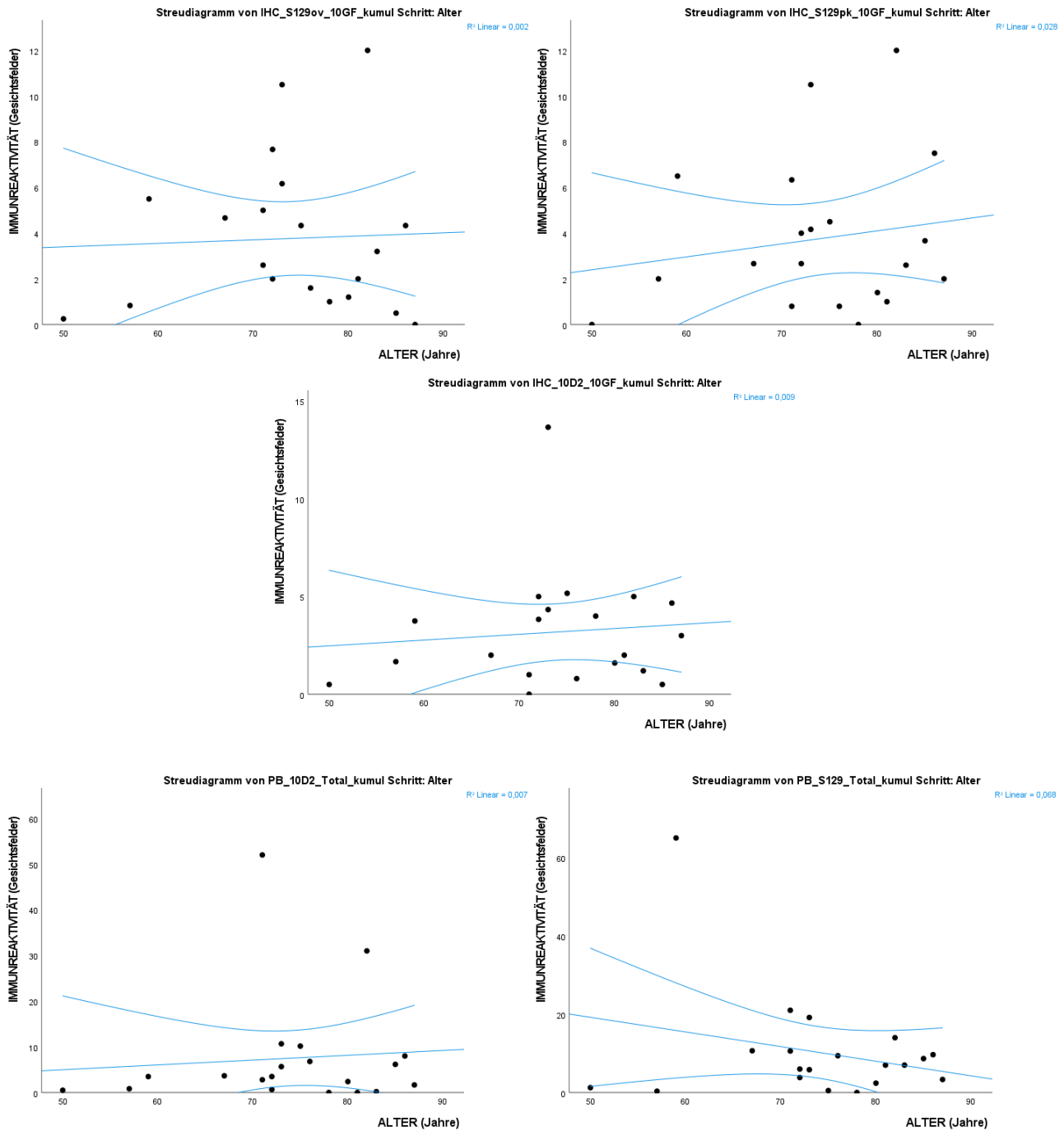


Abbildung 34: Keinerlei Korrelation zwischen Immunreaktivität und Alter. Diagnosegruppe (n = 20). Lineare Regression nach Pearson inklusive 95%-Konfidenzintervall sowie davon abgeleitetes Bestimmtheitsmaß r^2 . Obere drei: IHC-Protokolle. Untere zwei: PET-Blot-Protokolle (Whole-slide-Evaluation). Kumulierte Werte aus Submukosa und Muskularis. Kompakte Darstellung in Tabelle 31.

8.2 Tabellen

Tabelle 47 Anzahl der verwendeten Proben geordnet nach Diagnosegruppen, Autopsiediagnose und betroffenem Organ. Zur besseren Übersicht wurden die Diagnosen weiter nach einer übergeordneten und untergeordneten Gruppe systematisiert. Doppelnennungen wurden vermieden, die entsprechenden Bereiche ausgegraut. Legende: AD = Morbus Alzheimer; ALS = Amyotrophe Lateralsklerose; CBD = Corticobasale Degeneration; DLB = Dementia mit Lewy bodies; FTD = Frontotemporale Demenz; LE = Lymphatische Enzephalopathie; MSA = Multisystematrophie; PD = Morbus Parkinson; PSP = Progressive Supranukleäre Blickparese; VPD = Vaskuläres Parkinsonoid

Übergeordnete Gruppe	Untergeordnete Gruppe	Autopsie-Diagnose	Organ	#Organ/Diagnose	#Organ/Untergruppe
Neurodegenerative Krankheiten	FTD-Spektrum	ALS	Magen	1	7
			Duodenum	1	7
			Ileum	1	8
		CBD	Magen	3	
			Duodenum	3	
			Jejunum	2	5
			Ileum	3	
			Appendix	1	4
			Kolon	3	6
		PSP	Magen	3	
			Duodenum	3	
			Jejunum	3	
			Ileum	4	
			Appendix	3	
			Kolon	3	
	Neuronale α -Synuclein-aggregation	DLB	Ösophagus	1	2
			Magen	3	16
			Duodenum	3	14
			Ileum	5	16
			Appendix	2	6
			Kolon	4	9
			Rektum	1	11
		PD	Ösophagus	1	
			Magen	13	
			Duodenum	11	
			Jejunum	11	11
			Ileum	11	
			Appendix	4	

			Kolon	5	
			Rektum	10	
	Sonstige α -Synuclein aggregation	MSA	Ösophagus	1	1
			Magen	1	1
			Duodenum	1	1
			Jejunum	1	1
			Ileum	1	1
			Appendix	1	1
			Rektum	1	1
	Sonstige Neuro- degeneration	AD	Magen	1	1
			Duodenum	1	1
			Jejunum	1	1
			Ileum	1	1
			Kolon	1	1
			Rektum	1	1
Neurovasku- läre Krankhei- ten	Neurovaskulär	Apoplex	Magen	1	3
			Duodenum	1	3
			Ileum	1	4
			Appendix	1	2
		VPD	Magen	2	
	Duodenum		2		
	Ileum		3		
	Appendix		1		
	Kolon		1	1	
	Rektum		2	2	
Weitere Krankheiten	Sonstige	LE	Magen	1	1
			Duodenum	1	1
			Jejunum	1	1
			Ileum	1	1
Gesamtzahl				154	

Tabelle 48: Morphologische Studien des Gastrointestinaltraktes bezüglich der α -Synuklein-Immunreaktivität. Es herrscht eine Heterogenität der Vorbehandlung, verwendeter Antikörper sowie Ausmaß und Umfang der Proben zwischen den Studien, sodass ein Vergleich der Ergebnisse erschwert wird. „ α Syn“ = Antikörper gegen α -Synuklein; „p- α Syn“ = Antikörper gegen phosphoryliertes α -Synuklein

Arbeitsgruppe	IHC	PET-Blot	Vorbehandlung	α Syn	p- α Syn	Gewebe
LEBOUVIER et al., 2008	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Kolon-Stanzbiopsate
SHANNON et al., 2012	Ja	Nein	Ameisensäure	Ja	Nein	Kolon-Stanzbiopsate
SHANNON et al., 2012	Ja	Nein	Ameisensäure	Ja	Nein	Kolon-Stanzbiopsate
GOLD et al., 2013	Ja	Nein	Ameisensäure	Ja	Nein	Kolon-Autopsieproben
GRAY et al., 2014	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Appendix-Resektate
ITO et al., 2014	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Gastrointestinale Resektate
ALDECOA et al., 2015	Ja	Nein	Ameisensäure	Ja	Ja	Resektate aus Magen, Jejunum, Ileum, Kolon
SPRENGER et al., 2015	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Kolon-Stanzbiopsate
VISANJI et al., 2015	Nein	Ja	Proteinase	Ja	Ja	Kolon-Stanzbiopsate
SÁNCHEZ-FERRO	Ja	Nein	Ameisensäure	Ja	Ja	Magen-Stanzbiopsate
CHUNG et al., 2016	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Kolon- und Magen-Stanzbiopsate
CORBILLÉ et al., 2016	Ja	Nein	Proteinase	Ja	Ja	Kolon-Stanzbiopsate
SHIN et al., 2017	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Resektate aus Magen, Kolon, Rektum
LEE et al., 2018	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Kolon- und Magen-Stanzbiopsate
RUFFMANN et al., 2018	Ja	Ja	Proteinase*	Ja	Ja	Verschiedene Stanzbiopsate und Resektate
SHIN et al., 2018	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Magen-Resektate
PUNSONI et al., 2019	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Verschiedene Stanzbiopsate und Resektate
BU et al., 2020	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Resektate aus Ileum, Kolon, Rektum
HARAPAN et al., 2020	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Dünn- und Dickdarm-Autopsieproben

* Proteinase-Vorbehandlung zwar im PET Blot, nicht jedoch in der Immunhistochemie durchgeführt

Tabelle 49: Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Kumulierte Daten aus der Auswertung von je 10 High-Power-Fields in Submukosa und Muskularis (n = 85).

Diagnosegruppe							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	2,5	8	9,5	1,5	2,5	5,5	21,5
Magen	6,31	4,31	5	1,31	2,25	8,13	18,44
Duodenum	2,71	1,64	2,21	0,57	0,43	5,79	4,43
Jejunum	2,36	3,55	2,73	0,27	0,18	5,82	8,91
Ileum	4,69	4,25	5	0,94	1,25	11,88	14,56
Appendix	1,17	0,67	1,5	0,17	0,17	2,67	1,5
Kolon	2,89	3,44	5,33	0,11	0,44	4,44	7,89
Rektum	2,45	3,09	2,27	0,36	0,27	1,82	3
Summe	22,59	20,95	24,05	3,74	4,99	40,53	58,73

Tabelle 50: Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Kumulierte Daten aus der Auswertung von je 10 High-Power-Fields in Submukosa und Muskularis (n = 69).

Kontrollgruppe							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	2	0	1	0	0	0	0
Magen	1,36	1,36	1,07	0,29	0	0,43	0,64
Duodenum	1,64	0,29	0,71	0	0	0,14	0,43
Jejunum	2,63	1,5	2,13	0	1,25	0,5	1,25
Ileum	1,73	0,13	0,93	0	0	0,67	0,67
Appendix	0,43	0	0,43	0	0,29	0,57	1,14
Kolon	1,13	2,5	0,38	0	0	0,13	0,13
Rektum	4	4,25	1,25	0	0	0,25	0
Summe	12,91	10,03	6,9	0,29	1,54	2,68	4,26

Tabelle 51: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Submukosa der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Auswertung von je 10 High-Power-Fields pro Präparat (n = 85).

Diagnosegruppe, Submukosa							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	1	6	7	1	2	5	14
Magen	53	34	35	15	24	87	179
Duodenum	21	8	13	7	3	51	42
Jejunum	18	24	18	2	1	46	73
Ileum	44	43	42	6	9	82	89
Appendix	6	2	8	1	1	3	5
Kolon	15	20	29	1	1	30	41
Rektum	21	19	19	4	3	13	25
Summe	179	156	171	37	44	317	468
Arithmetischer Mittelwert (Summe / n)	2,11	1,84	2,01	0,44	0,52	3,73	5,51

Tabelle 52: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Muskularis der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Auswertung von je 10 High-Power-Fields pro Präparat (n = 85).

Diagnosegruppe, Muskularis							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	4	10	12	2	3	6	29
Magen	48	35	45	6	12	43	116
Duodenum	17	15	18	1	3	30	20
Jejunum	8	15	12	1	1	18	25
Ileum	31	25	38	9	11	108	144
Appendix	1	2	1	0	0	13	4
Kolon	11	11	19	0	3	10	30
Rektum	6	15	6	0	0	7	8
Summe	126	128	151	19	33	235	376
Arithmetischer Mittelwert (Summe / n)	1,48	1,51	1,78	0,22	0,39	2,76	4,42

Tabelle 53: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Submukosa der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Auswertung von je 10 High-Power-Fields pro Präparat (n = 69).

Kontrollgruppe, Submukosa							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	0	0	0	0	0	0	0
Magen	10	8	7	4	0	6	2
Duodenum	12	3	6	0	0	1	2
Jejunum	11	6	10	0	0	2	1
Ileum	18	1	8	0	0	4	5
Appendix	2	0	1	0	0	0	2
Kolon	5	5	3	0	0	1	0
Rektum	8	7	4	0	0	0	0
Summe	66	30	39	4	0	14	12
Arithmetischer Mittelwert (Summe / n)	1,01	0,45	0,57	0,06	0	0,22	0,17

Tabelle 54: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Muskularis der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper. Auswertung von je 10 High-Power-Fields pro Präparat (n = 69).

Kontrollgruppe, Muskularis							
Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Auswertung	10 High-power fields					Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
Ösophagus	2	0	1	0	0	0	0
Magen	8	11	8	0	0	0	3
Duodenum	11	1	4	0	0	1	0
Jejunum	10	6	7	0	1	2	9
Ileum	8	1	6	0	0	6	5
Appendix	1	0	2	0	2	4	6
Kolon	4	15	0	0	0	0	1
Rektum	3	7	1	0	0	0	0
Summe	47	41	29	0	3	13	24
Arithmetischer Mittelwert (Summe / n)	0,7	0,62	0,42	0	0,04	0,19	0,35

Diagnosegruppe, Submukosa								Präparate
Methode	Immunhistochemie			PET Blot				
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K						
Auswertung	10 High-power fields						Whole-slide	
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	
Ösophagus	1	6	7	1	2	5	14	2
Magen	53	34	35	15	24	87	179	16
Duodenum	21	8	13	7	3	51	42	14
Jejunum	18	24	18	2	1	46	73	11
Ileum	44	43	42	6	9	82	89	16
Appendix	6	2	8	1	1	3	5	6
Kolon	15	20	29	1	1	30	41	9
Rektum	21	19	19	4	3	13	25	11
Summe	179	156	171	37	44	317	468	85
Mittelwert	20	20	19	3	3	38	42	
Mittelwert relativ zur Zahl der Präparate	1,78	1,86	2,15	0,39	0,49	3,24	5,13	

Tabelle 55: Immunreaktive Präparate je Organ auf Einzelfallbasis, Diagnosegruppe (n = 85). Die Matrizen zeigen, welche Präparate im Detail jegliche Immunreaktivität waren. Die IHC-Protokolle beziehen sich je auf 20 Gesichtsfelder (je 10 in Submukosa und Muskularis), PET-Blot-Protokolle auf das gesamte Präparat.

Diagnosegruppe, IHC via pSer129 ohne Vorbehandlung																				
	DLB1	DLB2	iPD1	iPD2	iPD3	PDD1	DLB3	iPD4	PDD2	iPD5	PDD3	DLB4	DLB5	iPD6	DLB6	iPD7	iPD8	iPD9	iPD10	iPD11
Oesophagus	0							1												
Magen		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1		1	1		0	0
Duodenum			0		1	1	1		1	0	1		1	0	0	0	0		1	1
Jejunum			0		1	1		1	1	0	1			0		0	0			1
Ileum		0	0			1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1		1	0
Appendix	0								1	1					1	0	1			
Kolon	0	1				1	1	1			0				1		0		1	
Rektum			1			1		1	0	0	1				0	0		1	1	1

Diagnosegruppe, IHC via 10D2 mit PK-Vorbehandlung																				
	DLB1	DLB2	iPD1	iPD2	iPD3	PDD1	DLB3	iPD4	PDD2	iPD5	PDD3	DLB4	DLB5	iPD6	DLB6	iPD7	iPD8	iPD9	iPD10	iPD11
Oesophagus	1							1												
Magen		1	1	1	1	1	1	0	1	1	1		0	0		1	1		1	1
Duodenum			0		1	0	0		0	0	1		0	0	0	0	0		0	1
Jejunum			1		0	1		0	1	1	1			0		1	0			0
Ileum		1	0			1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1		1	0
Appendix	0								1	1					0	1	0			
Kolon	1	0				1	1	1			1				0		0		0	
Rektum			1			1		1	0	1	1				1	1		1	1	0

Diagnosegruppe, IHC via pSer129 mit PK-Vorbehandlung																				
	DLB1	DLB2	iPD1	iPD2	iPD3	PDD1	DLB3	iPD4	PDD2	iPD5	PDD3	DLB4	DLB5	iPD6	DLB6	iPD7	iPD8	iPD9	iPD10	iPD11
Oesophagus	1							1												
Magen		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		0	0		1	1		0	1
Duodenum			0		1	1	0		1	0	1		1	0	0	0	0		1	1
Jejunum			0		1	1		1	1	1	1			0		1	1			0
Ileum		0	1			1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1		1	0
Appendix	0								1	0					1	0	1			
Kolon	1	1				1	1	1			1				1	1	1		1	
Rektum			0			1		1	1	0	1				1	1		1	1	0

Diagnosegruppe, PET Blot via 10D2, Whole-slide evaluation																				
	iPD1	iPD2	iPD3	iPD4	iPD5	iPD6	iPD7	iPD8	iPD9	iPD10	iPD11	PDD1	PDD2	PDD3	DLB1	DLB2	DLB3	DLB4	DLB5	DLB6
Oesophagus				1											1					
Magen	0	0	0	1	1	0	0	1		1	0	1	1	1		1	1		1	
Duodenum	0		0		0	0	0	1		0	1	1	0	1			1		1	1
Jejunum	0		1	0	1	1	1	1			1	1	1	1						
Ileum	1			1	1	1	1	1		1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
Appendix					1			0							0					1
Kolon				1				1		0		1		1	0	1	0			1
Rektum	0			1	0		0		0	1	0	0	1	1						0

Diagnosegruppe, PET Blot via pSer129, Whole-slide evaluation																				
	DLB1	DLB2	iPD1	iPD2	iPD3	PDD1	DLB3	iPD4	PDD2	iPD5	PDD3	DLB4	DLB5	iPD6	DLB6	iPD7	iPD8	iPD9	iPD10	iPD11
Oesophagus	1							1												
Magen		1	1	0	1	1	1	1	1	1	1		1	1		1	1		1	1
Duodenum			1		1	0	1		1	1	1		1	0	1	0	0		1	1
Jejunum			1		1	1		1	1	1	1			1		0	1			1
Ileum		1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1		1	1
Appendix	0								0	0					1	0	1			
Kolon	0	1				0	1	1			1				1		1		0	
Rektum			1			0		0	0	0	1				1	0		1	0	0

Tabelle 56: Immunreaktive Präparate je Organ auf Einzelfallbasis, Kontrollgruppe (n = 69). Die Matrizen zeigen, welche Präparate im Detail jegliche Immunreaktivität waren. Die IHC-Protokolle beziehen sich je auf 20 Gesichtsfelder (je 10 in Submukosa und Muskularis), PET-Blot-Protokolle auf das gesamte Präparat.

Kontrollgruppe, IHC via pSer129 ohne Vorbehandlung															
	PSP1	AD1	PSP2	ALS1	LE1	vPD1	PSP3	MSA1	HI1	CBD1	CBD2	CBD3	PSP4	vPD2	vPD3
Oesophagus								1							
Magen	0	0	1	0	1			1	1	0	0	0	0	1	1
Duodenum	0	0	0	0	1			0	1	0	0	0	0	0	1
Jejunum	1	0			1		0	0		0	1		1		
Ileum	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
Appendix			0				0	0	1		0		0		1
Kolon	0	1	0				1			0	1	1			1
Rektum		0						1						1	1

Kontrollgruppe, IHC via 10D2 mit PK-Vorbehandlung															
	PSP1	AD1	PSP2	ALS1	LE1	vPD1	PSP3	MSA1	HI1	CBD1	CBD2	CBD3	PSP4	vPD2	vPD3
Oesophagus								0							
Magen	1	0	0	0	0			0	1	0	0	0	1	1	1
Duodenum	0	0	0	0	0			1	0	0	0	0	0	0	1
Jejunum	0	0			1		0	0		0	0		1		
Ileum	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Appendix			0				0	0	0		0		0		0
Kolon	0	1	1				1			1	1	1			1
Rektum		1						1						1	1

Kontrollgruppe, IHC via pSer129 mit PK-Vorbehandlung															
	PSP1	AD1	PSP2	ALS1	LE1	vPD1	PSP3	MSA1	HI1	CBD1	CBD2	CBD3	PSP4	vPD2	vPD3
Oesophagus								1							
Magen	0	0	0	0	1			0	1	0	0	1	0	1	1
Duodenum	0	0	0	0	0			0	1	0	0	0	0	1	1
Jejunum	1	0			0		0	0		0	0		1		
Ileum	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1
Appendix			0				0	0	1		0		0		1
Kolon	0	0	0				0			0	0	1			1
Rektum		0						0						0	1

Kontrollgruppe, PET Blot via 10D2, Whole-slide evaluation															
	PSP1	AD1	PSP2	ALS1	LE1	vPD1	PSP3	MSA1	HI1	CBD1	CBD2	CBD3	PSP4	vPD2	vPD3
Oesophagus								0							
Magen	0	0	0	0	0			0	0	0	0	0	1	1	0
Duodenum	0	1	0	0	0			0	0	0	1	0	0	0	0
Jejunum	0	1			0		0	0		0	1		1		
Ileum	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Appendix			1				0	0	0		0		1		0
Kolon	1	0	0				0			0	0	0			0
Rektum		0						0						1	0

Kontrollgruppe, PET Blot via pSer129, Whole-slide evaluation															
	PSP1	AD1	PSP2	ALS1	LE1	vPD1	PSP3	MSA1	HI1	CBD1	CBD2	CBD3	PSP4	vPD2	vPD3
Oesophagus								0							
Magen	0	0	1	0	0			0	0	1	0	0	0	1	0
Duodenum	1	0	1	0	0			0	0	0	0	0	0	0	0
Jejunum	0	0			0		0	0		0	0		1		
Ileum	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
Appendix			1				0	0	0		0		0		0
Kolon	0	0	0				0			0	0	0			1
Rektum		0						0						0	0

Tabelle 57: Anzahl der immunreaktiven Präparate je Fall und Protokoll in der Diagnosegruppe (n = 85).
Eine weitere Aufschlüsselung nach einzelnen Organabschnitten findet sich in den Matrizen unter Tabelle 55.

Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Auswertung	10 HPF						Total
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
PD1	2	3	2	0	1	1	5
PD2	1	1	0	0	0	0	0
PD3	3	2	3	0	0	1	3
PD4	6	4	6	3	3	5	5
PD5	3	5	3	0	0	4	4
PD6	1	1	0	0	0	2	2
PD7	1	4	3	0	0	3	1
PD8	3	2	5	1	1	5	5
PD9	1	1	1	0	0	0	1
PD10	4	3	4	0	0	3	5
PD11	3	2	2	2	1	3	5
PDD1	6	5	6	3	0	5	3
PDD2	5	4	6	1	2	4	4
PDD3	5	6	6	2	5	6	6
DLB1	0	2	2	1	1	1	1
DLB2	2	2	2	1	2	3	3
DLB3	4	3	3	1	3	3	4
DLB4	1	1	1	1	1	1	1
DLB5	3	0	2	3	2	3	3
DLB6	3	2	3	3	1	4	4
Summe	57	53	60	22	23	57	63

Tabelle 58: Anzahl der immunreaktiven Präparate je Fall und Protokoll in der Kontrollgruppe (n = 69).
Eine weitere Aufschlüsselung nach einzelnen Organabschnitten findet sich in den Matrizen unter Tabelle 56.

Methode	Immunhistochemie			PET Blot			
Auswertung	10 HPF						Total
Vorbehandlung	Keine	Proteinase K					
Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129
AD1	1	2	0	0	0	2	0
ALS1	0	0	0	0	0	0	0
CBD1	1	1	0	0	0	0	1
CBD2	2	1	0	0	0	3	0
CBD3	2	1	2	0	0	1	0
HI1	4	1	4	0	0	0	0
LE1	4	1	1	0	0	0	0
MSA1	3	2	1	0	0	0	0
PSP1	2	1	2	0	0	2	2
PSP2	1	1	0	0	1	1	4
PSP3	1	1	0	0	0	0	0
PSP4	2	3	2	0	1	4	2
vPD1	1	0	1	0	0	0	0
vPD2	3	2	2	1	0	3	2
vPD3	6	4	6	0	0	0	1
Summe	33	21	21	1	2	16	12

Tabelle 59: Detailwerte zu Abbildung 31: Hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot-Protokollen, die mittels 10-HPF-Technik ausgewertet wurden und sämtlichen übrigen Protokollen. Präparate der Diagnosegruppe (n = 85). Berechnung auf Grundlage der kumulierten Gesichtsfelder in Submukosa und Muskularis. Hervorhebung signifikanter Werte ($p < 0,05$).

Zweifaktorielle Varianzanalyse für Ränge nach Friedman mit Bonferroni-Korrektur für multiple Testung.											
Methode				IHC			PET Blot				
				10HPF							Whole-slide
Auswertung				Vorbehandlung		Keine	Proteinase K	Proteinase K			
						pSer129	10D2	pSer129	10D2	pSer129	10D2
IHC	10HPF	Keine	pSer129		1	1	<0,001	<0,001	1	0,076	
		Proteinase K	10D2	1		1	<0,001	<0,001	1	0,016	
		Proteinase K	pSer129	1	1		<0,001	<0,001	1	0,234	
10D2			<0,001	<0,001	<0,001		1	<0,001	<0,001		
pSer129			<0,001	<0,001	<0,001	1		<0,001	<0,001		
10D2			1	1	1	<0,001	<0,001		0,794		
pSer129	0,076		0,016	0,234	<0,001	<0,001	0,794				
PET Blot	Whole-slide										

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Signifikanzwerte werden von der Bonferroni-Korrektur für mehrere Tests angepasst.

Tabelle 60: Hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot und IHC sowie zwischen verschiedenen Auswertungsmethoden. Präparate der Diagnosegruppe (n = 85). Berechnung auf Grundlage der kumulierten Gesichtsfelder in Submukosa und Muskularis. Hervorhebung signifikanter Werte ($p < 0,05$).

Zweifaktorielle Varianzanalyse für Ränge nach Friedman ohne Korrektur										
Methode				IHC			PET Blot			
				10HPF						Whole-slide
Auswertung				Vorbehandlung		Keine	Proteinase K	Proteinase K		
						Antikörper	pSer129	10D2	pSer129	10D2
IHC	10HPF	Keine	pSer129		0,644	0,709	<0,001	<0,001	0,404	0,004
		Proteinase K	10D2	0,644		0,404	<0,001	<0,001	0,195	0,001
		Proteinase K	pSer129	0,709	0,404		<0,001	<0,001	0,644	0,011
10D2			<0,001	<0,001	<0,001		0,763	<0,001	<0,001	
pSer129			<0,001	<0,001	<0,001	0,763		<0,001	<0,001	
10D2			0,404	0,195	0,644	<0,001	<0,001		0,038	
Whole-slide	pSer129		0,004	0,001	0,011	<0,001	<0,001	0,038		

Jede Zeile prüft die Nullhypothese, dass die Verteilungen in Stichprobe 1 und Stichprobe 2 gleich sind.

Asymptotische Signifikanzen (zweiseitige Tests) werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Tabelle 61: Kreuztabellen: Ein PET-Blot-Protokoll via pSer129 in Whole-slide-Evaluation war IHC in Sensitivität und Spezifität überlegen. Kumulierte Werte für Präparate der Submukosa und Muskularis. Aufschlüsselung der Präparate der Diagnosegruppe (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69) nach einzelnen Protokollen.

IHC pSer129, keine Vorbehandlung				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	57	33	90
	%	67,1%	47,8%	58,4%
Negativ	n	28	36	64
	%	32,9%	52,2%	41,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2, 10 HPF				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	22	1	23
	%	25,9%	1,4%	14,9%
Negativ	n	63	68	131
	%	74,1%	98,6%	85,1%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC 10D2, PK-Vorbehandlung				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	53	21	74
	%	62,4%	30,4%	48,1%
Negativ	n	32	48	80
	%	37,6%	69,6%	51,9%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129, 10 HPF				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	23	2	25
	%	27,1%	2,9%	16,2%
Negativ	n	62	67	129
	%	72,9%	97,1%	83,8%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC pSer129, PK-Vorbehandlung				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	60	21	81
	%	70,6%	30,4%	52,6%
Negativ	n	25	48	73
	%	29,4%	69,6%	47,4%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2, whole-slide				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	57	16	73
	%	67,1%	23,2%	47,4%
Negativ	n	28	53	81
	%	32,9%	76,8%	52,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129, whole-slide				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	63	12	75
	%	74,1%	17,4%	48,7%
Negativ	n	22	57	79
	%	25,9%	82,6%	51,3%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 62: Kreuztabellen: Auch bei isolierter Betrachtung der Submukosa war der PET Blot via pSer129 in Whole-slide-Evaluation der IHC in Sensitivität und Spezifität überlegen. Subgruppe: Präparate der Submukosa. Aufschlüsselung der Präparate der Diagnosegruppe (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69) nach einzelnen Protokollen.

IHC pSer129, keine Vorbehandlung				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	48	21	69
	%	56,5%	30,4%	44,8%
Negativ	n	37	48	85
	%	43,5%	69,6%	55,2%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2 10 HPF				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	15	1	16
	%	17,6%	1,4%	10,4%
Negativ	n	70	68	138
	%	82,4%	98,6%	89,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC 10D2, PK-Vorbehandlung				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	43	11	54
	%	50,6%	15,9%	35,1%
Negativ	n	42	58	100
	%	49,4%	84,1%	64,9%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129 10 HPF				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	17	0	17
	%	20,0%	0,0%	11,0%
Negativ	n	68	69	137
	%	80,0%	100,0%	89,0%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC pSer129, PK-Vorbehandlung				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	50	13	63
	%	58,8%	18,8%	40,9%
Negativ	n	35	56	91
	%	41,2%	81,2%	59,1%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2 Whole-slide				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	45	11	56
	%	52,9%	15,9%	36,4%
Negativ	n	40	58	98
	%	47,1%	84,1%	63,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129 Whole-slide				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	53	10	63
	%	62,4%	14,5%	40,9%
Negativ	n	32	59	91
	%	37,6%	85,5%	59,1%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 63: Kreuztabellen: Bei Auswertung der Muskularis zeigte sich ein vergleichbares Muster zur Submukosa und kumulativen Auswertung (vgl. Tabelle 61 und Tabelle 62). Subgruppe: Präparate der Submukosa. Aufschlüsselung der Präparate der Diagnosegruppe (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69) nach einzelnen Protokollen.

IHC pSer129, keine Vorbehandlung				
		Diagnose	Kontrolle	Summe
Positiv	n	36	22	58
	%	42,4%	31,9%	37,7%
Negativ	n	49	47	96
	%	57,6%	68,1%	62,3%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2 10 HPF				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	13	0	13
	%	15,3%	0,0%	8,4%
Negativ	n	72	69	141
	%	84,7%	100,0%	91,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC 10D2, PK-Vorbehandlung				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	45	18	63
	%	52,9%	26,1%	40,9%
Negativ	n	40	51	91
	%	47,1%	73,9%	59,1%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129 10 HPF				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	16	2	18
	%	18,8%	2,9%	11,7%
Negativ	n	69	67	136
	%	81,2%	97,1%	88,3%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC pSer129, PK-Vorbehandlung				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	42	14	56
	%	49,4%	20,3%	36,4%
Negativ	n	43	55	98
	%	50,6%	79,7%	63,6%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot 10D2 Whole-slide				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	47	7	54
	%	55,3%	10,1%	35,1%
Negativ	n	38	62	100
	%	44,7%	89,9%	64,9%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot pSer129 Whole-slide				
		Diag-nose	Kon-trolle	Summe
Positiv	n	57	7	64
	%	67,1%	10,1%	41,6%
Negativ	n	28	62	90
	%	32,9%	89,9%	58,4%
Summe	n	85	69	154
	%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 64: Kreuztabellen je Organabschnitt: Der PET Blot via pSer129 und Whole-slide-Evaluation ergab in oral des Kolons gelegenen Organabschnitten 70-100 % Sensitivität und stets 70-100 % Spezifität. Präparate der Diagnose- (n = 85) und Kontrollgruppe (n = 69). IHC-Protokolle in 10-HPF-Auswertung und PET Blot in Whole-slide-Evaluation aufgeführt. Kumulative Werte für Submukosa und Muskularis. Werte für Spezifität bzw. Sensibilität > 70 % hervorgehoben.

IHC, pSer129 ohne Vorbehandlung					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	1	1	2
		%	50,0%	100,0%	66,7%
	Negativ	n	1	0	1
		%	50,0%	0,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	13	6	19
		%	81,3%	46,2%	65,5%
	Negativ	n	3	7	10
		%	18,8%	53,8%	34,5%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	9	3	12
		%	64,3%	23,1%	44,4%
	Negativ	n	5	10	15
		%	35,7%	76,9%	55,6%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	6	4	10
		%	54,5%	50,0%	52,6%
	Negativ	n	5	4	9
		%	45,5%	50,0%	47,4%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	11	9	20
		%	68,8%	60,0%	64,5%
	Negativ	n	5	6	11
		%	31,3%	40,0%	35,5%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	4	2	6
		%	66,7%	28,6%	46,2%
	Negativ	n	2	5	7
		%	33,3%	71,4%	53,8%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	6	5	11
		%	66,7%	62,5%	64,7%
	Negativ	n	3	3	6
		%	33,3%	37,5%	35,3%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	7	3	10
		%	63,6%	75,0%	66,7%
	Negativ	n	4	1	5
		%	36,4%	25,0%	33,3%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC, 10D2 mit PK-Vorbehandlung					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	0	2
		%	100,0%	0,0%	66,7%
	Negativ	n	0	1	1
		%	0,0%	100,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	13	5	18
		%	81,3%	38,5%	62,1%
	Negativ	n	3	8	11
		%	18,8%	61,5%	37,9%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	3	2	5
		%	21,4%	15,4%	18,5%
	Negativ	n	11	11	22
		%	78,6%	84,6%	81,5%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	6	2	8
		%	54,5%	25,0%	42,1%
	Negativ	n	5	6	11
		%	45,5%	75,0%	57,9%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	12	1	13
		%	75,0%	6,7%	41,9%
	Negativ	n	4	14	18
		%	25,0%	93,3%	58,1%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	3	0	3
		%	50,0%	0,0%	23,1%
	Negativ	n	3	7	10
		%	50,0%	100,0%	76,9%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	5	7	12
		%	55,6%	87,5%	70,6%
	Negativ	n	4	1	5
		%	44,4%	12,5%	29,4%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	9	4	13
		%	81,8%	100,0%	86,7%
	Negativ	n	2	0	2
		%	18,2%	0,0%	13,3%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

IHC, pSer129 mit PK-Vorbehandlung					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
	Negativ	n	0	0	0
		%	0,0%	0,0%	0,0%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	12	5	17
		%	75,0%	38,5%	58,6%
	Negativ	n	4	8	12
		%	25,0%	61,5%	41,4%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	7	3	10
		%	50,0%	23,1%	37,0%
	Negativ	n	7	10	17
		%	50,0%	76,9%	63,0%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	8	2	10
		%	72,7%	25,0%	52,6%
	Negativ	n	3	6	9
		%	27,3%	75,0%	47,4%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	11	5	16
		%	68,8%	33,3%	51,6%
	Negativ	n	5	10	15
		%	31,3%	66,7%	48,4%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	3	2	5
		%	50,0%	28,6%	38,5%
	Negativ	n	3	5	8
		%	50,0%	71,4%	61,5%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	9	2	11
		%	100,0%	25,0%	64,7%
	Negativ	n	0	6	6
		%	0,0%	75,0%	35,3%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	8	1	9
		%	72,7%	25,0%	60,0%
	Negativ	n	3	3	6
		%	27,3%	75,0%	40,0%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot, 10D2, High-power fields					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	0	2
		%	100,0%	0,0%	66,7%
	Negativ	n	0	1	1
		%	0,0%	100,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	5	1	6
		%	31,3%	7,7%	20,7%
	Negativ	n	11	12	23
		%	68,8%	92,3%	79,3%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	2	0	2
		%	14,3%	0,0%	7,4%
	Negativ	n	12	13	25
		%	85,7%	100,0%	92,6%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	3	0	3
		%	27,3%	0,0%	15,8%
	Negativ	n	8	8	16
		%	72,7%	100,0%	84,2%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	7	0	7
		%	43,8%	0,0%	22,6%
	Negativ	n	9	15	24
		%	56,3%	100,0%	77,4%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	1	0	1
		%	16,7%	0,0%	7,7%
	Negativ	n	5	7	12
		%	83,3%	100,0%	92,3%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	1	0	1
		%	11,1%	0,0%	5,9%
	Negativ	n	8	8	16
		%	88,9%	100,0%	94,1%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	1	0	1
		%	9,1%	0,0%	6,7%
	Negativ	n	10	4	14
		%	90,9%	100,0%	93,3%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot, pSer129, High-power fields					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	0	2
		%	100,0%	0,0%	66,7%
	Negativ	n	0	1	1
		%	0,0%	100,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	6	0	6
		%	37,5%	0,0%	20,7%
	Negativ	n	10	13	23
		%	62,5%	100,0%	79,3%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	3	0	3
		%	21,4%	0,0%	11,1%
	Negativ	n	11	13	24
		%	78,6%	100,0%	88,9%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	2	1	3
		%	18,2%	12,5%	15,8%
	Negativ	n	9	7	16
		%	81,8%	87,5%	84,2%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	5	0	5
		%	31,3%	0,0%	16,1%
	Negativ	n	11	15	26
		%	68,8%	100,0%	83,9%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	1	1	2
		%	16,7%	14,3%	15,4%
	Negativ	n	5	6	11
		%	83,3%	85,7%	84,6%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	3	0	3
		%	33,3%	0,0%	17,6%
	Negativ	n	6	8	14
		%	66,7%	100,0%	82,4%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	1	0	1
		%	9,1%	0,0%	6,7%
	Negativ	n	10	4	14
		%	90,9%	100,0%	93,3%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot, 10D2 Whole-slide					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	0	2
		%	100,0%	0,0%	66,7%
	Negativ	n	0	1	1
		%	0,0%	100,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	10	2	12
		%	62,5%	15,4%	41,4%
	Negativ	n	6	11	17
		%	37,5%	84,6%	58,6%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	7	2	9
		%	50,0%	15,4%	33,3%
	Negativ	n	7	11	18
		%	50,0%	84,6%	66,7%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	9	3	12
		%	81,8%	37,5%	63,2%
	Negativ	n	2	5	7
		%	18,2%	62,5%	36,8%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	16	5	21
		%	100,0%	33,3%	67,7%
	Negativ	n	0	10	10
		%	0,0%	66,7%	32,3%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	3	2	5
		%	50,0%	28,6%	38,5%
	Negativ	n	3	5	8
		%	50,0%	71,4%	61,5%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	6	1	7
		%	66,7%	12,5%	41,2%
	Negativ	n	3	7	10
		%	33,3%	87,5%	58,8%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	4	1	5
		%	36,4%	25,0%	33,3%
	Negativ	n	7	3	10
		%	63,6%	75,0%	66,7%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

PET Blot, pSer129 Whole-slide					
			Positiv	Negativ	Gesamt
Oesophagus	Positiv	n	2	0	2
		%	100,0%	0,0%	66,7%
	Negativ	n	0	1	1
		%	0,0%	100,0%	33,3%
	Gesamt	n	2	1	3
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Magen	Positiv	n	15	3	18
		%	93,8%	23,1%	62,1%
	Negativ	n	1	10	11
		%	6,3%	76,9%	37,9%
	Gesamt	n	16	13	29
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Duodenum	Positiv	n	10	2	12
		%	71,4%	15,4%	44,4%
	Negativ	n	4	11	15
		%	28,6%	84,6%	55,6%
	Gesamt	n	14	13	27
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Jejunum	Positiv	n	10	1	11
		%	90,9%	12,5%	57,9%
	Negativ	n	1	7	8
		%	9,1%	87,5%	42,1%
	Gesamt	n	11	8	19
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Ileum	Positiv	n	13	4	17
		%	81,3%	26,7%	54,8%
	Negativ	n	3	11	14
		%	18,8%	73,3%	45,2%
	Gesamt	n	16	15	31
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Appendix	Positiv	n	2	1	3
		%	33,3%	14,3%	23,1%
	Negativ	n	4	6	10
		%	66,7%	85,7%	76,9%
	Gesamt	n	6	7	13
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Kolon	Positiv	n	6	1	7
		%	66,7%	12,5%	41,2%
	Negativ	n	3	7	10
		%	33,3%	87,5%	58,8%
	Gesamt	n	9	8	17
		%	100,0%	100,0%	100,0%
Rektum	Positiv	n	5	0	5
		%	45,5%	0,0%	33,3%
	Negativ	n	6	4	10
		%	54,5%	100,0%	66,7%
	Gesamt	n	11	4	15
		%	100,0%	100,0%	100,0%

Tabelle 65 Anzahl der Organpräparate, kategorisiert nach Diagnose und zugeordnet zu pathogenetischen Krankheitsgruppen. CBD = Corticobasale Degeneration; DLB = Demenz mit Lewy-Körperchen; FTD = Frontotemporales Demenzspektrum; LE = Lymphatische Enzephalopathie; MSA = Multisystematrophie; PD = Morbus Parkinson; PSP = Progressive supranucleäre Blickparese; VPD = Vaskuläres Parkinsonoid

Sekundär- gruppe	Primär- gruppe	Diagnose	Organ	#Organ/ Diagnose
Neuro- degenerativ	FTD-Spektrum	ALS	Magen	1
			Duodenum	1
			Ileum	1
		CBD	Magen	3
			Duodenum	3
			Jejunum	2
			Ileum	3
			Appendix	1
			Kolon	3
	Neuronale α -Synuklein- Aggregation	PSP	Magen	3
			Duodenum	3
			Jejunum	3
			Ileum	4
			Appendix	3
			Kolon	3
		DLB	Ösophagus	1
			Magen	3
			Duodenum	3
			Ileum	5
			Appendix	2
			Kolon	4
			Rektum	1
		PD	Ösophagus	1
			Magen	13
			Duodenum	11
			Jejunum	11
			Ileum	11
			Appendix	4
			Kolon	5
			Rektum	10
		MSA	Ösophagus	1

	Sonstige α -Synuclein- Aggregation		Magen	1	
			Duodenum	1	
			Jejunum	1	
			Ileum	1	
			Appendix	1	
			Rektum	1	
	Sonstige Neuro- degeneration	AD	Magen	1	
			Duodenum	1	
			Jejunum	1	
			Ileum	1	
			Kolon	1	
			Rektum	1	
Neurovaskulär	Neurovaskulär	Apoplex	Magen	1	
			Duodenum	1	
			Ileum	1	
			Appendix	1	
			VPD	Magen	2
		Duodenum		2	
		Ileum		3	
		Appendix		1	
		Kolon		1	
		Rektum		2	
Sonstige	Sonstige	LE	Magen	1	
			Duodenum	1	
			Jejunum	1	
			Ileum	1	
Total				154	

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeichnungen stereotyper Patienten mit Parkinson-Syndrom.	11
Abbildung 2: Prodromaler (prämotorischer) und klinischer Verlauf (KALIA, LANG, 2015).	13
Abbildung 3: Pathophysiologie des Morbus Parkinson.	16
Abbildung 4: Pigmentverlust der Substantia nigra.	17
Abbildung 5: Lewy-Pathologie.	18
Abbildung 6: Die molekulare Struktur des α -Synukleins.	20
Abbildung 7: Braak-Staging.	26
Abbildung 8: Die Ganglien der Darmplexus sind untereinander komplex verwoben (GUNN, 1968).	28
Abbildung 9 (links): Der Vagusnerv verbindet ENS und ZNS (BRAAK, DEL TREDICI, 2009).	30
Abbildung 10 (rechts): Topographie der Afferenzen und Efferenzen des Vagusnervs (POWLEY et al., 1994).	30
Abbildung 11: Auch in den Ganglien des GIT finden sich intraneuronale Lewy-Körperchen. (WAKABAYASHI et al., 1988).	33
Abbildung 12: Die Paraffinblöcke lagern trocken und lichtgeschützt im Archiv.	37
Abbildung 13: Flowchart: Arbeitsschritte in der Durchführung der Doktorarbeit.	44
Abbildung 14: Zentrale Schritte der Immunhistochemie.	51
Abbildung 15: Vorbereitung der PET-Blot-Membranen.	59
Abbildung 16: Vorbehandlung, Detektion und Trocknung der PET-Blot-Membranen.	60
Abbildung 17: Die hohe anatomische Auflösung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung veranschaulicht Strukturen des enterischen Nervensystems.	69
Abbildung 18: Ein retikuläres Muster aus Lewy-Körperchen und Neuriten mit geringer Hintergrundreaktivität bestätigte die hohe Qualität eines immunhistochemischen Versuchs.	71
Abbildung 19: Ein feines synaptisches Muster und gleichmäßiges Färbeverhalten der Positivkontrolle signalisierten einen gelungenen Versuch im PET Blot.	73
Abbildung 20: Ein Ganglion am Rand der Muskularis zeigt vergleichbare Färbemuster in einer Schnittserie vier immunhistochemischer Protokolle.	75
Abbildung 21: Immunreaktivität in Präparaten der Diagnosegruppe: Lewy-Pathologie des Gastrointestinaltrakts.	77
Abbildung 22: Lewy-Pathologie findet sich in der Immunhistochemie vereinzelt auch in Kontrollfällen.	79
Abbildung 23: Immunhistochemische Artefakte können Merkmale der Lewy-Pathologie imitieren.	81
Abbildung 24: Muster der Aggregat-Pathologie in der Diagnosegruppe mittels PET Blot.	84
Abbildung 25: Die Aggregat-Pathologie in Form von Lewy-Neuriten fand sich am häufigsten perivaskulär.	85
Abbildung 26: Die Immunreaktivität des Plexus myentericus war in allen Protokollen leicht auszumachen.	86
Abbildung 27: Artefakte im PET Blot können je nach Ausprägung die Auswertung erleichtern oder erschweren.	88
Abbildung 28: „Flusenartige“ Artefakte in den mittels monoklonaler Variante von pSer129 gefärbten Präparaten wiesen anatomischen Bezug zu Bindegewebsstraßen der Muskularis auf.	90
Abbildung 29: α -Synuklein-Verteilungsdichte, aufgeschlüsselt nach Protokoll und Organabschnitt: non- lineares Muster in der IHC und im PET Blot und wesentliche Unterschiede zwischen Diagnose- und Kontrollgruppe.	92
Abbildung 30: Erhöhte Immunreaktivität der Submukosa gegenüber der Muskularis.	95

Abbildung 31: Statistisch hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot-Methoden, die mittels 10-HPF-Technik ausgewertet wurden (graue Kästen) und sämtlichen übrigen Protokollen.	102
Abbildung 32: Beispiele zur Stadienauswertung nach Braak und McKeith.	112
Abbildung 33: Korrelation zwischen Immunreaktivität und Krankheitsdauer: Mäßig positiver Trend in der IHC via 10D2, jedoch fehlende Übereinstimmung mit dem PET Blot.	136
Abbildung 34: Keinerlei Korrelation zwischen Immunreaktivität und Alter.	137

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Neuropathologische Staging-Methoden im Vergleich (modifiziert nach JELLINGER, 2019). ...	24
Tabelle 2: Anzahl der einzelnen gastrointestinalen Organabschnitte im Vergleich zur Stichprobe (n = 154).	38
Tabelle 3: Patientendaten der Diagnose- (n = 20) und Kontrollgruppe (n = 15) ähneln sich hinsichtlich statistischer Parameter.	38
Tabelle 4: Statistische Daten der Diagnosegruppe (n = 20).....	39
Tabelle 5: Statistische Daten der Kontrollgruppe (n = 15).	40
Tabelle 6: In der Immunhistochemie genutzte Antikörper (Vor- und Endversuche).	41
Tabelle 7: Im PET Blot genutzte Primärantikörper (Vor- und Endversuche).	41
Tabelle 8: Im PET Blot genutzte Sekundärantikörper (Vor- und Endversuche).	42
Tabelle 9: Verwendete Geräte.....	43
Tabelle 10: Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzte Reagenzien.....	47
Tabelle 11: Zur Hämatoxylin-Eosin-Färbung genutzte Lösungen.....	47
Tabelle 12: Zur Immunhistochemie verwendete Materialien.	48
Tabelle 13: Zur Immunhistochemie genutzte Reagenzien.....	48
Tabelle 14: Zur Immunhistochemie genutzte Lösungen	49
Tabelle 15: Zur Immunhistochemie genutzte Protokolle.....	50
Tabelle 16: Im PET Blot genutzte Reagenzien.....	55
Tabelle 17: Im PET Blot genutzte Lösungen.....	56
Tabelle 18: Im PET Blot verwendete Materialien.	57
Tabelle 19: Im PET Blot genutzte Protokolle.....	58
Tabelle 20: Immunhistochemische Positivkriterien.....	64
Tabelle 21: Immunhistochemische Negativkriterien.	64
Tabelle 22: Positivkriterien im PET Blot.....	65
Tabelle 23: Negativkriterien im PET Blot.	65
Tabelle 24: Verwendete Software	65
Tabelle 25: Beispiel zur Rangbildung durch Bestimmung der Ko-Reaktivität auf Einzelfallbasis.....	67
Tabelle 26: Die Werte für Immunreaktivität waren nicht normalverteilt.....	91
Tabelle 27: In einem Ranking der Organabschnitte erzielten Jejunum, Magen und Ileum die vordersten Plätze.	94
Tabelle 28: Die Fälle mit der niedrigsten Immunreaktivität waren mit niedrigem Braak-Stadium und jungem Alter zum Todeszeitpunkt assoziiert.....	97
Tabelle 29: Die Fälle mit der höchsten Immunreaktivität waren mit DLB-/PDD-Diagnose, hohem Braak-Stadium und Pneumonie als Todesursache assoziiert.....	97
Tabelle 30: In den meisten Protokollen zeigte sich keine Korrelation $r > 0,3$ zwischen der Krankheitsdauer und Immunreaktivität.	98
Tabelle 31: Kein Protokoll zeigte eine Korrelation $r > 0,3$ zwischen Alter und Immunreaktivität.	99
Tabelle 32: Protokollabhängige Korrelation zwischen Immunreaktivität und Demenz.	99
Tabelle 33: Gastrointestinale Symptome fanden sich ähnlich häufig in Diagnose- (n = 9) und Kontrollgruppe (n = 10).	100

Tabelle 34: Protokolle mittels pSer129 waren stärker immunreaktiv als solche via 10D2.	101
Tabelle 35: Immunhistochemie: Circa die Hälfte der Präparate der Diagnose- (n = 85) und ein Viertel der Kontrollgruppe (n = 69) war immunreaktiv.	103
Tabelle 36: Im PET Blot ergibt sich eine höhere Immunreaktivität der Diagnosegruppe (n = 85) und eine niedrigere in Kontrollen (n = 69) via Whole-slide-Evaluation.	104
Tabelle 37: Sensitivität und Spezifität waren höher im PET Blot und via pSer129.	105
Tabelle 38: Höchste Sensitivität in Ösophagus und Ileum, Höchste Spezifität in Ösophagus und Kolon. ...	107
Tabelle 39: Höchste Spezifität bei jedoch sehr geringer Sensitivität in allen Organabschnitten.	107
Tabelle 41: Auch in der Magen-Subgruppe zeigte der PET Blot in Whole-slide-Evaluation im Vergleich zur IHC eine höhere Sensitivität und Spezifität.	108
Tabelle 42: Werden $\geq 2/10$ bzw. $\geq 2/20$ (Kumulation) positive HPF vorausgesetzt, so vermindert sich die Sensitivität und steigt die Spezifität.	108
Tabelle 43: Mindestbiopsiegröße in der Submukosa: In $> 50\%$ waren Biopsien im Zentimeterbereich nötig – im PET Blot meist $> 32,8\text{ mm}^2$	110
Tabelle 44: Auch in der Muskularis waren in den meisten Fällen Resektate in Zentimetergröße notwendig.	111
Tabelle 45: Im Rattenmodell lässt der prozentuale Anteil vagal innervierter myenterischer Ganglien keinen stetigen rostro-kaudalen Gradienten erkennen (BERTHOUD et al., 1990).	123
Tabelle 46: Methoden zur gastrointestinalen Diagnostik der α -Synuklein-Aggregationskrankheiten.	127
Tabelle 47 Anzahl der verwendeten Proben geordnet nach Diagnosegruppen, Autopsiediagnose und betroffenem Organ.	138
Tabelle 48: Morphologische Studien des Gastrointestinaltraktes bezüglich der α -Synuklein-Immunreaktivität.	140
Tabelle 49: Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	141
Tabelle 50: Mittelwerte immunreaktiver Gesichtsfelder der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	141
Tabelle 51: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Submukosa der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	142
Tabelle 52: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Muskularis der Diagnosegruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	142
Tabelle 53: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Submukosa der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	143
Tabelle 54: Immunreaktive Gesichtsfelder in der Muskularis der Kontrollgruppe, aufgeschlüsselt nach Organ, Methode und Antikörper.	143
Tabelle 55: Immunreaktive Präparate je Organ auf Einzelfallbasis, Diagnosegruppe (n = 85).	145
Tabelle 56: Immunreaktive Präparate je Organ auf Einzelfallbasis, Kontrollgruppe (n = 69).	146
Tabelle 57: Anzahl der immunreaktiven Präparate je Fall und Protokoll in der Diagnosegruppe (n = 85)...	147
Tabelle 58: Anzahl der immunreaktiven Präparate je Fall und Protokoll in der Kontrollgruppe (n = 69). ...	147
Tabelle 59: Detailwerte zu Abbildung 31: Hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot-Protokollen, die mittels 10-HPF-Technik ausgewertet wurden und sämtlichen übrigen Protokollen.	148
Tabelle 60: Hochsignifikante Unterschiede in der Immunreaktivität zwischen PET-Blot und IHC sowie zwischen verschiedenen Auswertungsmethoden.	148

Tabelle 61: Kreuztabellen: Ein PET-Blot-Protokoll via pSer129 in Whole-slide-Evaluation war IHC in Sensitivität und Spezifität überlegen.	149
Tabelle 62: Kreuztabellen: Auch bei isolierter Betrachtung der Submukosa war der PET Blot via pSer129 in Whole-slide-Evaluation der IHC in Sensitivität und Spezifität überlegen.	150
Tabelle 63: Kreuztabellen: Bei Auswertung der Muskularis zeigte sich ein vergleichbares Muster zur Submukosa und kumulativen Auswertung (vgl. Tabelle 61 und Tabelle 62).	151
Tabelle 64: Kreuztabellen je Organabschnitt: Der PET Blot via pSer129 und Whole-slide-Evaluation ergab in oral des Kolons gelegenen Organabschnitten 70-100 % Sensitivität und stets 70-100 % Spezifität.	152
Tabelle 65 Anzahl der Organpräparate, kategorisiert nach Diagnose und zugeordnet zu pathogenetischen Krankheitsgruppen.	156

11 Literaturverzeichnis

1. Abbott RD, Petrovitch H, White LR, Masaki KH, Tanner CM, Curb JD, Grandinetti A, Blanchette PL, Popper JS, Ross GW (2001) Frequency of bowel movements and the future risk of Parkinson's disease. *Neurology* 57:456-462
2. Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal A (2000) Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* 25:239-252
3. Agostoni E, Chinnock JE, De Daly MB, Murray JG (1957) Functional and histological studies of the vagus nerve and its branches to the heart, lungs and abdominal viscera in the cat. *J Physiol* 135:182-205
4. Aguzzi A, O'Connor T (2010) Protein aggregation diseases: pathogenicity and therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 9:237-248
5. Alberti S, Hyman AA (2021) Biomolecular condensates at the nexus of cellular stress, protein aggregation disease and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22:196-213
6. Aldecoa I, Navarro-Otano J, Stefanova N, Sprenger FS, Seppi K, Poewe W, Cuatrecasas M, Valldeoriola F, Gelpi E, Tolosa E (2015) Alpha-synuclein immunoreactivity patterns in the enteric nervous system. *Neurosci Lett* 602:145-149
7. Alfaro JF, Gong CX, Monroe ME, Aldrich JT, Clauss TR, Purvine SO, Wang Z, Camp DG, 2nd, Shabanowitz J, Stanley P, Hart GW, Hunt DF, Yang F, Smith RD (2012) Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:7280-7285
8. Altschuler E (1996) Gastric *Helicobacter pylori* infection as a cause of idiopathic Parkinson disease and non-arteric anterior optic ischemic neuropathy. *Med Hypotheses* 47:413-414
9. Altschuler SM, Ferenci DA, Lynn RB, Miselis RR (1991) Representation of the cecum in the lateral dorsal motor nucleus of the vagus nerve and commissural subnucleus of the nucleus tractus solitarii in rat. *J Comp Neurol* 304:261-274
10. Anderson JP, Walker DE, Goldstein JM, de Laat R, Banducci K, Caccavello RJ, Barbour R, Huang J, Kling K, Lee M, Diep L, Keim PS, Shen X, Chataway T, Schlossmacher MG, Seubert P, Schenk D, Sinha S, Gai WP, Chilcote TJ (2006) Phosphorylation of Ser-129 is the dominant pathological modification of alpha-synuclein in familial and sporadic Lewy body disease. *J Biol Chem* 281:29739-29752
11. Annerino DM, Arshad S, Taylor GM, Adler CH, Beach TG, Greene JG (2012) Parkinson's disease is not associated with gastrointestinal myenteric ganglion neuron loss. *Acta Neuropathol* 124:665-680
12. Anwar S, Peters O, Millership S, Ninkina N, Doig N, Connor-Robson N, Threlfell S, Kooner G, Deacon RM, Bannerman DM, Bolam JP, Chandra SS, Cragg SJ, Wade-Martins R, Buchman VL (2011) Functional alterations to the nigrostriatal system in mice lacking all three members of the synuclein family. *J Neurosci* 31:7264-7274
13. Armstrong RA (2012) On the 'classification' of neurodegenerative disorders: discrete entities, overlap or continuum? *Folia Neuropathol* 50:201-208
14. Arotcarena M-L, Dovero S, Prigent A, Bourdenx M, Camus S, Porras G, Thiolat M-L, Tasselli M, Aubert P, Kruse N, Mollenhauer B, Trigo Damas I, Estrada C, Garcia-Carrillo N, Vaikath NN, El-Agnaf OMA, Herrero MT, Vila M, Obeso JA, Derkinderen P, Dehay B, Bezard E (2020) Bidirectional gut-to-brain and brain-to-gut propagation of synucleinopathy in non-human primates. *Brain* 143:1462-1475
15. Asala SA, Bower AJ (1986) An electron microscope study of vagus nerve composition in the ferret. *Anat Embryol (Berl)* 175:247-253
16. Ascherio A, Schwarzschild MA (2016) The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. *Lancet Neurol* 15:1257-1272
17. Askanas V, Engel WK, Alvarez RB, McFerrin J, Broccolini A (2000) Novel immunolocalization of alpha-synuclein in human muscle of inclusion-body myositis, regenerating and necrotic muscle fibers, and at neuromuscular junctions. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:592-598
18. Association WM (2013) World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA* 310:2191-2194
19. Attems J, Jellinger KA (2008) The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34:466-467

20. Au WL, Calne DB (2005) A reassessment of the Lewy body. *Acta Neurol Taiwan* 14:40-47
21. Auerbach L (1862) Über einen Plexus myentericus. Morgenstern, editor Breslau
22. Baba M, Nakajo S, Tu PH, Tomita T, Nakaya K, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol* 152:879-884
23. Baltic S, Perovic M, Mladenovic A, Raicevic N, Ruzdijic S, Rakic L, Kanazir S (2004) Alpha-synuclein is expressed in different tissues during human fetal development. *J Mol Neurosci* 22:199-204
24. Barone DA, Henchcliffe C (2018) Rapid eye movement sleep behavior disorder and the link to alpha-synucleinopathies. *Clin Neurophysiol* 129:1551-1564
25. Barrenschee M, Zorenkov D, Bottner M, Lange C, Cossais F, Scharf AB, Deuschl G, Schneider SA, Ellrichmann M, Fritscher-Ravens A, Wedel T (2017) Distinct pattern of enteric phospho-alpha-synuclein aggregates and gene expression profiles in patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 5:1
26. Barrett PJ, Timothy Greenamyre J (2015) Post-translational modification of alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Brain Res* 1628:247-253
27. Bayliss WM, Starling EH (1899) The movements and innervation of the small intestine. *The Journal of physiology* 24:99-143
28. Beach TG, White CL, Hamilton RL, Duda JE, Iwatsubo T, Dickson DW, Leverenz JB, Roncaroli F, Buttni M, Hladik CL, Sue LI, Noorigian JV, Adler CH (2008) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods used by invited experts. *Acta Neuropathol* 116:277-288
29. Beach TG, Adler CH, Lue L, Sue LI, Bachalakuri J, Henry-Watson J, Sasse J, Boyer S, Shirohi S, Brooks R, Eschbacher J, White CL, 3rd, Akiyama H, Caviness J, Shill HA, Connor DJ, Sabbagh MN, Walker DG, Arizona Parkinson's Disease C (2009) Unified staging system for Lewy body disorders: correlation with nigrostriatal degeneration, cognitive impairment and motor dysfunction. *Acta Neuropathol* 117:613-634
30. Beach TG, Adler CH, Sue LI, Vedders L, Lue L, White Iii CL, Akiyama H, Caviness JN, Shill HA, Sabbagh MN, Walker DG, Arizona Parkinson's Disease C (2010) Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol* 119:689-702
31. Beach TG, Adler CH, Serrano G, Sue LI, Walker DG, Dugger BN, Shill HA, Driver-Dunckley E, Caviness JN, Intorcchia A, Filon J, Scott S, Garcia A, Hoffman B, Belden CM, Davis KJ, Sabbagh MN, Arizona Parkinson's Disease C (2016a) Prevalence of Submandibular Gland Synucleinopathy in Parkinson's Disease, Dementia with Lewy Bodies and other Lewy Body Disorders. *J Parkinsons Dis* 6:153-163
32. Beach TG, Corbille AG, Letournel F, Kordower JH, Kremer T, Munoz DG, Intorcchia A, Hentz J, Adler CH, Sue LI, Walker J, Serrano G, Derkinderen P (2016b) Multicenter Assessment of Immunohistochemical Methods for Pathological Alpha-Synuclein in Sigmoid Colon of Autopsied Parkinson's Disease and Control Subjects. *J Parkinsons Dis* 6:761-770
33. Beauchamp TL, Childress JF (2019) Principles of biomedical ethics, 8th Edition edn (New York, NY, Oxford University Press, USA).
34. Beekes M (2021) The Neural Gut-Brain Axis of Pathological Protein Aggregation in Parkinson's Disease and Its Counterpart in Peroral Prion Infections. *Viruses* 13
35. Benarroch EE (2007) Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69:1953-1957
36. Benson MD, Buxbaum JN, Eisenberg DS, Merlini G, Saraiva MJM, Sekijima Y, Sipe JD, Westmark P (2018) Amyloid nomenclature 2018: recommendations by the International Society of Amyloidosis (ISA) nomenclature committee. *Amyloid* 25:215-219
37. Bentham J (1780) An Introduction to the Principles of Morals and Legislation, Vol 45, Dover Publications).
38. Berg D, Crotty GF, Keavney JL, Schwarzschild MA, Simuni T, Tanner C (2022) Path to Parkinson Disease Prevention. *Neurology* 99:76-83
39. Berg D, Klein C (2023) α -synuclein seed amplification and its uses in Parkinson's disease. *Lancet Neurol* 22:369-371
40. Berthoud H-R, Jedrzejewska A, Powley TL (1990) Simultaneous labeling of vagal innervation of the gut and afferent projections from the visceral forebrain with Dil injected into the dorsal vagal complex in the rat. *Journal of Comparative Neurology* 301:65-79

41. Berthoud HR, Kressel M, Raybould HE, Neuhuber WL (1995) Vagal sensors in the rat duodenal mucosa: distribution and structure as revealed by in vivo DiI-tracing. *Anat Embryol (Berl)* 191:203-212
42. Berthoud HR, Patterson LM, Neumann F, Neuhuber WL (1997) Distribution and structure of vagal afferent intraganglionic laminar endings (IGLEs) in the rat gastrointestinal tract. *Anat Embryol (Berl)* 195:183-191
43. Berthoud HR, Neuhuber WL (2000) Functional and chemical anatomy of the afferent vagal system. *Auton Neurosci* 85:1-17
44. Bloch A, Probst A, Bissig H, Adams H, Tolnay M (2006) Alpha-synuclein pathology of the spinal and peripheral autonomic nervous system in neurologically unimpaired elderly subjects. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:284-295
45. Borghammer P, Van Den Berge N (2019) Brain-First versus Gut-First Parkinson's Disease: A Hypothesis. *J Parkinsons Dis*
46. Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82:239-259
47. Braak H, Braak E (1995) Staging of Alzheimer's disease-related neurofibrillary changes. *Neurobiol Aging* 16:271-278; discussion 278-284
48. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003a) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24:197-211
49. Braak H, Rub U, Gai WP, Del Tredici K (2003b) Idiopathic Parkinson's disease: possible routes by which vulnerable neuronal types may be subject to neuroinvasion by an unknown pathogen. *J Neural Transm (Vienna)* 110:517-536
50. Braak H, Ghebremedhin E, Rub U, Bratzke H, Del Tredici K (2004) Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res* 318:121-134
51. Braak H, Bohl JR, Muller CM, Rub U, de Vos RA, Del Tredici K (2006a) Stanley Fahn Lecture 2005: The staging procedure for the inclusion body pathology associated with sporadic Parkinson's disease reconsidered. *Mov Disord* 21:2042-2051
52. Braak H, de Vos RA, Bohl J, Del Tredici K (2006b) Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexuses in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. *Neurosci Lett* 396:67-72
53. Braak H, Sastre M, Bohl JR, de Vos RA, Del Tredici K (2007) Parkinson's disease: lesions in dorsal horn layer I, involvement of parasympathetic and sympathetic pre- and postganglionic neurons. *Acta Neuropathol* 113:421-429
54. Braak H, Del Tredici K (2009) Neuroanatomy and pathology of sporadic Parkinson's disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 201:1-119
55. Braak H, Del Tredici-Braak K, Gasser T (2018) Special issue "Parkinson's disease". *Cell Tissue Res* 373:1-7
56. Breen DP, Halliday GM, Lang AE (2019) Gut-brain axis and the spread of alpha-synuclein pathology: vagal highway or dead end? *Mov Disord*
57. Brookes SJ, Spencer NJ, Costa M, Zagorodnyuk VP (2013) Extrinsic primary afferent signalling in the gut. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10:286-296
58. Brown GC (2019) The endotoxin hypothesis of neurodegeneration. *J Neuroinflammation* 16:180
59. Brundin P, Melki R (2017) Prying into the Prion Hypothesis for Parkinson's Disease. *J Neurosci* 37:9808-9818
60. Bu J, Liu J, Liu K, Wang Z (2019) Diagnostic utility of gut alpha-synuclein in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Behav Brain Res* 364:340-347
61. Bu LL, Huang KX, Zheng DZ, Lin DY, Chen Y, Jing XN, Liang YR, Tao EX (2020) Alpha-Synuclein Accumulation and Its Phosphorylation in the Enteric Nervous System of Patients Without Neurodegeneration: An Explorative Study. *Front Aging Neurosci* 12:575481
62. Bussolati G, Leonardo E (2008) Technical pitfalls potentially affecting diagnoses in immunohistochemistry. *J Clin Pathol* 61:1184-1192
63. Calne DB, Dubini A, Stern G (1989) Did Leonardo describe Parkinson's disease? *N Engl J Med* 320:594
64. Calne DB, Mizuno Y (2004) The neuromythology of Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10:319-322
65. Canron MH, Perret M, Vital A, Bezard E, Dehay B (2012) Age-dependent alpha-synuclein aggregation in the *Microcebus murinus* lemur primate. *Sci Rep* 2:910

66. Cersosimo MG, Benarroch EE (2008) Neural control of the gastrointestinal tract: implications for Parkinson disease. *Mov Disord* 23:1065-1075
67. Cervi AL, Lukewich MK, Lomax AE (2014) Neural regulation of gastrointestinal inflammation: role of the sympathetic nervous system. *Auton Neurosci* 182:83-88
68. Chandra S, Chen X, Rizo J, Jahn R, Sudhof TC (2003) A broken alpha -helix in folded alpha -Synuclein. *J Biol Chem* 278:15313-15318
69. Chandra S, Fornai F, Kwon HB, Yazdani U, Atasoy D, Liu X, Hammer RE, Battaglia G, German DC, Castillo PE, Sudhof TC (2004) Double-knockout mice for alpha- and beta-synucleins: effect on synaptic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14966-14971
70. Charcot J-M, Vulpian A (1862) De la paralysie agitante, Victor Masson et fils).
71. Charcot J (1888) Leçons du Mardi: Policlinique de la Salpêtrière, 1887–1888. Bureaux du Progrès Médical, Paris Lesson of November 15:1887
72. Chartier S, Duyckaerts C (2018) Is Lewy pathology in the human nervous system chiefly an indicator of neuronal protection or of toxicity? *Cell Tissue Res* 373:149-160
73. Chaudhuri KR, Yates L, Martinez-Martin P (2005) The non-motor symptom complex of Parkinson's disease: a comprehensive assessment is essential. *Curr Neurol Neurosci Rep* 5:275-283
74. Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH, National Institute for Clinical E (2006a) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5:235-245
75. Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P, Brown RG, Koller W, Barone P, MacPhee G, Kelly L, Rabey M, MacMahon D, Thomas S, Ondo W, Rye D, Forbes A, Tluk S, Dhawan V, Bowron A, Williams AJ, Olanow CW (2006b) International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: the NMSQuest study. *Mov Disord* 21:916-923
76. Chen QQ, Haikal C, Li W, Li JY (2019) Gut Inflammation in Association With Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Front Mol Neurosci* 12:218
77. Chen SG, Stribinskis V, Rane MJ, Demuth DR, Gozal E, Roberts AM, Jagadapillai R, Liu R, Choe K, Shivakumar B, Son F, Jin S, Kerber R, Adame A, Masliah E, Friedland RP (2016) Exposure to the Functional Bacterial Amyloid Protein Curli Enhances Alpha-Synuclein Aggregation in Aged Fischer 344 Rats and *Caenorhabditis elegans*. *Sci Rep* 6:34477
78. Chen SW, Drakulic S, Deas E, Ouberaï M, Aprile FA, Arranz R, Ness S, Roodveldt C, Guillems T, De-Genst EJ, Klenerman D, Wood NW, Knowles TP, Alfonso C, Rivas G, Abramov AY, Valpuesta JM, Dobson CM, Cremades N (2015) Structural characterization of toxic oligomers that are kinetically trapped during alpha-synuclein fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:E1994-2003
79. Chen YY, Yu S, Hu YH, Li CY, Artaud F, Carcaillon-Bentata L, Elbaz A, Lee PC (2021) Risk of Suicide Among Patients With Parkinson Disease. *JAMA Psychiatry* 78:293-301
80. Chia SJ, Tan EK, Chao YX (2020) Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci* 21
81. Chiocchetti R, Grandis A, Bombardi C, Lucchi ML, Dal Lago DT, Bortolami R, Furness JB (2006) Extrinsic and intrinsic sources of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the lamb ileum: a morphometric and neurochemical investigation. *Cell Tissue Res* 323:183-196
82. Chung SJ, Kim J, Lee HJ, Ryu HS, Kim K, Lee JH, Jung KW, Kim MJ, Kim MJ, Kim YJ, Yun SC, Lee JY, Hong SM, Myung SJ (2016) Alpha-synuclein in gastric and colonic mucosa in Parkinson's disease: Limited role as a biomarker. *Mov Disord* 31:241-249
83. Conway KA, Harper JD, Lansbury PT, Jr. (2000) Fibrils formed in vitro from alpha-synuclein and two mutant forms linked to Parkinson's disease are typical amyloid. *Biochemistry* 39:2552-2563
84. Conway KA, Rochet JC, Bieganski RM, Lansbury PT, Jr. (2001) Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct. *Science* 294:1346-1349
85. Cooke HJ (1986) Neurobiology of the intestinal mucosa. *Gastroenterology* 90:1057-1081
86. Coon EA, Cutsforth-Gregory JK, Benarroch EE (2018) Neuropathology of autonomic dysfunction in synucleinopathies. *Mov Disord* 33:349-358
87. Cooper AA, Gitler AD, Cashikar A, Haynes CM, Hill KJ, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn KE, Liu F, Cao S, Caldwell KA, Caldwell GA, Marsischky G, Kolodner RD, Labaer J, Rochet JC, Bonini NM, Lindquist S (2006) Alpha-synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson's models. *Science* 313:324-328
88. Corbillé AG, Letournel F, Kordower JH, Lee J, Shanes E, Neunlist M, Munoz DG, Derkinderen P, Beach TG (2016) Evaluation of alpha-synuclein immunohistochemical methods for the detection of Lewy-type synucleinopathy in gastrointestinal biopsies. *Acta Neuropathol Commun* 4:35

89. Costes LM, Boeckxstaens GE, de Jonge WJ, Cailotto C (2013) Neural networks in intestinal immunoregulation. *Organogenesis* 9:216-223
90. Craufurd DI, Harris R (1986) Ethics of predictive testing for Huntington's chorea: the need for more information. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293:249-251
91. David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol* 8:e1000450
92. Dawson VL, Dawson TM (2019) Promising disease-modifying therapies for Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 11
93. De Giorgio R, Ruggeri E, Stanghellini V, Eusebi LH, Bazzoli F, Chiarioni G (2015) Chronic constipation in the elderly: a primer for the gastroenterologist. *BMC Gastroenterol* 15:130
94. Del Tredici K, Rub U, De Vos RA, Bohl JR, Braak H (2002) Where does parkinson disease pathology begin in the brain? *J Neuropathol Exp Neurol* 61:413-426
95. Deleersnijder A, Gerard M, Debyser Z, Baekelandt V (2013) The remarkable conformational plasticity of alpha-synuclein: blessing or curse? *Trends in Molecular Medicine* 19:368-377
96. DelleDonne A, Klos KJ, Fujishiro H, Ahmed Z, Parisi JE, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Wszolek ZK, Uitti RJ, Ahlskog JE, Dickson DW (2008) Incidental Lewy body disease and preclinical Parkinson disease. *Arch Neurol* 65:1074-1080
97. den HJW, Bethlem J (1960) The distribution of Lewy bodies in the central and autonomic nervous systems in idiopathic paralysis agitans. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23:283-290
98. Derkinderen P (2019) Could it be that neurodegenerative diseases are infectious? *Rev Neurol (Paris)* 175:427-430
99. Deuschl G, Oertel W, Reichmann H (2016) DGN S3-Leitlinie "Idiopathisches Parkinson-Syndrom.". Deutsche Gesellschaft für Neurologie
100. Devi L, Raghavendran V, Prabhu BM, Avadhani NG, Anandatheerthavarada HK (2008) Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283:9089-9100
101. Dickson D, Weller RO (2011) Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders, John Wiley & Sons).
102. Dickson DW, Fujishiro H, DelleDonne A, Menke J, Ahmed Z, Klos KJ, Josephs KA, Frigerio R, Burnett M, Parisi JE, Ahlskog JE (2008) Evidence that incidental Lewy body disease is pre-symptomatic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 115:437-444
103. Dickson DW, Braak H, Duda JE, Duyckaerts C, Gasser T, Halliday GM, Hardy J, Leverenz JB, Del Tredici K, Wszolek ZK, Litvan I (2009) Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 8:1150-1157
104. Dobbs SM, Dobbs RJ, Weller C, Charlett A (2000) Link between *Helicobacter pylori* infection and idiopathic parkinsonism. *Med Hypotheses* 55:93-98
105. Dodel R, Berg D, Duning T, Kalbe E, Meyer PT, Ramirez A, Storch A, Aarsland D, Jessen F (2023) Demenz mit Lewy-Körpern: alte und neue Erkenntnisse – Teil 1: Klinik und Diagnostik. *Der Nervenarzt*
106. Doppler K, Jentschke HM, Schulmeyer L, Vadasz D, Janzen A, Luster M, Höffken H, Mayer G, Brumberg J, Booi J, Musacchio T, Klebe S, Sittig-Wiegand E, Volkmann J, Sommer C, Oertel WH (2017) Dermal phospho-alpha-synuclein deposits confirm REM sleep behaviour disorder as prodromal Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 133:535-545
107. Dorval V, Fraser PE (2006) Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of natively unfolded proteins tau and alpha-synuclein. *J Biol Chem* 281:9919-9924
108. Engelhardt E, Gomes MDM (2017) Lewy and his inclusion bodies: Discovery and rejection. *Dement Neuropsychol* 11:198-201
109. Evans DH, Murray JG (1954) Histological and functional studies on the fibre composition of the vagus nerve of the rabbit. *J Anat* 88:320-337
110. Evans RJ, Surprenant A (1992) Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP. *Br J Pharmacol* 106:242-249
111. Fanning S, Selkoe D, Dettmer U (2020) Parkinson's disease: proteinopathy or lipidopathy? *NPJ Parkinsons Dis* 6:3
112. Fayyad M, Majbour NK, Vaikath NN, Erskine D, El-Tarawneh H, Sudhakaran IP, Abdesslem H, El-Agnaf OMA (2020) Generation of Monoclonal Antibodies against Phosphorylated alpha-Synuclein at Serine 129: Research Tools for Synucleinopathies. *Neurosci Lett*:134899
113. Fearnley JM, Lees AJ (1991) Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity.

- Brain 114 (Pt 5):2283-2301
114. Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 135:755s-765s
 115. Fitzgerald E, Murphy S, Martinson HA (2019) Alpha-Synuclein Pathology and the Role of the Microbiota in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 13:369
 116. Forno LS (1969) Concentric hyalin intraneuronal inclusions of Lewy type in the brains of elderly persons (50 incidental cases): relationship to parkinsonism. *J Am Geriatr Soc* 17:557-575
 117. Forno LS (1996) Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55:259-272
 118. Foulds PG, Diggle P, Mitchell JD, Parker A, Hasegawa M, Masuda-Suzukake M, Mann DM, Allsop D (2013) A longitudinal study on alpha-synuclein in blood plasma as a biomarker for Parkinson's disease. *Sci Rep* 3:2540
 119. Fowler DM, Koulov AV, Alory-Jost C, Marks MS, Balch WE, Kelly JW (2006) Functional amyloid formation within mammalian tissue. *PLoS Biol* 4:e6
 120. Frede D (2020) Aristoteles: Nikomachische Ethik De Gruyter).
 121. Frigerio R, Fujishiro H, Ahn TB, Josephs KA, Maraganore DM, DelleDonne A, Parisi JE, Klos KJ, Boeve BF, Dickson DW, Ahlskog JE (2011) Incidental Lewy body disease: do some cases represent a preclinical stage of dementia with Lewy bodies? *Neurobiol Aging* 32:857-863
 122. Fujiwara H, Hasegawa M, Dohmae N, Kawashima A, Masliah E, Goldberg MS, Shen J, Takio K, Iwatsubo T (2002) alpha-Synuclein is phosphorylated in synucleinopathy lesions. *Nat Cell Biol* 4:160-164
 123. Fulda KG, Lykens K (2006) Ethical issues in predictive genetic testing: a public health perspective. *J Med Ethics* 32:143-147
 124. Furness JB (1970) The origin and distribution of adrenergic nerve fibres in the guinea-pig colon. *Histochemie* 21:295-306
 125. Furness JB, Costa M (1980) Types of nerves in the enteric nervous system. *Neuroscience* 5:1-20
 126. Furness JB (2006) The enteric nervous system, Wiley Online Library).
 127. Furness JB, Callaghan BP, Rivera LR, Cho HJ (2014) The enteric nervous system and gastrointestinal innervation: integrated local and central control. *Adv Exp Med Biol* 817:39-71
 128. Furness JB, Stebbing MJ (2018) The first brain: Species comparisons and evolutionary implications for the enteric and central nervous systems. *Neurogastroenterol Motil* 30
 129. Fusco G, De Simone A, Gopinath T, Vostrikov V, Vendruscolo M, Dobson CM, Veglia G (2014) Direct observation of the three regions in alpha-synuclein that determine its membrane-bound behaviour. *Nat Commun* 5:3827
 130. Gaenslen A, Swid I, Liepelt-Scarfone I, Godau J, Berg D (2011) The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26:653-658
 131. Gaig C, Tolosa E (2009) When does Parkinson's disease begin? *Mov Disord* 24 Suppl 2:S656-664
 132. Gajdusek DC (1977) Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 197:943-960
 133. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A (2016) Probiotics History. *J Clin Gastroenterol* 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116-s119
 134. Geddes AJ, Parker KD, Atkins ED, Beighton E (1968) "Cross-beta" conformation in proteins. *J Mol Biol* 32:343-358
 135. Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999) Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol* 56:33-39
 136. Gelpi E, Navarro-Otano J, Tolosa E, Gaig C, Compta Y, Rey MJ, Marti MJ, Hernandez I, Valldeoriola F, Rene R, Ribalta T (2014) Multiple organ involvement by alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Mov Disord* 29:1010-1018
 137. George JM, Jin H, Woods WS, Clayton DF (1995) Characterization of a novel protein regulated during the critical period for song learning in the zebra finch. *Neuron* 15:361-372
 138. George JM (2002) The synucleins. *Genome Biol* 3:REVIEWS3002
 139. Gershon MD (1967) Inhibition of gastrointestinal movement by sympathetic nerve stimulation: the site of action. *J Physiol* 189:317-327
 140. Gethmann CF, Sander T (1999). Rechtfertigungsdiskurse. In *Ethik in der Technikgestaltung: Praktische Relevanz und Legitimation*, Grunwald A, S Saupe, eds. (Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg), pp. 117-151.
 141. Giasson BI, Duda JE, Murray IV, Chen Q, Souza JM, Hurtig HI, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2000) Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration

- in synucleinopathy lesions. *Science* 290:985-989
142. Giasson BI, Murray IV, Trojanowski JQ, Lee VM (2001) A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly. *J Biol Chem* 276:2380-2386
143. Gibb WR, Lees AJ (1988) The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:745-752
144. Goetz CG, Poewe W, Rascol O, Sampaio C, Stebbins GT, Counsell C, Giladi N, Holloway RG, Moore CG, Wenning GK, Yahr MD, Seidl L (2004) Movement Disorder Society Task Force report on the Hoehn and Yahr staging scale: status and recommendations. *Mov Disord* 19:1020-1028
145. Goetz CG, Tilley BC, Shaftman SR, Stebbins GT, Fahn S, Martinez-Martin P, Poewe W, Sampaio C, Stern MB, Dodel R, Dubois B, Holloway R, Jankovic J, Kulisevsky J, Lang AE, Lees A, Leurgans S, LeWitt PA, Nyenhuis D, Olanow CW, Rascol O, Schrag A, Teresi JA, van Hilten JJ, LaPelle N, Movement Disorder Society URTF (2008) Movement Disorder Society-sponsored revision of the Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS): scale presentation and clinimetric testing results. *Mov Disord* 23:2129-2170
146. Gold A, Turkalp ZT, Munoz DG (2013) Enteric alpha-synuclein expression is increased in Parkinson's disease but not Alzheimer's disease. *Mov Disord* 28:237-240
147. Goldman JG, Goetz CG (2007) History of Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol* 83:107-128
148. Goldman JS (2020) Predictive Genetic Counseling for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future. *Cold Spring Harb Perspect Med* 10
149. Gomez-Tortosa E, Newell K, Irizarry MC, Albert M, Growdon JH, Hyman BT (1999) Clinical and quantitative pathologic correlates of dementia with Lewy bodies. *Neurology* 53:1284-1291
150. Gray MT, Munoz DG, Gray DA, Schlossmacher MG, Woulfe JM (2014) Alpha-synuclein in the appendiceal mucosa of neurologically intact subjects. *Movement Disorders* 29:991-998
151. Green T, Dockray GJ (1987) Calcitonin gene-related peptide and substance P in afferents to the upper gastrointestinal tract in the rat. *Neurosci Lett* 76:151-156
152. Greenfield JG, Bosanquet FD (1953) The brain-stem lesions in Parkinsonism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 16:213-226
153. Greten-Harrison B, Polydoro M, Morimoto-Tomita M, Diao L, Williams AM, Nie EH, Makani S, Tian N, Castillo PE, Buchman VL, Chandra SS (2010) alphetagamma-Synuclein triple knockout mice reveal age-dependent neuronal dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19573-19578
154. Grundy D (1988) Vagal control of gastrointestinal function. *Baillieres Clin Gastroenterol* 2:23-43
155. Gunn M (1968) Histological and histochemical observations on the myenteric and submucous plexuses of mammals. *J Anat* 102:223-239
156. Halliday G, Hely M, Reid W, Morris J (2008) The progression of pathology in longitudinally followed patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 115:409-415
157. Halliday G, Murphy K (2010). Pathology of Parkinson's disease. In *Blue Books of Neurology* (Elsevier), pp. 132-154.
158. Halliday G, McCann H, Shepherd C (2012) Evaluation of the Braak hypothesis: how far can it explain the pathogenesis of Parkinson's disease? *Expert Rev Neurother* 12:673-686
159. Han H, Weinreb PH, Lansbury PT, Jr. (1995) The core Alzheimer's peptide NAC forms amyloid fibrils which seed and are seeded by beta-amyloid: is NAC a common trigger or target in neurodegenerative disease? *Chem Biol* 2:163-169
160. Harapan BN, Frydrychowicz C, Classen J, Wittekind C, Gradistanac T, Rumpf JJ, Mueller W (2020) No enhanced (p-) α -synuclein deposition in gastrointestinal tissue of Parkinson's disease patients. *Parkinsonism Relat Disord* 80:82-88
161. Hasegawa M, Fujiwara H, Nonaka T, Wakabayashi K, Takahashi H, Lee VM, Trojanowski JQ, Mann D, Iwatsubo T (2002) Phosphorylated alpha-synuclein is ubiquitinated in alpha-synucleinopathy lesions. *J Biol Chem* 277:49071-49076
162. Hashimoto M, Yoshimoto M, Sisk A, Hsu LJ, Sundsmo M, Kittel A, Saitoh T, Miller A, Masliah E (1997) NACP, a synaptic protein involved in Alzheimer's disease, is differentially regulated during megakaryocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 237:611-616
163. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2007) Parkinson's disease: a dual-hit hypothesis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:599-614
164. Hawkes CH, Del Tredici K, Braak H (2009) Parkinson's disease: the dual hit theory revisited. *Ann N Y Acad Sci* 1170:615-622
165. Heath J (1983). The sympathetic nervous system: a novel perspective on the control of myelinating

- Schwann cells. In *Molecular Pathology of Nerve and Muscle* (Springer), pp. 21-37.
166. Herzog E (1928) Histopathologische Veränderungen im Sympathicus und ihre Bedeutung. *Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde* 107:75-80
 167. Hind A, Migliori M, Thacker M, Staikopoulos V, Nurgali K, Chiocchetti R, Furness JB (2005) Primary afferent neurons intrinsic to the guinea-pig intestine, like primary afferent neurons of spinal and cranial sensory ganglia, bind the lectin, IB4. *Cell Tissue Res* 321:151-157
 168. Hirst GD, McKirdy HC (1974) Presynaptic inhibition at mammalian peripheral synapse? *Nature* 250:430-431
 169. Hoehn MM, Yahr MD (1967) Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 17:427-442
 170. Höglinger G, Trenkwalder C (2023). Parkinson-Krankheit, S2k-Leitlinie. In *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie* (Deutsche Gesellschaft für Neurologie)
 171. Holdorff B (2002) Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950) and his work. *J Hist Neurosci* 11:19-28
 172. Holdorff B, Rodrigues e Silva AM, Dodel R (2013) Centenary of Lewy bodies (1912-2012). *J Neural Transm (Vienna)* 120:509-516
 173. Holst MC, Kelly JB, Powley TL (1997) Vagal preganglionic projections to the enteric nervous system characterized with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 381:81-100
 174. Holzer P (2006) Efferent-like roles of afferent neurons in the gut: Blood flow regulation and tissue protection. *Auton Neurosci* 125:70-75
 175. Hopkins DA, Bieger D, deVente J, Steinbusch WM (1996) Vagal efferent projections: viscerotopy, neurochemistry and effects of vagotomy. *Prog Brain Res* 107:79-96
 176. Hornby PJ, Abrahams TP (2000) Central control of lower esophageal sphincter relaxation. *Am J Med* 108 Suppl 4a:90s-98s
 177. Horsager J, Andersen KB, Knudsen K, Skjærbæk C, Fedorova TD, Okkels N, Schaeffer E, Bonkat SK, Geday J, Otto M, Sommerauer M, Danielsen EH, Bech E, Kraft J, Munk OL, Hansen SD, Pavese N, Göder R, Brooks DJ, Berg D, Borghammer P (2020) Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. *Brain*
 178. Hurtig HI, Trojanowski JQ, Galvin J, Ewbank D, Schmidt ML, Lee VM, Clark CM, Glosser G, Stern MB, Gollomp SM, Arnold SE (2000) Alpha-synuclein cortical Lewy bodies correlate with dementia in Parkinson's disease. *Neurology* 54:1916-1921
 179. Hurwitz B (2017) The Status of "Nonmotor" Features of the Malady in an Essay on the Shaking Palsy (1817). *Int Rev Neurobiol* 133:3-12
 180. Ishihara LS, Cheesbrough A, Brayne C, Schrag A (2007) Estimated life expectancy of Parkinson's patients compared with the UK population. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:1304-1309
 181. Ito S, Takao M, Hatsuta H, Kanemaru K, Arai T, Saito Y, Fukayama M, Murayama S (2014). Alpha-synuclein immunohistochemistry of gastrointestinal and biliary surgical specimens for diagnosis of Lewy body disease. In *International journal of clinical and experimental pathology*, pp. 1714-1723
 182. Iwai A, Masliah E, Yoshimoto M, Ge N, Flanagan L, de Silva HA, Kittel A, Saitoh T (1995) The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system. *Neuron* 14:467-475
 183. Iyer A, Roeters SJ, Schilderink N, Hommersom B, Heeren RM, Woutersen S, Claessens MM, Subramaniam V (2016) The Impact of N-terminal Acetylation of alpha-Synuclein on Phospholipid Membrane Binding and Fibril Structure. *J Biol Chem* 291:21110-21122
 184. Jellinger KA (2003) Alpha-synuclein pathology in Parkinson's and Alzheimer's disease brain: incidence and topographic distribution--a pilot study. *Acta Neuropathol* 106:191-201
 185. Jellinger KA (2004) Lewy body-related alpha-synucleinopathy in the aged human brain. *J Neural Transm (Vienna)* 111:1219-1235
 186. Jellinger KA (2009) A critical evaluation of current staging of alpha-synuclein pathology in Lewy body disorders. *Biochim Biophys Acta* 1792:730-740
 187. Jellinger KA, Korczyn AD (2018) Are dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease dementia the same disease? *BMC Med* 16:34
 188. Jellinger KA (2019) Is Braak staging valid for all types of Parkinson's disease? *J Neural Transm (Vienna)* 126:423-431
 189. Jones CA, Ciucci MR (2016) Multimodal Swallowing Evaluation with High-Resolution Manometry Reveals Subtle Swallowing Changes in Early and Mid-Stage Parkinson Disease. *J Parkinsons Dis* 6:197-208
 190. Jütte R (1992) Vom medizinischen Casus zur Kranken-Geschichte. *Berichte Zur Wissenschaftsgeschichte* 15:50-52

191. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RK (2008a) Controversies over the staging of alpha-synuclein pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 116:125-128; author reply 129-131
192. Kalaitzakis ME, Graeber MB, Gentleman SM, Pearce RKB (2008b) The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of α -synuclein staging. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 34:284-295
193. Kalia LV, Lang AE (2015) Parkinson's disease. *Lancet* 386:896-912
194. Kalia LV (2018) Diagnostic biomarkers for Parkinson's disease: focus on α -synuclein in cerebrospinal fluid. *Parkinsonism Relat Disord*
195. Kant I (1785) *Grundlegung zur Metaphysik der Sitten*, Vol 65, L. Klotz).
196. Kant I (1797) *Metaphysik der Sitten*, Felix Meiner).
197. Kaye J, Gage H, Kimber A, Storey L, Trend P (2006) Excess burden of constipation in Parkinson's disease: a pilot study. *Mov Disord* 21:1270-1273
198. Killinger B, Kordower JH (2019) Spreading of alpha-synuclein - relevant or epiphenomenon? *J Neurochem*
199. Killinger B, Labrie V (2019) The Appendix in Parkinson's Disease: From Vestigial Remnant to Vital Organ? *J Parkinsons Dis* 9:S345-s358
200. Killinger BA, Madaj Z, Sikora JW, Rey N, Haas AJ, Vepa Y, Lindqvist D, Chen H, Thomas PM, Brundin P, Brundin L, Labrie V (2018) The vermiform appendix impacts the risk of developing Parkinson's disease. *Sci Transl Med* 10
201. Kim S, Jeon BS, Heo C, Im PS, Ahn TB, Seo JH, Kim HS, Park CH, Choi SH, Cho SH, Lee WJ, Suh YH (2004) Alpha-synuclein induces apoptosis by altered expression in human peripheral lymphocyte in Parkinson's disease. *Faseb j* 18:1615-1617
202. Klingelhoefer L, Reichmann H (2015) Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. *Nat Rev Neurol* 11:625-636
203. Knudsen K, Fedorova TD, Bekker AC, Iversen P, Østergaard K, Krogh K, Borghammer P (2017) Objective Colonic Dysfunction is Far more Prevalent than Subjective Constipation in Parkinson's Disease: A Colon Transit and Volume Study. *J Parkinsons Dis* 7:359-367
204. Kontopoulos E, Parvin JD, Feany MB (2006) Alpha-synuclein acts in the nucleus to inhibit histone acetylation and promote neurotoxicity. *Hum Mol Genet* 15:3012-3023
205. Kontopoulos Hum Mol Genet. 2006Goers J, Manning-Bog AB, McCormack AL, Millett IS, Doniach S, Di Monte DA, Uversky VN, Fink AL (2003) Nuclear localization of alpha-synuclein and its interaction with histones. *Biochemistry* 42:8465-8471
206. Kordower JH, Chu Y, Hauser RA, Freeman TB, Olanow CW (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med* 14:504-506
207. Kosaka K, Tsuchiya K, Yoshimura M (1988) Lewy body disease with and without dementia: a clinicopathological study of 35 cases. *Clin Neuropathol* 7:299-305
208. Kovacs GG, Wagner U, Dumont B, Pikkarainen M, Osman AA, Streichenberger N, Leisser I, Verchère J, Baron T, Alafuzoff I, Budka H, Perret-Liaudet A, Lachmann I (2012) An antibody with high reactivity for disease-associated α -synuclein reveals extensive brain pathology. *Acta Neuropathol* 124:37-50
209. Kramer ML, Schulz-Schaeffer WJ (2007) Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies. *J Neurosci* 27:1405-1410
210. Kupsky WJ, Grimes MM, Sweeting J, Bertsch R, Cote LJ (1987) Parkinson's disease and megacolon: concentric hyaline inclusions (Lewy bodies) in enteric ganglion cells. *Neurology* 37:1253-1255
211. Kushnirov VV, Dergalev AA, Alexandrov AI (2020) Proteinase K resistant cores of prions and amyloids. *Prion* 14:11-19
212. Langley JN (1921) *The autonomic nervous system* (Pt. I).
213. Lebouvier T, Chaumette T, Damier P, Coron E, Touchefeu Y, Vrignaud S, Naveilhan P, Galmiche JP, Bruley des Varannes S, Derkinderen P, Neunlist M (2008) Pathological lesions in colonic biopsies during Parkinson's disease. *Gut* 57:1741-1743
214. Lebouvier T, Coron E, Chaumette T, Paillusson S, Bruley des Varannes S, Neunlist M, Derkinderen P (2010a) Routine colonic biopsies as a new tool to study the enteric nervous system in living patients. *Neurogastroenterol Motil* 22:e11-14
215. Lebouvier T, Neunlist M, Bruley des Varannes S, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Chaumette T, Tasselli M, Paillusson S, Flamand M, Galmiche JP, Damier P, Derkinderen P (2010b) Colonic biopsies to assess the neuropathology of Parkinson's disease and its relationship with symptoms. *PLoS One*

- 5:e12728
216. Lebouvier T, Pouclet H, Coron E, Drouard A, N'Guyen JM, Roy M, Vavasseur F, Bruley des Varannes S, Damier P, Neunlist M, Derkinderen P, Rouaud T (2011) Colonic neuropathology is independent of olfactory dysfunction in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis* 1:389-394
 217. Lee A, Gilbert RM (2016) Epidemiology of Parkinson Disease. *Neurol Clin* 34:955-965
 218. Lee HJ, Jung KW, Chung SJ, Hong SM, Kim J, Lee JH, Hwang SW, Ryu HS, Kim MJ, Lee HS, Seo M, Park SH, Yang DH, Ye BD, Byeon JS, Choe J, Jung HY, Yang SK, Myung SJ (2018) Relation of Enteric α -Synuclein to Gastrointestinal Dysfunction in Patients With Parkinson's Disease and in Neurologically Intact Subjects. *J Neurogastroenterol Motil* 24:469-478
 219. Lees AJ, Selikhova M, Andrade LA, Duyckaerts C (2008) The black stuff and Konstantin Nikolaevich Tretiakoff. *Mov Disord* 23:777-783
 220. Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009) Parkinson's disease. *Lancet* 373:2055-2066
 221. Leverenz JB, Hamilton R, Tsuang DW, Schantz A, Vavrek D, Larson EB, Kukull WA, Lopez O, Galasko D, Masliah E, Kaye J, Woltjer R, Clark C, Trojanowski JQ, Montine TJ (2008) Empiric Refinement of the Pathologic Assessment of Lewy-Related Pathology in the Dementia Patient. *Brain Pathology* 18:220-224
 222. Levin J, Kurz A, Arzberger T, Giese A, Höglinger GU (2016) The differential diagnosis and treatment of atypical parkinsonism. *Deutsches Ärzteblatt International* 113:61
 223. Lewitan A, Nathanson L, Slade WR, Jr. (1951) Megacolon and dilatation of the small bowel in parkinsonism. *Gastroenterology* 17:367-374
 224. Lewy FH (1912). Paralysis agitans. I. Pathologische Anatomie. In *Handbuch der Neurologie*, Lewandowsky, ed. (Berlin, Springer Verlag), pp. Seite 920–933.
 225. Li JY, Englund E, Holton JL, Soulet D, Hagell P, Lees AJ, Lashley T, Quinn NP, Rehnström S, Björklund A, Widner H, Revesz T, Lindvall O, Brundin P (2008) Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med* 14:501-503
 226. Li QX, Campbell BC, McLean CA, Thyagarajan D, Gai WP, Kapsa RM, Beyreuther K, Masters CL, Culvenor JG (2002) Platelet alpha- and gamma-synucleins in Parkinson's disease and normal control subjects. *J Alzheimers Dis* 4:309-315
 227. Li W, West N, Colla E, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson TM, Jakala P, Hartmann T, Price DL, Lee MK (2005) Aggregation promoting C-terminal truncation of alpha-synuclein is a normal cellular process and is enhanced by the familial Parkinson's disease-linked mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:2162-2167
 228. Li WW, Yang R, Guo JC, Ren HM, Zha XL, Cheng JS, Cai DF (2007) Localization of alpha-synuclein to mitochondria within midbrain of mice. *Neuroreport* 18:1543-1546
 229. Li Y, Zhao C, Luo F, Liu Z, Gui X, Luo Z, Zhang X, Li D, Liu C, Li X (2018) Amyloid fibril structure of alpha-synuclein determined by cryo-electron microscopy. *Cell Res* 28:897-903
 230. Liu B, Fang F, Pedersen NL, Tillander A, Ludvigsson JF, Ekbom A, Svenningsson P, Chen H, Wirdefeldt K (2017) Vagotomy and Parkinson disease: A Swedish register-based matched-cohort study. *Neurology* 88:1996-2002
 231. Liu B, Fang F, Ye W, Wirdefeldt K (2020) Appendectomy, Tonsillectomy and Parkinson's Disease Risk: A Swedish Register-Based Study. *Front Neurol* 11:510
 232. Lomax AE, O'Reilly M, Neshat S, Vanner SJ (2007) Sympathetic vasoconstrictor regulation of mouse colonic submucosal arterioles is altered in experimental colitis. *J Physiol* 583:719-730
 233. Lomax AE, Sharkey KA, Furness JB (2010) The participation of the sympathetic innervation of the gastrointestinal tract in disease states. *Neurogastroenterol Motil* 22:7-18
 234. Lu HT, Shen QY, Xie D, Zhao QZ, Xu YM (2019) Lack of association between appendectomy and Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. *Aging Clin Exp Res*
 235. Lu J, Zhang S, Ma X, Jia C, Liu Z, Huang C, Liu C, Li D (2020) Structural basis of the interplay between α -synuclein and Tau in regulating pathological amyloid aggregation. *J Biol Chem*
 236. Luk KC, Kehm V, Carroll J, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012a) Pathological alpha-synuclein transmission initiates Parkinson-like neurodegeneration in nontransgenic mice. *Science* 338:949-953
 237. Luk KC, Kehm VM, Zhang B, O'Brien P, Trojanowski JQ, Lee VM (2012b) Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med* 209:975-986
 238. Lundgren O (2000) Sympathetic input into the enteric nervous system. *Gut* 47 Suppl 4:iv33-35; discussion iv36

239. Lyon L (2018) 'All disease begins in the gut': was Hippocrates right? *Brain*
240. Ma J, Gao J, Wang J, Xie A (2019a) Prion-Like Mechanisms in Parkinson's Disease. *Front Neurosci* 13:552
241. Ma LY, Liu GL, Wang DX, Zhang MM, Kou WY, Feng T (2019b) Alpha-Synuclein in Peripheral Tissues in Parkinson's Disease. *ACS Chem Neurosci* 10:812-823
242. MacIntyre AC (1981) *After virtue: a study in moral theory*, Vol 92, University of Notre Dame Press).
243. Maeda T, Nagata K, Satoh Y, Yamazaki T, Takano D (2013) High prevalence of gastroesophageal reflux disease in Parkinson's disease: a questionnaire-based study. *Parkinson's disease* 2013:742128
244. Mahlknecht P, Seppi K, Poewe W (2015) The Concept of Prodromal Parkinson's Disease. *J Parkinsons Dis* 5:681-697
245. Mahowald MW, Schenck CH (2018) The "when" and "where" of alpha-synucleinopathies: Insights from REM sleep behavior disorder. *Neurology* 91:435-436
246. Maji SK, Perrin MH, Sawaya MR, Jessberger S, Vadodaria K, Rissman RA, Singru PS, Nilsson KP, Simon R, Schubert D, Eisenberg D, Rivier J, Sawchenko P, Vale W, Riek R (2009) Functional amyloids as natural storage of peptide hormones in pituitary secretory granules. *Science* 325:328-332
247. Manyam BV (1990) Paralysis agitans and levodopa in "Ayurveda": ancient Indian medical treatise. *Mov Disord* 5:47-48
248. Maraganore DM, Anderson DW, Bower JH, McDonnell SK, Rocca WA (1999) Autopsy patterns for Parkinson's disease and related disorders in Olmsted County, Minnesota. *Neurology* 53:1342-1342
249. Maroteaux L, Campanelli JT, Scheller RH (1988) Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal. *J Neurosci* 8:2804-2815
250. Marsili L, Rizzo G, Colosimo C (2018) Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease: From James Parkinson to the Concept of Prodromal Disease. *Front Neurol* 9:156
251. Martinez-Martin P, Schapira AH, Stocchi F, Sethi K, Odin P, MacPhee G, Brown RG, Naidu Y, Clayton L, Abe K, Tsuboi Y, MacMahon D, Barone P, Rabey M, Bonuccelli U, Forbes A, Breen K, Tluk S, Olanow CW, Thomas S, Rye D, Hand A, Williams AJ, Ondo W, Chaudhuri KR (2007) Prevalence of nonmotor symptoms in Parkinson's disease in an international setting; study using nonmotor symptoms questionnaire in 545 patients. *Mov Disord* 22:1623-1629
252. Martínez-Martin P, Forjaz MJ, Frades-Payo B, Rusiñol AB, Fernández-García JM, Benito-León J, Arillo VC, Barberá MA, Sordo MP, Catalán MJ (2007) Caregiver burden in Parkinson's disease. *Mov Disord* 22:924-931; quiz 1060
253. Marttila RJ, Rinne UK (1991) Progression and survival in Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 136:24-28
254. McBride PA, Schulz-Schaeffer WJ, Donaldson M, Bruce M, Diringer H, Kretschmar HA, Beekes M (2001) Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol* 75:9320-9327
255. McCormack AL, Mak SK, Di Monte DA (2012) Increased alpha-synuclein phosphorylation and nitration in the aging primate substantia nigra. *Cell Death Dis* 3:e315
256. McCulloch CR, Cooke HJ (1989) Human alpha-calcitonin gene-related peptide influences colonic secretion by acting on myenteric neurons. *Regul Pept* 24:87-96
257. McFarland NR (2016) Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes. *Continuum (Minneapolis)* 22:1117-1142
258. McKeith IG, Galasko D, Kosaka K, Perry EK, Dickson DW, Hansen LA, Salmon DP, Lowe J, Mirra SS, Byrne EJ, Lennox G, Quinn NP, Edwardson JA, Ince PG, Bergeron C, Burns A, Miller BL, Lovestone S, Collerton D, Jansen EN, Ballard C, de Vos RA, Wilcock GK, Jellinger KA, Perry RH (1996) Consensus guidelines for the clinical and pathologic diagnosis of dementia with Lewy bodies (DLB): report of the consortium on DLB international workshop. *Neurology* 47:1113-1124
259. McKeith IG, Dickson DW, Lowe J, Emre M, O'Brien JT, Feldman H, Cummings J, Duda JE, Lippa C, Perry EK, Aarsland D, Arai H, Ballard CG, Boeve B, Burn DJ, Costa D, Del Ser T, Dubois B, Galasko D, Gauthier S, Goetz CG, Gomez-Tortosa E, Halliday G, Hansen LA, Hardy J, Iwatsubo T, Kalaria RN, Kaufer D, Kenny RA, Korczyn A, Kosaka K, Lee VM, Lees A, Litvan I, Londos E, Lopez OL, Minoshima S, Mizuno Y, Molina JA, Mukaetova-Ladinska EB, Pasquier F, Perry RH, Schulz JB, Trojanowski JQ, Yamada M, Consortium on DLB (2005) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: third report of the DLB Consortium. *Neurology* 65:1863-1872
260. McKeith IG, Boeve BF, Dickson DW, Halliday G, Taylor JP, Weintraub D, Aarsland D, Galvin J, Attems J, Ballard CG, Bayston A, Beach TG, Blanc F, Bohnen N, Bonanni L, Bras J, Brundin P, Burn D, Chen-Plotkin A, Duda JE, El-Agnaf O, Feldman H, Ferman TJ, Ffytche D, Fujishiro H, Galasko D,

- Goldman JG, Gomperts SN, Graff-Radford NR, Honig LS, Iranzo A, Kantarci K, Kaufer D, Kukull W, Lee VMY, Leverenz JB, Lewis S, Lippa C, Lunde A, Masellis M, Masliah E, McLean P, Mollenhauer B, Montine TJ, Moreno E, Mori E, Murray M, O'Brien JT, Orimo S, Postuma RB, Ramaswamy S, Ross OA, Salmon DP, Singleton A, Taylor A, Thomas A, Tiraboschi P, Toledo JB, Trojanowski JQ, Tsuang D, Walker Z, Yamada M, Kosaka K (2017) Diagnosis and management of dementia with Lewy bodies: Fourth consensus report of the DLB Consortium. *Neurology* 89:88-100
261. Meade RM, Fairlie DP, Mason JM (2019) Alpha-synuclein structure and Parkinson's disease - lessons and emerging principles. *Mol Neurodegener* 14:29
 262. Meissner G (1857) Über die Nerven der Darmwand. *Z Ration Med NF* 8:364-366
 263. Melki R (2018) Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. *Rev Neurol (Paris)* 174:644-652
 264. Mendes A, Goncalves A, Vila-Cha N, Moreira I, Fernandes J, Damasio J, Teixeira-Pinto A, Taipa R, Lima AB, Cavaco S (2015) Appendectomy may delay Parkinson's disease Onset. *Mov Disord* 30:1404-1407
 265. Miake H, Mizusawa H, Iwatsubo T, Hasegawa M (2002) Biochemical characterization of the core structure of alpha-synuclein filaments. *J Biol Chem* 277:19213-19219
 266. Mill JS (1861) *Utilitarianism*, Oxford University Press UK).
 267. Miraglia F, Colla E (2019) Microbiome, Parkinson's Disease and Molecular Mimicry. *Cells* 8
 268. Moisan F, Kab S, Mohamed F, Canonico M, Le Guern M, Quintin C, Carcaillon L, Nicolau J, Duport N, Singh-Manoux A, Boussac-Zarebska M, Elbaz A (2016) Parkinson disease male-to-female ratios increase with age: French nationwide study and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 87:952-957
 269. Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's D (2003) The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations. *Mov Disord* 18:738-750
 270. Mueller C, Soysal P, Rongve A, Isik AT, Thompson T, Maggi S, Smith L, Basso C, Stewart R, Ballard C, O'Brien JT, Aarsland D, Stubbs B, Veronese N (2019) Survival time and differences between dementia with Lewy bodies and Alzheimer's disease following diagnosis: A meta-analysis of longitudinal studies. *Ageing Res Rev* 50:72-80
 271. Muller CM, de Vos RA, Maurage CA, Thal DR, Tolnay M, Braak H (2005) Staging of sporadic Parkinson disease-related alpha-synuclein pathology: inter- and intra-rater reliability. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:623-628
 272. Munch G, Luth HJ, Wong A, Arendt T, Hirsch E, Ravid R, Riederer P (2000) Crosslinking of alpha-synuclein by advanced glycation endproducts--an early pathophysiological step in Lewy body formation? *J Chem Neuroanat* 20:253-257
 273. Murray IV, Giasson BI, Quinn SM, Koppaka V, Axelsen PH, Ischiropoulos H, Trojanowski JQ, Lee VM (2003) Role of alpha-synuclein carboxy-terminus on fibril formation in vitro. *Biochemistry* 42:8530-8540
 274. Neumann M, Kahle PJ, Giasson BI, Ozmen L, Borroni E, Spooen W, Muller V, Odoy S, Fujiwara H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Kretschmar HA, Haass C (2002) Misfolded proteinase K-resistant hyperphosphorylated alpha-synuclein in aged transgenic mice with locomotor deterioration and in human alpha-synucleinopathies. *J Clin Invest* 110:1429-1439
 275. Neumann M, Muller V, Kretschmar HA, Haass C, Kahle PJ (2004) Regional distribution of proteinase K-resistant alpha-synuclein correlates with Lewy body disease stage. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:1225-1235
 276. North RA, Surprenant A (1985) Inhibitory synaptic potentials resulting from alpha 2-adrenoceptor activation in guinea-pig submucous plexus neurones. *J Physiol* 358:17-33
 277. Nuebling GS, Butzhammer E, Lorenz S (2021) Assisted Suicide in Parkinsonian Disorders. *Front Neurol* 12:656599
 278. Nussbaum MC (1987) Nature, function, and capability: Aristotle on political distribution, World Institute for Development Economics Research of the United Nations University).
 279. Okuzumi A, Hatano T, Matsumoto G, Nojiri S, Ueno S-i, Imamichi-Tatano Y, Kimura H, Kakuta S, Kondo A, Fukuhara T, Li Y, Funayama M, Saiki S, Taniguchi D, Tsunemi T, McIntyre D, Gérardy J-J, Mittelbronn M, Kruger R, Uchiyama Y, Nukina N, Hattori N (2023) Propagative α -synuclein seeds as serum biomarkers for synucleinopathies. *Nature Medicine* 29:1448-1455
 280. Oosawa F, Asakura S (1975) *Thermodynamics of the Polymerization of Protein*, Academic Press).
 281. Otte R (2003) Wenn Ethik der Fall ist: Narrative und Kasuistik in der Medizin, Humanities online).
 282. Oueslati A, Fournier M, Lashuel HA (2010) Role of post-translational modifications in modulating the

- structure, function and toxicity of alpha-synuclein: implications for Parkinson's disease pathogenesis and therapies. *Prog Brain Res* 183:115-145
283. Oueslati A (2016) Implication of Alpha-Synuclein Phosphorylation at S129 in Synucleinopathies: What Have We Learned in the Last Decade? *J Parkinsons Dis* 6:39-51
284. Pan-Montojo F, Anichtchik O, Denning Y, Knels L, Pursche S, Jung R, Jackson S, Gille G, Spillantini MG, Reichmann H, Funk RH (2010) Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS One* 5:e8762
285. Pan-Montojo F, Schwarz M, Winkler C, Arnhold M, O'Sullivan GA, Pal A, Said J, Marsico G, Verbavatz JM, Rodrigo-Angulo M, Gille G, Funk RH, Reichmann H (2012) Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice. *Sci Rep* 2:898
286. Parkinson J (1817) *An Essay on the Shaking Palsy* (London: Sherwood, Neely and Jones).
287. Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 14:223-236; discussion 222
288. Parkkinen L, Kauppinen T, Pirttilä T, Autere JM, Alafuzoff I (2005) Alpha-synuclein pathology does not predict extrapyramidal symptoms or dementia. *Ann Neurol* 57:82-91
289. Parkkinen L, Pirttilä T, Alafuzoff I (2008) Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. *Acta Neuropathol* 115:399-407
290. Parsa-Parsi RW (2017) The Revised Declaration of Geneva: A Modern-Day Physician's Pledge. *JAMA* 318:1971-1972
291. Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, Moskalyuk A, Pulizzi R, Giugliano M, Van den Haute C, Melki R, Baekelandt V (2015) alpha-Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration. *Nature* 522:340-344
292. Peng H, Chen S, Wu S, Shi X, Ma J, Yang H, Li X (2023) Alpha-synuclein in skin as a high-quality biomarker for Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 451:120730
293. Phillips RJ, Walter GC, Ringer BE, Higgs KM, Powley TL (2009) Alpha-synuclein immunopositive aggregates in the myenteric plexus of the aging Fischer 344 rat. *Exp Neurol* 220:109-119
294. Pieri L, Madiona K, Melki R (2016) Structural and functional properties of prefibrillar alpha-synuclein oligomers. *Sci Rep* 6:24526
295. Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047
296. Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE, Halliday G, Goetz CG, Gasser T, Dubois B, Chan P, Bloem BR, Adler CH, Deuschl G (2015a) MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30:1591-1601
297. Postuma RB, Gagnon JF, Bertrand JA, Genier Marchand D, Montplaisir JY (2015b) Parkinson risk in idiopathic REM sleep behavior disorder: preparing for neuroprotective trials. *Neurology* 84:1104-1113
298. Postuma RB, Berg D (2017) The New Diagnostic Criteria for Parkinson's Disease. *Int Rev Neurobiol* 132:55-78
299. Postuma RB, Berg D (2019) Prodromal Parkinson's Disease: The Decade Past, the Decade to Come. *Mov Disord* 34:665-675
300. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, Des Varannes SB, Neunlist M, Derkinderen P (2012a) A comparison between colonic submucosa and mucosa to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurogastroenterol Motil* 24:e202-205
301. Pouclet H, Lebouvier T, Coron E, des Varannes SB, Rouaud T, Roy M, Neunlist M, Derkinderen P (2012b) A comparison between rectal and colonic biopsies to detect Lewy pathology in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 45:305-309
302. Powley TL, Holst MC, Boyd DB, Kelly JB (1994) Three-dimensional reconstructions of autonomic projections to the gastrointestinal tract. *Microsc Res Tech* 29:297-309
303. Prechtel JC, Powley TL (1990) The fiber composition of the abdominal vagus of the rat. *Anat Embryol (Berl)* 181:101-115
304. Prusiner SB (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216:136-144
305. Prusiner SB (2013) Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet* 47:601-623
306. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V (2003) Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest* 111:3-10

307. Punsoni M, Friedman JH, Resnick M, Donahue JE, Yang DF, Stopa EG (2019) Enteric Pathologic Manifestations of Alpha-Synucleinopathies. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 27:543-548
308. Qualman SJ, Haupt HM, Yang P, Hamilton SR (1984) Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. *Gastroenterology* 87:848-856
309. Recasens A, Dehay B, Bove J, Carballo-Carbajal I, Dovero S, Perez-Villalba A, Fernagut PO, Blesa J, Parent A, Perier C, Farinas I, Obeso JA, Bezard E, Vila M (2014) Lewy body extracts from Parkinson disease brains trigger alpha-synuclein pathology and neurodegeneration in mice and monkeys. *Ann Neurol* 75:351-362
310. Rizzo G, Copetti M, Arcuti S, Martino D, Fontana A, Logroscino G (2016) Accuracy of clinical diagnosis of Parkinson disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology* 86:566-576
311. Rodríguez-Violante M, Cervantes-Arriaga A, Villar-Velarde A, Corona T (2010) Prevalence of non-motor dysfunction among Parkinson's disease patients from a tertiary referral center in Mexico City. *Clin Neurol Neurosurg* 112:883-885
312. Rolli-Derkinderen M, Leclair-Visonneau L, Bourreille A, Coron E, Neunlist M, Derkinderen P (2020) Is Parkinson's disease a chronic low-grade inflammatory bowel disease? *J Neurol* 267:2207-2213
313. Rovere M, Sanderson JB, Fonseca-Ornelas L, Patel DS, Bartels T (2018) Refolding of helical soluble alpha-synuclein through transient interaction with lipid interfaces. *FEBS Lett* 592:1464-1472
314. Ruffmann C, Parkkinen L (2016) Gut Feelings About α -Synuclein in Gastrointestinal Biopsies: Biomarker in the Making? *Mov Disord* 31:193-202
315. Ruffmann C, Bengoa-Vergniory N, Poggiolini I, Ritchie D, Hu MT, Alegre-Abarrategui J, Parkkinen L (2018) Detection of alpha-synuclein conformational variants from gastro-intestinal biopsy tissue as a potential biomarker for Parkinson's disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 44:722-736
316. Saito Y, Kawashima A, Ruberu NN, Fujiwara H, Koyama S, Sawabe M, Arai T, Nagura H, Yamanouchi H, Hasegawa M, Iwatsubo T, Murayama S (2003) Accumulation of phosphorylated alpha-synuclein in aging human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:644-654
317. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S (2004) Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:742-749
318. Sánchez-Ferro Á, Rábano A, Catalán MJ, Rodríguez-Valcárcel FC, Fernández Díez S, Herreros-Rodríguez J, García-Cobos E, Álvarez-Santullano MM, López-Manzanares L, Mosqueira AJ, Vela Desojo L, López-Lozano JJ, López-Valdés E, Sánchez-Sánchez R, Molina-Arjona JA (2015) In vivo gastric detection of α -synuclein inclusions in Parkinson's disease. *Mov Disord* 30:517-524
319. Sandmann-Keil D, Braak H (2005) [Postmortal diagnosis of Parkinson's disease]. *Pathologie* 26:214-220
320. Savica R, Carlin JM, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Maraganore DM, Bharucha AE, Rocca WA (2009) Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study. *Neurology* 73:1752-1758
321. Schabadasch A (1930) Intramurale nervengeflechte des darmrohrs. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 10:320
322. Schaeffer E, Rogge A, Nieding K, Helmker V, Letsch C, Hauptmann B, Berg D (2020) Patients' views on the ethical challenges of early Parkinson disease detection. *Neurology* 94:e2037-e2044
323. Schaeffer E, Toedt I, Köhler S, Rogge A, Berg D (2021) Risk Disclosure in Prodromal Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 36:2833-2839
324. Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P (2017) Non-motor features of Parkinson disease. *Nat Rev Neurosci* 18:435-450
325. Scheckel C, Aguzzi A (2018) Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat Rev Genet* 19:405-418
326. Scheuermann DW, Stach W (1984) Fluorescence microscopic study of the architecture and structure of an adrenergic network in the plexus myentericus (Auerbach), plexus submucosus externus (Schabadasch) and plexus submucosus internus (Meissner) of the porcine small intestine. *Acta Anat (Basel)* 119:49-59
327. Schilder JC, Overmars SS, Marinus J, van Hilten JJ, Koehler PJ (2017) The terminology of akinesia, bradykinesia and hypokinesia: Past, present and future. *Parkinsonism Relat Disord* 37:27-35
328. Schmid AW, Fauvet B, Moniatte M, Lashuel HA (2013) Alpha-synuclein post-translational modifications as potential biomarkers for Parkinson disease and other synucleinopathies. *Mol Cell Proteomics* 12:3543-3558
329. Schneewind JB (1963) First principles and common sense morality in sidgwick's ethics. *Archiv für*

- Geschichte der Philosophie 45:137-156
330. Schneider SA, Alcalay RN (2017) Neuropathology of genetic synucleinopathies with parkinsonism: Review of the literature. *Mov Disord* 32:1504-1523
 331. Schulz-Schaeffer WJ, Fatzer R, Vandevelde M, Kretzschmar HA (2000a) Detection of PrP(Sc) in subclinical BSE with the paraffin-embedded tissue (PET) blot. *Arch Virol Suppl*:173-180
 332. Schulz-Schaeffer WJ, Tschoke S, Kranefuss N, Drose W, Hause-Reitner D, Giese A, Groschup MH, Kretzschmar HA (2000b) The paraffin-embedded tissue blot detects PrPSC early in the incubation time in prion diseases. *American Journal of Pathology* 156:51-56
 333. Schulz-Schaeffer WJ (2010) The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. *Acta Neuropathol* 120:131-143
 334. Schulz-Schaeffer WJ (2015) Is Cell Death Primary or Secondary in the Pathophysiology of Idiopathic Parkinson's Disease? *Biomolecules* 5:1467-1479
 335. Sengupta JN, Gebhart GF (1994) Characterization of mechanosensitive pelvic nerve afferent fibers innervating the colon of the rat. *J Neurophysiol* 71:2046-2060
 336. Sezgin M, Bilgic B, Tinaz S, Emre M (2019) Parkinson's Disease Dementia and Lewy Body Disease. *Semin Neurol* 39:274-282
 337. Shahed J, Jankovic J (2007) Motor symptoms in Parkinson's disease. *Handb Clin Neurol* 83:329-342
 338. Shahmoradian SH, Lewis AJ, Genoud C, Hench J, Moors TE, Navarro PP, Castano-Diez D, Schweighauser G, Graff-Meyer A, Goldie KN, Sutterlin R, Huisman E, Ingrassia A, Gier Y, Rozemuller AJM, Wang J, Paepe A, Erny J, Staempfli A, Hoernschemeyer J, Grosseruschkamp F, Niedieker D, El-Mashtoly SF, Quadri M, Van IWFJ, Bonifati V, Gerwert K, Bohrmann B, Frank S, Britschgi M, Stahlberg H, Van de Berg WDJ, Lauer ME (2019) Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci* 22:1099-1109
 339. Shannon KM, Keshavarzian A, Dodiya HB, Jakate S, Kordower JH (2012a) Is alpha-synuclein in the colon a biomarker for premotor Parkinson's Disease? Evidence from 3 cases. *Movement Disorders* 27:716-719
 340. Shannon KM, Keshavarzian A, Mutlu E, Dodiya HB, Daian D, Jaglin JA, Kordower JH (2012b) Alpha-synuclein in colonic submucosa in early untreated Parkinson's disease. *Mov Disord* 27:709-715
 341. Shin C, Park SH, Yun JY, Shin JH, Yang HK, Lee HJ, Kong SH, Suh YS, Shen G, Kim Y, Kim HJ, Jeon B (2017) Fundamental limit of alpha-synuclein pathology in gastrointestinal biopsy as a pathologic biomarker of Parkinson's disease: Comparison with surgical specimens. *Parkinsonism Relat Disord* 44:73-78
 342. Shin C, Park SH, Yun JY, Shin JH, Yang HK, Lee HJ, Kong SH, Suh YS, Kim HJ, Jeon B (2018) Alpha-synuclein staining in non-neural structures of the gastrointestinal tract is non-specific in Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord* 55:15-17
 343. Shin EC, Cho SE, Lee DK, Hur MW, Paik SR, Park JH, Kim J (2000) Expression patterns of alpha-synuclein in human hematopoietic cells and in *Drosophila* at different developmental stages. *Mol Cells* 10:65-70
 344. Sidgwick H (1874) *The Methods of Ethics*, Vol 4, Thoemmes Press).
 345. Simmons MA (1985) The complexity and diversity of synaptic transmission in the prevertebral sympathetic ganglia. *Prog Neurobiol* 24:43-93
 346. Singer MG (1986) Ethics and Common Sense. *Revue Internationale de Philosophie* 40:221
 347. Singleton AB, Hardy JA, Gasser T (2017) The Birth of the Modern Era of Parkinson's Disease Genetics. *J Parkinsons Dis* 7:S87-S93
 348. Sjövall H, Redfors S, Hallbäck DA, Eklund S, Jodal M, Lundgren O (1983) The effect of splanchnic nerve stimulation on blood flow distribution, villous tissue osmolality and fluid and electrolyte transport in the small intestine of the cat. *Acta Physiol Scand* 117:359-365
 349. Slote M (1985) *Common-sense morality and consequentialism*, Routledge & Kegan).
 350. Smith JF, Knowles TPJ, Dobson CM, Macphee CE, Welland ME (2006) Characterization of the nanoscale properties of individual amyloid fibrils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:15806-15811
 351. Sousa E, Olland S, Shih HH, Marquette K, Martone R, Lu Z, Paulsen J, Gill D, He T (2012) Primary sequence determination of a monoclonal antibody against α -synuclein using a novel mass spectrometry-based approach. *International Journal of Mass Spectrometry* 312:61-69
 352. Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388:839-840
 353. Spillantini MG, Goedert M (2000) The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with

- Lewy bodies, and multiple system atrophy. *Ann N Y Acad Sci* 920:16-27
354. Sprenger FS, Stefanova N, Gelpi E, Seppi K, Navarro-Otano J, Offner F, Vilas D, Valdeoriola F, Pont-Sunyer C, Aldecoa I, Gaig C, Gines A, Cuatrecasas M, Högl B, Frauscher B, Iranzo A, Wenning GK, Vogel W, Tolosa E, Poewe W (2015) Enteric nervous system α -synuclein immunoreactivity in idiopathic REM sleep behavior disorder. *Neurology* 85:1761-1768
 355. Stern G (1989) Did parkinsonism occur before 1817? *J Neurol Neurosurg Psychiatry Suppl*:11-12
 356. Sternini C, Anderson K (1992) Calcitonin gene-related peptide-containing neurons supplying the rat digestive system: differential distribution and expression pattern. *Somatosens Mot Res* 9:45-59
 357. Stöhr P (1930) Mikroskopische Studien zur Innervation des Magen-Darmkanales. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 12:66-154
 358. Stokholm MG, Danielsen EH, Hamilton-Dutoit SJ, Borghammer P (2016) Pathological alpha-synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. *Ann Neurol* 79:940-949
 359. Sulzer D, Edwards RH (2019) The physiological role of alpha-synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. *J Neurochem* 150:475-486
 360. Surmeier DJ, Obeso JA, Halliday GM (2017) Parkinson's Disease Is Not Simply a Prion Disorder. *J Neurosci* 37:9799-9807
 361. Svensson E, Horváth-Puhó E, Thomsen RW, Djurhuus JC, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen HT (2015) Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol* 78:522-529
 362. Tamguney G, Korczyn AD (2017) A critical review of the prion hypothesis of human synucleinopathies. *Cell Tissue Res*
 363. Tamo W, Imaizumi T, Tanji K, Yoshida H, Mori F, Yoshimoto M, Takahashi H, Fukuda I, Wakabayashi K, Satoh K (2002) Expression of alpha-synuclein, the precursor of non-amyloid beta component of Alzheimer's disease amyloid, in human cerebral blood vessels. *Neurosci Lett* 326:5-8
 364. Tan EK, Chao YX, West A, Chan LL, Poewe W, Jankovic J (2020) Parkinson disease and the immune system - associations, mechanisms and therapeutics. *Nat Rev Neurol*
 365. Tartaglia GG, Pechmann S, Dobson CM, Vendruscolo M (2007) Life on the edge: a link between gene expression levels and aggregation rates of human proteins. *Trends Biochem Sci* 32:204-206
 366. Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science* 296:1991-1995
 367. Thomzig A, Wagenführ K, Pinder P, Joncic M, Schulz-Schaeffer WJ, Beekes M (2021) Transmissible α -synuclein seeding activity in brain and stomach of patients with Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 141:861-879
 368. Toledo JB, Gopal P, Raible K, Irwin DJ, Brettschneider J, Sedor S, Waits K, Boluda S, Grossman M, Van Deerlin VM, Lee EB, Arnold SE, Duda JE, Hurtig H, Lee VM, Adler CH, Beach TG, Trojanowski JQ (2016) Pathological α -synuclein distribution in subjects with coincident Alzheimer's and Lewy body pathology. *Acta Neuropathol* 131:393-409
 369. Tolnay M, Paulus W (2012). Systematrophien. In *Pathologie* (Springer), pp. 223-249.
 370. Totterdell S, Hanger D, Meredith GE (2004) The ultrastructural distribution of alpha-synuclein-like protein in normal mouse brain. *Brain Res* 1004:61-72
 371. Trétiakoff C (1919) Contribution a l'Etude de L'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques déductions relatives à la pathogénie des troubles du tonus musculaire et De La Maladie de Parkinson, Université de Paris, Paris.
 372. Tsukita K, Sakamaki-Tsukita H, Tanaka K, Suenaga T, Takahashi R (2019) Value of in vivo alpha-synuclein deposits in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord*
 373. Tulisiak CT, Mercado G, Peelaerts W, Brundin L, Brundin P (2019) Can infections trigger alpha-synucleinopathies? *Prog Mol Biol Transl Sci* 168:299-322
 374. Tuttle MD, Comellas G, Nieuwkoop AJ, Covell DJ, Berthold DA, Kloepper KD, Courtney JM, Kim JK, Barclay AM, Kendall A, Wan W, Stubbs G, Schwieters CD, Lee VM, George JM, Rienstra CM (2016) Solid-state NMR structure of a pathogenic fibril of full-length human alpha-synuclein. *Nat Struct Mol Biol* 23:409-415
 375. Tysnes OB, Kenborg L, Herlofson K, Steding-Jessen M, Horn A, Olsen JH, Reichmann H (2015) Does vagotomy reduce the risk of Parkinson's disease? *Ann Neurol* 78:1011-1012
 376. Ubeda-Bañón I, Saiz-Sanchez D, Flores-Cuadrado A, Rioja-Corroto E, Gonzalez-Rodriguez M, Villar-Conde S, Astillero-Lopez V, Cabello-de la Rosa JP, Gallardo-Alcañiz MJ, Vaamonde-Gamo J, Relea-Calatayud F, Gonzalez-Lopez L, Mohedano-Moriano A, Rabano A, Martinez-Marcos A (2020) The human olfactory system in two proteinopathies: Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Transl*

- Neurodegener 9:22
377. Uchihara T (2017) An order in Lewy body disorders: Retrograde degeneration in hyperbranching axons as a fundamental structural template accounting for focal/multifocal Lewy body disease. *Neuropathology* 37:129-149
378. Uchikado H, Lin WL, DeLucia MW, Dickson DW (2006) Alzheimer disease with amygdala Lewy bodies: a distinct form of alpha-synucleinopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 65:685-697
379. Ueda K, Fukushima H, Masliah E, Xia Y, Iwai A, Yoshimoto M, Otero DA, Kondo J, Ihara Y, Saitoh T (1993) Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11282-11286
380. Ulmer TS, Bax A, Cole NB, Nussbaum RL (2005) Structure and dynamics of micelle-bound human alpha-synuclein. *J Biol Chem* 280:9595-9603
381. Ursin F, Timmermann C, Steger F (2021) Ethical Implications of Alzheimer's Disease Prediction in Asymptomatic Individuals through Artificial Intelligence. *Diagnostics (Basel)* 11
382. Uversky VN (2003) A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders. *J Biomol Struct Dyn* 21:211-234
383. Uversky VN (2007) Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation. *J Neurochem* 103:17-37
384. Van Den Berge N, Ferreira N, Gram H, Mikkelsen TW, Alstrup AKO, Casadei N, Tsung-Pin P, Riess O, Nyengaard JR, Tamgüney G, Jensen PH, Borghammer P (2019) Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. *Acta Neuropathol* 138:535-550
385. Vann Jones SA, O'Brien JT (2014) The prevalence and incidence of dementia with Lewy bodies: a systematic review of population and clinical studies. *Psychol Med* 44:673-683
386. Vanner S (1994) Corelease of neuropeptides from capsaicin-sensitive afferents dilates submucosal arterioles in guinea pig ileum. *Am J Physiol* 267:G650-655
387. Vilar M, Chou HT, Luhrs T, Maji SK, Riek-Loher D, Verel R, Manning G, Stahlberg H, Riek R (2008) The fold of alpha-synuclein fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:8637-8642
388. Vilchez D, Saez I, Dillin A (2014) The role of protein clearance mechanisms in organismal ageing and age-related diseases. *Nat Commun* 5:5659
389. Vingerhoets FJ, Snow BJ, Lee CS, Schulzer M, Mak E, Calne DB (1994) Longitudinal fluorodopa positron emission tomographic studies of the evolution of idiopathic parkinsonism. *Ann Neurol* 36:759-764
390. Visanji NP, Marras C, Hazrati LN, Liu LW, Lang AE (2014) Alimentary, my dear Watson? The challenges of enteric α -synuclein as a Parkinson's disease biomarker. *Mov Disord* 29:444-450
391. Visanji NP, Marras C, Kern DS, Al Dakheel A, Gao A, Liu LW, Lang AE, Hazrati LN (2015) Colonic mucosal α -synuclein lacks specificity as a biomarker for Parkinson disease. *Neurology* 84:609-616
392. Wakabayashi K, Takahashi H, Takeda S, Ohama E, Ikuta F (1988) Parkinson's disease: the presence of Lewy bodies in Auerbach's and Meissner's plexuses. *Acta Neuropathol* 76:217-221
393. Wakabayashi K, Takahashi H, Ohama E, Ikuta F (1990) Parkinson's disease: an immunohistochemical study of Lewy body-containing neurons in the enteric nervous system. *Acta Neuropathol* 79:581-583
394. Wakabayashi K, Takahashi H (1997) The intermediolateral nucleus and Clarke's column in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 94:287-289
395. Wakabayashi K, Tanji K, Odagiri S, Miki Y, Mori F, Takahashi H (2013) The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol* 47:495-508
396. Wang SJ, Fuh JL, Shan DE, Liao KK, Lin KP, Tsai CP, Wu ZA (1993) Sympathetic skin response and R-R interval variation in Parkinson's disease. *Mov Disord* 8:151-157
397. Watts JC (2019) Calling alpha-synuclein a prion is scientifically justifiable. *Acta Neuropathol* 138:505-508
398. Weiner WJ (2008) There is no Parkinson disease. *Arch Neurol* 65:705-708
399. Wiggins S, Whyte P, Huggins M, Adam S, Theilmann J, Bloch M, Sheps SB, Schechter MT, Hayden MR (1992) The Psychological Consequences of Predictive Testing for Huntington's Disease. *New England Journal of Medicine* 327:1401-1405
400. Williams RM, Berthoud HR, Stead RH (1997) Vagal afferent nerve fibres contact mast cells in rat small intestinal mucosa. *Neuroimmunomodulation* 4:266-270
401. Winter Y, Balzer-Geldsetzer M, Spottke A, Reese JP, Baum E, Klotsche J, Rieke J, Simonow A, Eggert K, Oertel WH, Dodel R (2010) Longitudinal study of the socioeconomic burden of Parkinson's disease in Germany. *Eur J Neurol* 17:1156-1163

402. Wohlwill F (1928) Zur pathologischen Anatomie des peripherischen Sympathicus. Deutsche Zeitschrift für Nervenheilkunde 107:124-150
403. Won JH, Byun SJ, Oh B-M, Park SJ, Seo HG (2021) Risk and mortality of aspiration pneumonia in Parkinson's disease: a nationwide database study. Scientific Reports 11:6597
404. Wong YC, Luk K, Purtell K, Burke Nanni S, Stoessl AJ, Trudeau LE, Yue Z, Krainc D, Oertel W, Obeso JA, Volpicelli-Daley LA (2019) Neuronal vulnerability in Parkinson disease: Should the focus be on axons and synaptic terminals? Mov Disord
405. Yoshimura N, Shoji M, Matsui T (1982) [An autopsy case of Parkinson's disease manifesting hyperphagia and dysphagia followed by severe achalasia (disorder of motility) of the esophagus]. No To Shinkei 34:741-746
406. Yu S, Li X, Liu G, Han J, Zhang C, Li Y, Xu S, Liu C, Gao Y, Yang H, Ueda K, Chan P (2007) Extensive nuclear localization of alpha-synuclein in normal rat brain neurons revealed by a novel monoclonal antibody. Neuroscience 145:539-555
407. Zaccai J, Brayne C, McKeith I, Matthews F, Ince PG, Mrc Cognitive Function ANS (2008) Patterns and stages of alpha-synucleinopathy: Relevance in a population-based cohort. Neurology 70:1042-1048
408. Zhong S, Luo X, Chen XS, Cai QY, Liu J, Chen XH, Yao ZX (2010) Expression and subcellular location of alpha-synuclein during mouse-embryonic development. Cell Mol Neurobiol 30:469-482
409. Zhou J, Broe M, Huang Y, Anderson JP, Gai WP, Milward EA, Porritt M, Howells D, Hughes AJ, Wang X, Halliday GM (2011) Changes in the solubility and phosphorylation of alpha-synuclein over the course of Parkinson's disease. Acta Neuropathol 121:695-704
410. Zhou W, Long C, Reaney SH, Di Monte DA, Fink AL, Uversky VN (2010) Methionine oxidation stabilizes non-toxic oligomers of alpha-synuclein through strengthening the auto-inhibitory intramolecular long-range interactions. Biochim Biophys Acta 1802:322-330
411. Zirra A, Rao SC, Bestwick J, Rajalingam R, Marras C, Blauwendraat C, Mata IF, Noyce AJ (2023) Gender Differences in the Prevalence of Parkinson's Disease. Movement Disorders Clinical Practice 10:86-93
412. Zschocke S, Hansen H-C (2012) Artefakte im EEG. Klinische Elektroenzephalographie:489-514

12 Publikationen

Der Autor verfügt bislang über zwei Erstautorschaften sowie eine Koautorschaft in einer peer-revieweten Fachzeitschrift. Die vorliegende Arbeit soll ferner in zwei Publikationen in einschlägigen klinisch bzw. pathologisch ausgerichteten Zeitschrift publiziert werden, eine davon mit Zieljournal Movement Disorders ist im fortgeschrittenen Schreibprozess. Beide Publikationen werden den Doktoranden als Erstautor benennen. Auszüge aus der Bestimmung der Braak-Stadien fließen in eine weitere Publikation der gleichen Arbeitsgruppe mit dem Doktoranden als Koautor ein. Eine medizinethische Masterarbeit zur Parkinson-Frühdagnostik ist eingereicht, daraus folgende Publikationen sind in Planung. Weitere Details – u. a. über Kongressteilnahmen, Publikationen, Vorträge und Poster – sind dem Werdegang des Doktoranden zu entnehmen.

13 Dank

Mein Dank gilt zuvorderst Herrn Prof. Dr. Schulz-Schaeffer für die konstant außergewöhnliche ideelle und materielle Unterstützung nicht nur in Form der Bereitstellung der Versuchsmaterialien und Finanzierung. Gerade seine Diskussionsfreudigkeit, sein lebendiges Interesse an der Lehre und am Umgang mit den Doktoranden sowie durch und durch wissenschaftlich geleitetes Denken haben zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Auch möchte ich dem Team der Neuropathologie UKS, Homburg Saar danken. Insbesondere Frau Dr. Wiebke Wemheuer und Frau Tatjana Pfander haben mich durch Ratschläge und erfahrene Hilfestellung im Labor unterstützt. Ich bin froh, dass ich mich mit Herrn Mykola Gorbachuk über unsere gemeinsame Forschung am Morbus Parkinson austauschen konnte. Ich hoffe, dass unser Kontakt für ihn ebenso fruchtbar war wie für mich. Das angenehme und familiäre Arbeitsklima und der Vertrauensvorschuss, den ich von Anfang an im Institut für Neuropathologie erfahren habe, haben mir die Arbeit entscheidend erleichtert.

Bei Herrn Jakob Schöpe und Frau Gudrun Wagenpfeil vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) bedanke ich mich herzlich für die kompetente Statistikberatung, die ich jederzeit weiterempfehlen werde. Herr Schöpe hat durch initiale Beratung den Startschuss für meine Auswertung gesetzt, während Frau Wagenpfeil mich im weiteren Verlauf hervorragend beraten und in der Durchführung komplexer statistischer Verfahren kompetent unterstützt hat.

14 Finanzierung/Interessenskonflikte

Die Arbeit wurde finanziert durch die Mittel des Instituts für Neuropathologie, Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg (Saar). Der Autor gibt an, über keine Interessenskonflikte in Zusammenhang mit dieser Arbeit zu verfügen.