Aus der
Neurologischen Klinik der Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm
und der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. Albert C. Ludolph

Synuklein im Zahnstein:
Ein biologischer Marker für den Morbus Parkinson?

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Sabrina Franziska Schmid
aus Biberach a.d.Riß
2016

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Albert Ludolph

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Bernd Lapatki

Tag der Promotion: 19.10.2017

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III

1 Einleitung 1
1.1 Der Morbus Parkinson: Grundlagen des Krankheitsbildes 1
1.2 Pathogenese und Risikofaktoren 2
1.2.1 Alpha-Synuklein 4
1.2.2 Die Bedeutung des alpha-Synukleins beim Morbus Parkinson 4
1.2.3 Vulnerable Zelltypen 5
1.2.4 Diagnosestellung 5
1.2.5 Aktueller Stand der Wissenschaft 6
1.3 Ziele der Studie: Synuklein im Zahnstein - ein Biomarker? 11
2 Probanden und Methoden 12
2.1 Studiendesign 12
2.2 Ethikantrag 12
2.3 Probanden 12
2.3.1 Probandenkollektiv 12
2.3.2 Probandenrekrutierung 12
2.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien 13
2.4 Instrumente und Geräte 14
2.5 Einverständniserklärung 14
2.6 Studienablauf 14
2.7 Materialien und Methoden zur Auswertung 15
2.7.1 Materialien zur Auswertung 15
2.7.2 Methoden zur Auswertung 15
2.7.3 Vorbereitung vor Entnahme des Zahnsteins 16
2.7.4 Vorbereitung zur Messung 16
2.7.5 Messung der Gesamtproteinmenge 17
2.7.6 Messung des alpha-Synukleins 19
2.7.7 Messung des Hämoglobins 22
2.7.8 Statistik 23

3 Ergebnisse 25
3.1 Alpha-Synuklein Messung 25
3.2 Hämoglobin Messung 27
3.3 Riechtest 29
3.4 Relevante Ergebnisse Fragebogen 32
4 Diskussion 41
4.1 Alpha-Synuklein im Zahnstein 41
4.2 Riechtest 48
4.3 Fragebogen 49
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick 56
5 Zusammenfassung 57
6 Literaturverzeichnis 59
Anhang 74
Danksagung 82
Lebenslauf 83

Abkürzungsverzeichnis

α-SYN	alpha-Synuklein
bzw.	beziehungsweise
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ENS	Enterisches Nervensystem
GI-Trakt	Gastrointestinaler Trakt
Hb	Hämoglobin
Kon	Kontrollen
Konz.	Konzentration
LB	Lewy-Bodies
LN	Lewy-Neuriten
LP	Lewy-Pathologie
M. Parkinson	Morbus Parkinson
o-α-SYN	oligomeres alpha-Synuklein
PD	Parkinson´s Disease
PNS	Peripheres Nervensystem
PPMI	Parkinson's Progression Marker Initiative
r_s	Spearmans Rangkorrelationskoeffizient
RIPA-Buffer	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RKU	Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm
SA-HRP	Streptavidin-konjugierte Horseradish-Peroxidase
TMB	Tetramethylbenzidin
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die früher als *Paralysis agitans* bezeichnete „Schüttellähmung/Zitterlähmung“, heute als Morbus Parkinson (M. Parkinson) bekannt, ist eine der häufigsten und bekanntesten degenerativen Erkrankungen des menschlichen Nervensystems. Weltweit sind Menschen von dieser neurodegenerativen, unaufhaltsam fortschreitenden, Krankheit betroffen. Mit steigendem Alter nimmt die Zahl der Neuerkrankungen sehr stark zu (Pringsheim et al., 2014; Svensson et al., 2015).
Laut Zahlen der Deutschen Parkinson Gesellschaft sind in Deutschland 250 000 bis 280 000 Menschen von der idiopathischen Form des M. Parkinson betroffen. Weltweit sind es rund 4,1 Millionen Betroffene (Webseite der Deutschen Parkinson Gesellschaft e.V.). Im Jahr 2030 rechnet man aufgrund des demographischen Wandels weltweit mit 8,7 Millionen Erkrankten - also mit mehr als einer Verdopplung der Krankheitsfälle (Svensson et al., 2015).

1.1 Der Morbus Parkinson: Grundlagen des Krankheitsbildes

James Parkinson, ein britischer Arzt, berichtete bereits im Jahre 1817 in seinem *Essay on the shaking palsy* über Patienten, die an unkontrolliert zitternden Bewegungen der Gliedmaßen litten. Auch beobachtete er, dass es sich bei dieser Krankheit um einen fortschreitenden Prozess handelt, welcher nicht unterbrochen oder gar aufgehalten werden kann (Parkinson, 2002).
Heute gelten vier Symptome als Kardinalsymptome des M. Parkinson: Bradykinese/Akinesie (verlangsamte/fehlende Bewegungen), Rigor (Muskelstarre), Tremor (Muskelzittern) und posturale Instabilität (Gang- und Gleichgewichtsstörungen).
Der idiopathische M. Parkinson kann grob in drei Typen unterteilt werden - abhängig von der vorherrschenden Symptomatik: Beim akinetisch-rigiden Typ ist das Symptom der eingeschränkten Beweglichkeit stark ausgeprägt, beim tremordominanten Typ ist vor allem Zittern das Leitsymptom und beim Äquivalenztyp treten Bewegungsstörungen und Zittern gleichermaßen auf (Schiess et al., 2000).
Jedoch gilt der M. Parkinson mittlerweile nicht mehr als eine Erkrankung, welche sich alleinig auf das motorische System beschränkt; vielmehr gilt der M. Parkinson heute als eine Multisystemerkrankung (Sveinbjornsdottir, 2016). Neben

Bewegungsstörungen treten multiple psychische, sensorische und vegetative Symptome auf. Das Auftreten von kognitiven oder metabolischen Störungen ist keine Seltenheit (Müller et al., 2006). Oft leiden die Patienten an Depressionen (Okun und Watts, 2002), Schlafstörungen oder an einem eingeschränkten Geruchssinn (Munhoz et al., 2015; Schrag et al., 2015).
Auch tritt in späteren Stadien des M. Parkinson häufig eine Demenz hinzu (Bertrand et al., 2015).
Es wird vermutet, dass bereits Jahre vor der Diagnosestellung die ersten nicht-motorischen Symptome auftreten; Schätzungen des Auftretens prämotorischer Symptome belaufen sich auf 10 bis 20 Jahre vor dem Auftreten erster motorischer Beeinträchtigungen (Svensson et al., 2015). Diese nicht-motorischen Symptome können sich beispielsweise in einer ausgeprägten Riechstörung, Schlafstörungen, Depressionen oder auch einer Obstipation äußern (Becker et al., 2002).

1.2 Pathogenese und Risikofaktoren

Pathogenese

Die motorischen Symptome des M. Parkinson werden durch eine Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra verursacht. Durch den dadurch entstehenden Mangel an Dopamin wird die aktivierende Wirkung der Basalganglien auf die Großhirnrinde vermindert.
Aus neuropathologischer Sicht ist die intrazerebrale Entwicklung durch typische proteinreiche Einschlusskörper, die Lewy-Bodies (LB) und Lewy-Neuriten (LN), charakterisiert (Spillantini et al., 1998). Diese Lewy-Pathologie (LP) beginnt an definierten anatomischen Orten und schreitet systematisch in einer topographisch voraussagbaren Reihenfolge voran. Die intraneuronalen Einschlusskörper enthalten überwiegend Ansammlungen eines missgefalteten Proteins: alpha-Synuklein (α-SYN) (von Bohlen und Halbach, 2004).
Das missgefaltete, aggregierte α-SYN liegt in den LB als fibrilläres, unlösliches Protein vor, wobei pathologisch missgefaltete, lösliche Oligomere die Vorstufe dieser Fibrillen darstellen (Hoyer et al., 2002; Coughey und Lansburry, 2003).
Ein weiteres Merkmal der Multisystemerkrankung M. Parkinson ist, dass nicht alle Nervenzelltypen und Regionen des menschlichen Nervensystems betroffen sind.
Bei fortschreitender Krankheit werden Komponenten des autonomen, limbischen und somatomotorischen Systems besonders in ihren Funktionen eingeschränkt

(Braak et al. 2004).

Man kann den Krankheitsverlauf in sechs Stadien (nach Braak) unterteilen, von denen jede durch die fortschreitende Entwicklung der typischen Einschlusskörper und intraneuronalen Läsionen charakterisiert ist - wobei der Krankheitsverlauf und das Durchlaufen der Stadien viele Jahre dauert. Die sechs Stadien nach Braak lassen sich hinsichtlich motorischer Beeinträchtigungen in zwei asymptomatische und vier symptomatische Stadien unterteilen.

Während den asymptomatischen Stadien eins und zwei sind die pathologischen Einschlusskörper auf den Gastrointestinalen Trakt (GI-Trakt), den dorsalen Vaguskern in der Medulla oblongata, das Tegmentum Pontis und den vorderen olfaktorischen Kern, den Riechkolben, beschränkt.

In den Stadien drei und vier sind die Substantia nigra und andere Kerngebiete des Mittelhirns und Vorderhirns betroffen - zunächst mit leichten, später mit schweren pathologischen Veränderungen. An diesem Punkt der Erkrankung treten bei den meisten Erkrankten erste motorische Symptome auf: die motorische Trias von Rigor, Tremor und Akinesie.

In den Endstadien fünf und sechs erreicht der Prozess den Neocortex - und die Krankheit offenbart sich in ihrem gesamten klinischen Ausmaß; es tritt meist eine fortschreitende Demenz hinzu (Braak et al., 2004).

Vor allem die Arbeit von Braak hat gezeigt, dass die Pathologie des M. Parkinson, entgegen früherer Ansichten, nicht alleinig auf die Substantia nigra begrenzt ist (Braak et al., 2004).

Es ist mittlerweile bekannt, dass sich die LP bereits in frühen Stadien außerhalb des Nervensystems entwickelt. Angefangen bei der parasympathischen Innervation der Speicheldrüsen (Del Tredici et al., 2010) ist das gesamte parasympathische Nervengeflecht des GI-Traktes betroffen: Es sind Ansammlungen von missgefaltetem, fibrillären α-SYN im Ösophagus, Pankreas, Magen, Dünndarm, Colon und Rektum zu finden (Beach et al., 2010; Cersosimo, 2015). Im Magen sind die LB im Meißner- und Auerbachschen Plexus vorzufinden (Braak et al., 2006).

Es ist zu erwähnen, dass die Konzentration (Konz.) von kranial nach kaudal, also vom Ösophagus zum Rektum, abnimmt. (Beach et al., 2010; Cersosimo, 2015).

Risikofaktoren

Das Alter gilt als Hauptrisikofaktor des M. Parkinson (Pringsheim et al., 2014; Svensson et al., 2015).

Möglicherweise spielen auch Umweltfaktoren und der damit verbundene oxidative Stress eine wichtige Rolle bei der Entstehung des idiopathischen M. Parkinson. So gelten Rauchen und Koffein als mögliche Faktoren, welche der Entwicklung eines M. Parkinson entgegenwirken. Demgegenüber stehen Pestizide und Infektionen, welche in manchen Studien für die Entwicklung eines M. Parkinson mit-verantwortlich gemacht werden. Allerdings ist dies noch nicht sicher belegt (Logroscino, 2005; Chade et al., 2006).

Als weiterer Risikofaktor gilt die genetische Veranlagung. 15% der Krankheitsfälle rechnet man familiären Formen zu (McDonnell et al., 2006). Ihnen liegen Mutationen verschiedener Gene zugrunde – 18 krankheitsverursachende Gene, welche mit dem M. Parkinson in Verbindung stehen, wurden bereits identifiziert. Diese werden als PARK Gene bezeichnet (Fujioka et al., 2014).

1.2.1 Alpha-Synuklein

Synukleine sind kleine, lösliche Proteine, welche vor allem im neuronalen Gewebe vorzufinden sind (Hasegawa et al., 2016). Die Familie der Synukleine umfasst drei bekannte Proteine: α-, β- und γ-Synuklein. Alle drei weisen ein alpha-helikales Lipid-Bindungsmotiv auf (Clayton und George, 1998). α- und β-Synuklein ist überwiegend im Gehirngewebe vorzufinden – hier befindet es sich überwiegend an präsynaptischen Nervenendigungen. γ-Synuklein hingegen ist vorzugsweise im peripheren Nervensystem (PNS) vorhanden (George, 2002). Momentan ist noch keine eindeutige physiologische Funktion der Synuklein-Proteine bekannt. Jedoch deuten einige Untersuchungen darauf hin, dass sie eine Rolle bei der Regulation der Membranstabilität spielen. Mutationen des α-SYN werden ursächlich mit dem M. Parkinson in Verbindung gebracht (Lavedan, 1998; George, 2002).

1.2.2 Die Bedeutung des alpha-Synukleins beim Morbus Parkinson

Alle betroffenen Neurone entwickeln beim M. Parkinson im Laufe der Erkrankung LN oder LB. Diese Einschlusskörper werden als Marker des Erkrankungsprozesses, insbesondere aber für die frühen präsymptomatischen Phasen des M. Parkinson, angesehen. Sie enthalten überwiegend Ansammlungen

des pathologisch aggregierten α-SYN, welches sich sowohl im Axon (Freundt et al., 2012) als auch an dessen Endknöpfchen (Spinelli et al., 2014) befindet.
α-SYN ist physiologisch ein ungefaltetes Monomer und ein Protein der Präsynapse. Es existiert in vielen, jedoch nicht allen, Nervenzellen des menschlichen Nervensystems. Eine Missfaltung in eine ß-Faltblattstruktur und die Aggregation des α-SYN scheint eine conditio sine qua non für die Funktionseinschränkung und schließlich den Untergang gefährdeter Neurone zu sein (Braak et al., 2004).

1.2.3 Vulnerable Zelltypen

Nur einige definierte Nervenzelltypen des menschlichen Nervensystems neigen dazu, diese unphysiologischen Proteinansammlungen zu bilden. Die anfälligen Nervenzelltypen scheinen zwei Eigenschaften zu haben:
Einmal sind sie alle Projektionsneurone mit Axonen, welche in Relation zu ihrer Somatagröße unverhältnismäßig lange und dünn sind.
Des Weiteren sind ihre langen Axone nur schwach myelinisiert bzw. un-myelinisiert.
Demgegenüber stehen Interneurone und Projektionsneurone mit kurzem bzw. auch langem Axon - jedoch dicker Myelinscheide. Diese sind während des gesamten Krankheitsverlaufs resistent gegenüber der Bildung von LB und LN (Braak et al., 2004).

1.2.4 Diagnosestellung

Die Diagnosestellung des M. Parkinson ist in frühen Stadien der Erkrankung nicht selten schwierig. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass sich die Symptome des M. Parkinson mit denen anderer Krankheiten überlappen. So weisen zum Beispiel der essentielle Tremor, die Multisystematrophie und die progressive supranukleäre Blickparese ähnliche Krankheitssymptome auf (Galvin et al., 2001; Burn und Less, 2002).
Meist geht der M. Parkinson mit einer ausgeprägten Riechstörungen einher, welche sich bereits Jahrzehnte vor den ersten motorischen Symptomen bemerkbar macht (Becker et al., 2002; Svensson et al., 2015).
Die Ätiologie dieser typischen Riechstörung lässt sich wie folgt erklären: Der Bulbus olfactorius ist paarig vorhanden, liegt oberhalb der Lamina cribrosa und

unterhalb des Lobus frontalis. Er ist eine kortikale Struktur und hat somit einen charakteristischen Schichtaufbau. Die Hauptzellen für die Reizweiterleitung vom Bulbus zum Kortex sind die Mitral- und Büschelzellen. Sie bilden miteinander synaptische Kontakte mit stark konvergenter Verschaltung (Rohen, 2001).
LN und LB entwickeln sich in den zellulären Inseln des vorderen olfaktorischen Kerns und verteilen sich innerhalb der gesamten Riechbahn (Pearce et al, 1995). Im Anschluss formen LN ein dichtes Netzwerk. Die Anzahl an Büschel- und Mitralzellen des Riechkolbens nimmt aufgrund des Verlustes an Neuronen ab. Daraus resultiert eine Hyposmie oder Anosmie (Braak und Del Tredici, 2009).
Im Gegensatz zu gesunden Probanden wurde gezeigt, dass es beim M. Parkinson keine Korrelation zwischen dem Volumen des Riechkolbens und der Riechfunktion gibt. Sie weisen im Allgemeinen auch keinen verkleinerten Bulbus olfactorius auf. Bei Kontrollprobanden ist das Volumen des Riechkolbens jedoch entscheidend für die Qualität des Riechvermögens (Paschen et al., 2015).
Somit stellen klinische Riechtests eine geeignete Methode zur Diagnosesicherung dar.
Die Entdeckung eines konstanten und zuverlässigen Biomarkers, der auch im Braakstadium I und II zuverlässig bestimmt werden kann, würde möglicherweise präventive Maßnahmen ermöglichen, um den Krankheitsverlauf des M. Parkinson zu verlangsamen oder aufzuhalten.
Die Entdeckung eines solchen Biomarkers wäre ein Meilenstein in der neurologischen Forschung.

1.2.5 Aktueller Stand der Wissenschaft

Da die Diagnose des M. Parkinson vor allem auf klinischen Kriterien basiert ist es fast unmöglich, eine frühe Diagnose sowie Differentialdiagnose gegenüber anderen Krankheiten mit Parkinsonismus zu formulieren. Es wird derzeit nach einem zuverlässigen und aussagekräftigen Biomarker für die frühe Diagnose und Prognose des M. Parkinson gesucht.

<u>Cerebrospinalflüssigkeit</u>

Allgemein

Die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) steht in engem Kontakt mit dem extrazellulären Raum des Gehirns. Deshalb wird angenommen, dass in der CSF viele der

biochemischen Prozesse, welche im Gehirn ablaufen, festgestellt werden können (Eusebi et al, 2016).

Die Untersuchung der CSF wurde als Medium für die Prädiagnostik des M. Parkinson in Betracht gezogen.

Hier wurden als mögliche Biomarker die folgenden α-SYN Subformen untersucht: ungefaltetes α-SYN (α-SYN), oligomeres α-SYN (o-α-SYN) und phosphoryliertes α-SYN (p-α-SYN) (Parnetti et al., 2016).

Bei der CSF-Untersuchung ist allgemein auf die Vermeidung von Kontamination mit Blut zu achten. Durch die daraus resultierende Hämolyse wird die Genauigkeit der α-SYN-Konzentration beeinflusst (Wang et al., 2015).

Es gab bereits einige Studien, welche die Rolle der CSF für die Diagnostik des M. Parkinson bewertet haben.

Die unterschiedlichen Studien

Die Parkinson's Progression Markers Initiative (PPMI)-Studie ist die momentan größte laufende Studie welche sich zum Ziel gesetzt hat, mögliche Biomarker des M. Parkinson zu identifizieren und zu beurteilen. Unter anderem wurden Untersuchungen der CSF durchgeführt.

Die diagnostische Wertigkeit der CSF, einschließlich der des α-SYN als Biomarker, wurde in der PPMI-Studie als nicht zufriedenstellend deklariert (Kang, 2016).

Es wurde gezeigt, dass das α-SYN in der CSF bei Erkrankten deutlich niedriger war als bei der Kontrollgruppe (Kang et al., 2016a) – möglicherweise aufgrund dessen pathologischer Aggregation in Form von LB im Gehirn (Parnetti et al., 2016). Allerdings war die diagnostische Wertigkeit, durch Ausreißer der α-SYN-Konzentrationen innerhalb beider Gruppen, beschränkt. Durch die daraus resultierenden großen Überlappungen der Breite der Messwerte zwischen den beiden Kohorten konnte kein eindeutiger diagnostischer Grenzwert definiert werden (Kang et al., 2016a). Demgegenüber stehen jedoch auch Studien, welche vergleichbare Werte von α-SYN bei Parkinsonerkrankten und Kontrollen festgestellt haben (Borghi et al., 2000).

Aus diesem Grund wurden andere α-SYN Subformen untersucht, um einen präziseren und aussagekräftigeren Biomarker für den M. Parkinson zu finden:

O-α-SYN stellt vermutlich die neurotoxische Variante des α-SYN dar. Die Studienlage zeigt jedoch auch hier keine eindeutigen Ergebnisse an: Das o-α-SYN ist in manchen Studien bei Parkinsonerkrankten höher als bei den Kontrollen (Tokuda et al., 2010; Park et al., 2011; Parnetti et al., 2014a), andere Studien weisen keine Unterschiede zwischen den beiden Kohorten auf (Parnetti et al., 2014b; Compta et al., 2015).
Auch wurde p-α-SYN untersucht: Dieses war bei Erkrankten höher als bei Kontrollen (Wang et al., 2012). Jedoch ist hier zu erwähnen, dass momentan nur eine Studie zur Untersuchung von p-α-SYN vorliegt.
Somit scheint man mit den aktuellen Möglichkeiten in der CSF nicht das erhoffte, zuverlässige und aussagekräftige prädiagnostische Medium für die Früherkennung des M. Parkinson gefunden zu haben.

Blut

Das α-SYN im Blut befindet sich zu >95% in den roten Blutkörperchen, zu 1-4% in den Thrombozyten und zu ≤1% in den Leukozyten und im Plasma. Interindividuelle Variationen in der Hämolyse führen somit unweigerlich zu einer Auswirkung auf die Konzentration von α-SYN im Plasma bzw. Serum und damit zu unterschiedlichen Ergebnissen.
Auch bei Mitbetrachtung und Miteinbezug der jeweiligen Hämolyse der Patienten lieferten die Untersuchungen zwar einen Trend, dass die α-SYN-Konzentration im Blut bei Parkinsonpatienten etwas niedriger ist. Jedoch ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Kohorten (Shi et al., 2010).

Speicheldrüsen

In einer Studie wurden Biopsien von Speicheldrüsen bei Parkinsonpatienten im Frühstadium der Erkrankung entnommen um in den parasympathischen Nerven in vivo aggregiertes α-SYN nachzuweisen. In dieser Studie wurde bei über 70 % der Patienten aggregiertes α-SYN in den parasympathischen Nerven der Glandula submandibularis nachgewiesen (Adler et al., 2016).
In anderen Studien wurden sogar bei 100% der Erkrankten erhöhte Werte in der Glandula submandibularis nachgewiesen (Del Tredici et al., 2010; Beach et al., 2013).

Die Ergebnisse bei Biopsien der kleinen Speicheldrüsen wiederum ergaben keine aussagekräftigen Ergebnisse hinsichtlich der Konzentration an aggregiertem α-SYN. So wurde in einer Studie nur bei 3 von 16 Parkinsonerkrankten aggregiertes α-SYN in den kleinen Speicheldrüsen gemessen (Folgoas et al., 2013). In einer anderen Studie konnte es bei 9 von 13 Patienten nachgewiesen werden (Gao et al., 2015).
Somit ist eher die Biopsie der Glandula submandibularis eine gute Methode für die Frühdiagnostik des M. Parkinson zu sein.
Jedoch ist es kaum umsetzbar, ein großflächiges bioptisches Screening der Speicheldrüsen unter der Bevölkerung durchzuführen, da dies mit einem viel zu großen Aufwand und vermutlich auch starker Ablehnung verbunden wäre. Auch weisen viele Probanden ein mangelhaftes oder unzureichendes Drüsengewebe auf. Außerdem ist momentan die Spezifität und Sensitivität der Messverfahren noch unzureichend (Adler et al., 2016).

Speichel

Speichel ist ein Gemisch der Sekrete der Speicheldrüsen. Es werden täglich ca. 0,7 l sezerniert, davon sind 99 Vol.-% Wasser. Er enthält eine Vielzahl an Proteinen, Aminosäuren und Vitaminen - jedoch nur in Spuren (Hellwig et al., 2013).
Die großen Speicheldrüsen - die Glandula parotidea, submandibularis und sublingualis, produzieren über 90% des Speichelvolumens (Holmberg und Hoffmann, 2014).
Die Speichelfließrate ist allerdings interindividuell sehr unterschiedlich. Sie wird generell vom zirkadianen Rhythmus, aber auch von emotionalen, psychischen und Umwelt-Faktoren, sowie von Medikamenten, beeinflusst (Hellwig et al., 2013).
Es wurde bereits, wie oben erwähnt, nachgewiesen, dass in der Glandula submandibularis aggregiertes α-SYN nachweisbar ist (Del Tredici et al., 2010). Da der Speichel in der Regel nicht mit Blut kontaminiert ist, scheint dieser auf den ersten Blick ein gutes Medium für den Nachweis von Biomarkern im Rahmen der Prädiagnosik des M. Parkinson darzustellen.
Es liegen bereits Studien vor, in denen Speichelproben entnommen wurden, anhand derer man das Vorhandensein von α-SYN zeigen konnte. Einige Studien zeigten auf, dass die Mengen an α-SYN im Speichel bei Probanden mit

M. Parkinson geringer ist als bei den Kontrollen (Devic et al., 2011; Al-Nimer et al., 2014). Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass es keinen Unterschied der α-SYN-Konzentration zwischen Erkrankten und Kontrollen gibt - wobei die Konzentration an α-SYN bei Parkinsonerkrankten im Alter abnimmt (Kang et al., 2016b).
Somit ist auch hier die Studienlage nicht eindeutig. Da die Speichelfließrate interindividuell sehr variabel ist, wird möglicherweise dadurch indirekt die Konzentration an α-SYN im Speichel beeinflusst.
Somit scheint auch Speichel ein recht instabiles und unstabiles Medium für den Nachweis von α-SYN darzustellen.

Zusammenfassung des aktuellen Standes der Wissenschaft

Die Biopsie der Glandula submandibularis mit anschließender Untersuchung auf aggregiertes α-SYN stellt mit einer Sensitivität und Spezifität von 100% das momentan zuverlässigste Medium dar, um α-SYN-Aggregate bei Parkinsonerkrankten nachzuweisen.
Die Untersuchung von α-SYN in der CSF weist eine Sensitivität von 71-94% und eine Spezifität von 25-53% auf. Im Plasma kann α-SYN mit einer Sensitivität von 48-53% und einer Spezifität von 69-85% nachgewiesen werden. Nach aktuellem Stand der Literatur sind somit weder die Untersuchung von CSF noch von Plasma eine geeignete und zuverlässige Methode, um α-SYN bei Parkinsonerkrankten nachzuweisen (Malek et al., 2014).

Alle momentan zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung des M. Parkinson haben nur einen eingeschränkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass erste Symptome erst bei Verlust von 60-80% des nigralen Dopamins auftreten (Miller und O'Challaghan, 2015). Die fehlenden motorischen Symptome in den frühen Krankheitsstadien sind auf „neuronale Reserven" oder aktive Kompensations-mechanismen zurückzuführen - beispielsweise durch das axonale Sprießen von überlebenden dopaminergen Neuronen (Arkadir et al., 2014).
Leider treten die Kardinalsymptome und typischen motorischen Symptome, welche zur klinischen Diagnostik des M. Parkinson momentan notwendig sind, oft auch bei anderen Krankheiten ohne neurodegenerative Komponente auf.

In frühen Krankheitsstadien kann die Häufigkeit von Fehldiagnosen durch Ärzte mit weniger klinischer Erfahrung mehr als 25% betragen (Miller und O'Challaghan, 2015).
Aus diesem Grund ist es enorm wichtig, einen Biomarker für die Frühdiagnostik zu finden, um frühzeitig in den Krankheitsverlauf einzuschreiten und diesen zu verlangsamen bzw. ganz aufzuhalten.

1.3 Ziele der Studie: Synuklein im Zahnstein - ein Biomarker?

Zahnstein, welcher durch die Mineralisation der Plaque durch Speichelbestandteile entsteht (Hellwig et al., 2013), lässt sich vom Zahnarzt mit geeigneten Instrumenten leicht entfernen und wäre somit für ein großflächiges Screening sehr gut geeignet. Auch enthält er vermutlich Proteine und somit potentiell das α-SYN in konzentrierterer Form, als es im Speichel vorhanden ist.
Erst wenn ungefähr 60% der nigrostrialen Neurone der Substantia nigra degeneriert sind ist es Neurologen möglich, mit der heutigen möglichen klinischen Diagnostik, eine eindeutige Diagnose zu stellen. Deswegen wäre es sehr interessant für den klinisch tätigen Arzt Wege zu entwickeln um die Erkrankung in früheren Stadien zu erkennen und somit die Voraussetzung für präventive Maßnahmen zu legen (Becker et al., 2002).
Aus diesem Grund möchte ich in der folgenden Studie untersuchen, ob man durch die Untersuchung des Zahnsteins ein aussagekräftiges, stabiles Medium für den Nachweis von α-SYN findet, um frühzeitig Anzeichen für die Entwicklung eines M. Parkinson zu erkennen. Auch wurde bei allen Patienten ein Riechtest durchgeführt um bei einem positiven Ergebnis beide, potenziellen frühen Marker für den M. Parkinson, miteinander zu vergleichen.

2 Probanden und Methoden

2.1 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive Interventionsstudie, in der die Zahnsteinentfernung und Bestimmung des darin enthaltenen α-SYN die Intervention darstellt. Neben der Zahnsteinentnahme wurde außerdem ein Riechtest durchgeführt sowie ein Fragebogen durch die Probanden ausgefüllt. Nach der Aufnahmediagnostik nahm die Durchführung der Studienuntersuchungen am einzelnen Probanden jeweils circa 20 Minuten in Anspruch.

2.2 Ethikantrag

Für die durchgeführte Studie liegt ein positives Votum der Ethik-Kommission der Universität Ulm vor (Ethikantrag Nummer 20/10).

2.3 Probanden

2.3.1 Probandenkollektiv

Die Datenerhebung für die vorliegende Studie erfolgte im März 2016.

Es wurden zwei Gruppen von Probanden gebildet. In die Fallgruppe wurden Patienten eingeschlossen, welche an der idiopathischen Form des M. Parkinson leiden. Die Kontrollgruppe bestand aus Probanden ohne Symptome jeglicher Form neurologischer Erkrankungen.

2.3.2 Probandenrekrutierung

Die Probandenrekrutierung der Parkinsonpatienten erfolgte im Rahmen der ambulanten Parkinson-Sprechstunden von Prof. Kassubek und Prof. Pinkhardt sowie den Parkinson-Sprechstunden der Assistenzärzte in der neurologischen Abteilung der Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm (RKU). Außerdem wurden stationäre Parkinsonpatienten des RKU in die Studie eingeschlossen.

Die Rekrutierung der Kontrollgruppe erfolgte auf den orthopädischen Stationen des RKU sowie durch Einschluss der Begleitpersonen im Zuge der Parkinson-Sprechstunden.

2.3.3 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Gruppe der Parkinsonerkrankten wurden Probanden eingeschlossen, bei denen bereits seit mindestens einem Jahr die Diagnose eines idiopathischen M. Parkinson von einem Spezialisten für Bewegungsstörungen gestellt worden war. Es wurde bei der Auswahl darauf geachtet, möglichst eine ausgeglichene Verteilung zwischen Frauen und Männern zu erhalten. Das Alter der Betroffenen reichte von 41 bis 86 Jahren, wobei die Patienten ein mittleres Alter von 68,4 ± 10,59 Jahren aufwiesen. Von den insgesamt 50 Parkinsonkranken waren 32 männlich und 18 weiblich.

Es wurden Probanden in die Fallgruppe eingeschlossen, welche sich ambulant in der Sprechstunde des RKU vorstellten oder welche sich auf der neurologischen Station des RKU befanden.

Ausgeschlossen wurden Erkrankte, welche andere Formen des Parkinsonismus aufwiesen bzw. unter anderen Formen neurologischer Störungen litten (n<5). Ausgeschlossen wurden außerdem zahnlose Probanden bzw. Probanden mit zu wenig Zahnstein (n<5). Auch wurden Probanden nicht berücksichtigt, deren Stadium der Erkrankung schon so weit fortgeschritten war, dass sie sich nicht mehr selbst für die Studienteilnahme entscheiden konnten und gleichzeitig kein entsprechender Vormund anwesend war (n<5).

In die Kontrollgruppe wurden Probanden eingeschlossen, welche als Begleitpersonen im Rahmen der Parkinson-Sprechstunde anwesend waren bzw. sich auf Grund orthopädischer Erkrankungen auf der orthopädischen Station des RKU befanden. Die Kontrollprobanden waren im Alter zwischen 35 und 87 Jahren. Sie hatten ein mittleres Alter von 65,22 ± 13,65 Jahren. Von den insgesamt 50 Kontrollen waren 28 männlich und 22 weiblich. Personen unter 35 Jahren wurden nicht in die Kontrollgruppe eingeschlossen, um einen möglichst gleichen Altersdurchschnitt zwischen Fall- und Kontrollkohorte zu erzielen.

In die Kontrollgruppe wurden nur Probanden eingeschlossen, bei denen keine Anzeichen neurologischer Erkrankungen bekannt waren. Auch hier wurden Probanden ausgeschlossen, welche nicht mehr dazu fähig waren, eigenständig Entscheidungen zu treffen (n<5). Außerdem wurden zahnlose Personen bzw. Probanden mit zu wenig Zahnstein nicht berücksichtigt (n<5).

2.4 Instrumente und Geräte

Zur Zahnsteinentnahme wurden zahnärztliche Handinstrumente verwendet. Es kamen Universalscaler S204SD6 (Hu-Friedy, Chicago, USA) zum Einsatz.
Nach jedem Gebrauch wurden die Instrumente vorschriftsgemäß 120 Minuten im Tauchbad mit Descoton Forte (Dr. Schumacher, Malsfeld, Deutschland) desinfiziert und anschließend mit vollentsalztem Wasser abgespült und getrocknet. Die Zahnsteinproben wurden in numerisch gekennzeichneten Tubes gesammelt und während der Behandlung anderer Probanden auf Eis gelagert. Am Ende eines Studientages wurden die Proben bei - 80°C über Nacht eingefroren.
Für den Riechtest, welcher bei allen Probanden durchgeführt wurde, wurde der Snifflin' Sticks-Riechtest mit 12 Stiften verwendet (burghart Messtechnik, Wedel, Deutschland).

2.5 Einverständniserklärung

Alle Probanden haben nach ausführlicher Aufklärung über den Studienablauf eine schriftliche Einverständniserklärung unterschrieben und abgegeben.

2.6 Studienablauf

Nach ausführlicher mündlicher Erläuterung des Studienablaufs und des Hintergrunds der Studie wurde den Probanden eine schriftliche Patienten-information und eine Einwilligungserklärung vorgelegt (Anhang 1). Das Ausfüllen eines kurzen Fragebogens (Anhang 2) folgte. Hier wurde neben der allgemeinen Anamnese (Alter, Geschlecht, Größe, Gewicht, Diabetes, Rauchen) auch die spezielle Anamnese (Stadium der Erkrankung, Erstdiagnose, Medikamente, familiäre Fälle von Parkinson, Benutzung von Kaugummi, Häufigkeit des Zähneputzens, Auftreten von Gingivitis, Trinkmenge am Tag) erhoben. Anschließend wurde mit der Zahnsteinentfernung begonnen. Aufgrund der Lokalisation der Ausführungsgänge der Glandula submandibularis und Glandula sublingualis tritt Zahnstein bevorzugt an den Unterkiefer-Frontzähnen auf. Aus diesem Grund wurde, sofern möglich, bevorzugt an den Unterkiefer-Frontzähnen die Zahnsteinentnahme durchgeführt.
Nach erfolgreicher Zahnsteinentfernung wurde abschließend der Snifflin' Sticks-Riechtest durchgeführt. Bei diesem Test wurden den Probanden insgesamt 12 Stifte mit unterschiedlichen Gerüchen gereicht. Zu dem jeweiligen Stift wurde

eine passende, auf den Stift abgestimmte, Liste mit vier Auswahlmöglichkeiten von Gerüchen vorgelegt, mit dessen Hilfe der Proband den Geruch zuordnete. Das entsprechende Ergebnis wurde notiert und mit dem Probanden besprochen.

2.7 Materialien und Methoden zur Auswertung

2.7.1 Materialien zur Auswertung

Die Untersuchung der Zahnsteinproben erfolgte im HNO-Forschungslabor der Universität Ulm auf dem Michelsberg durch Frau Dipl.-Biol. Cudek.

Hinzugezogen wurden das SensoLyte™ Anti-alpha-Synuclein Quantitative ELISA Kit (Human/Mouse/Rat) (AnaSpec, Fremont, California, USA).

Außerdem kam der Halt™ Protease Inhibitor (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachussets, USA) und das Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay Reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachussets, USA) zum Einsatz.

Außerdem wurden Albumin (2 mg/ml), non-binding plates (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Oberösterreich) und Ampuwa verwendet.

Wegen der Möglichkeit, dass einige Ergebnisse der Zahnsteinproben aufgrund Kontamination durch Hämoglobin (Hb) verfälscht waren, wurden die Proben anschließend im Zentrum für Klinische Forschung mit Hilfe des Human Hemoglobin ELISA Kits (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) durch Herrn Dr. Öckl auf Hb untersucht.

2.7.2 Methoden zur Auswertung

Insgesamt wurden 100 Proben ausgewertet wobei diese nicht auf einmal, sondern aufgrund Limitationen des Kits, in mehreren Läufen nacheinander untersucht wurden. Grob lässt sich jeder Lauf für die Auswertung der Zahnsteinproben in drei Teile gliedern:

Teil 1: Für die entsprechend notwendige Standardkurve wurden Standardproben hergestellt. Die Standardkurve deckt den notwendigen Konzentrationsbereich ab und ist erforderlich, um später die unbekannten Probenkonzentrationen im Zahnstein zu bestimmen.

Teil 2: Es wurde für jede Probe die Gesamtproteinmenge im Zahnstein bestimmt. So konnte später der Anteil an α-SYN im Verhältnis zur Gesamtproteinmenge berechnen werden.

Teil 3: Abschließend erfolgte die Bestimmung der α-SYN-Konzentration.

Der angewendete Assay wurde mit einer Mikrotiterplatte mit 96 Wells durchgeführt. Es wurde eine Doppelbestimmung jeder Probe angesetzt, um den Fehlerbereich zu minimieren.
Somit reichte ein Kit für maximal 40 Proben und acht Standards.

2.7.3 Vorbereitung vor Entnahme des Zahnsteins

Vor Entnahme des Zahnsteins wurde das Leergewicht der Tubes bestimmt, notiert und die Tubes in aufsteigender Reihenfolge durchnummeriert.
Im Zuge der Zahnsteinentnahme wurden die Tubes mit entsprechenden Namens-Etiketten versehen. So wurde die spätere Zuordnung der Proben auf den jeweiligen Probanden sichergestellt.
Nach der Entnahme wurden die Zahnsteinproben bei - 80°C gelagert.

2.7.4 Vorbereitung zur Messung

Am Tag der Bearbeitung wurden die Proben auf Raumtemperatur erwärmt und die Etiketten auf den mit Zahnstein gefüllten Tubes entfernt. Es wurde das Gesamtgewicht des Zahnsteins bestimmt indem die Differenz zwischen Tube mit Zahnstein und dem initialen Leergewicht der Tubes gebildet wurde.

<u>Homogenisierung</u>
Im ersten Schritt wurde der Zahnstein homogenisiert um ihn für die anschließende Bearbeitung mit dem Bradford Assay vorzubereiten.
Dazu wurden 3960 µl Radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA-Buffer) (NaCl / DOC / SDS / Tris. EDTA / EGTA / Triton x100; nach anaspec.com) mit 40 µl des Halt Protease Inhibitor gemischt (dies gelte als *Mischung A*).
Anschließend wurden 200 µl der Mischung A mit einem Homogenisierkügelchen mit 3 mm Durchmesser in die Tubes gefüllt, welche mit der jeweiligen individuellen Probanden-Zahl zuvor nummeriert worden waren. Die Tubes wurden verschlossen und geschüttelt. Mithilfe des Homogenisators TissueLyser LT (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) wurden die Proben 10 Minuten bei 50 1/s (50 Impulse pro Sekunde) homogenisiert.
Anschließend wurden die Zahnstein-Tubes 45 Minuten auf Eis gelegt.

Zentrifugation

Die Zahnsteinproben wurden daraufhin 15 Minuten bei 13 000 rpm und 4°C mit der Eppendorf Centrifuge 5424 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert.

Es wurden drei Sätze Tubes vorbereitet - drei leere Tubes für jeden Probanden und somit für jede Probe.

Überstand

Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert - es waren stets knapp 200 µl. Es musste vorsichtig gearbeitet werden, um mit der Pipettenspitze nicht das abzentrifugierte Pellet zu zerstören – man benötigte den flüssigen Überstand ohne Bestandteile des Zahnsteinpellets.

Dieser Überstand wurde in einen Satz der zuvor vorbereiteten leeren Tubes gefüllt. Die Tubes mit Homogenisierkügelchen und dem Pellet wurden verworfen.

Von diesen knapp 200 µl Überstand wurden 100 µl in den zweiten Satz Tubes pipettiert. Diese wurden bei -80°C für die spätere Hämoglobin-Untersuchung weggefroren.

Somit waren im ersten Satz noch knapp 100 µl des Überstandes vorhanden.

2.7.5 Messung der Gesamtproteinmenge

Als Erstes wurde der Gesamtproteinanteil im Zahnstein nachgewiesen. Dabei ging man wie folgt vor:

Es wurden sechs Tubes für die Standardkurve vorbereitet und mit 0-2-4-6-8-10 durchnummeriert. Diese sechs Tubes galten als Standard-Tubes.

In den dritten Satz Tubes wurden jeweils 1 ml Coomassie-Brilliant-Blau (coomassie Protein Assay Reagenz), sowie 2 µl Zahnstein, gegeben.

Bei den Standard-Tubes ging man wie folgt vor:

Allgemein wurde in alle Tubes 1 ml Coomassie-Brilliant-Blau gegeben. In alle Tubes, außer dem 0-Standard Tube, wurde außerdem Albumin zugefügt. Dieses Albumin hatte eine Konzentration von 2 mg/ml und musste bei jedem Teilschritt der Standardproben verschieden stark verdünnt werden

In den 0-Standard Tube wurde lediglich 1 ml Coomassie-Brilliant-Blau gegeben.

In den 2-Standard Tube gab man neben dem 1 ml Coomassie-Brilliant-Blau außerdem 1 µg Albumin. Somit ergab sich eine Konz. von 2 µg/ml.
In den 4-Standard Tube wurde entsprechend 2 µg Albumin gegeben, wodurch man eine Konz. von 4 µg/ml erhielt.
Analog enthielt der 6-Standard Tube 3 µg Albumin und somit eine Konz. von 6 µg/ml, der 8-Standard Tube 4 µg Albumin (Konz.: 8 µg/ml) und der 10-Standard Tube 5 µg Albumin (Konz.: 10 µg/ml).
So wurde ein Satz von Tubes für die Standardkurve in aufsteigenden Konzentrationen geschaffen.
Die Tubes wurden anschließend im Vortexmischer Heidolph REAX 2000 (Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland) resuspendiert.

Tabelle 1: Übersicht Herstellung der 6 Tubes für Standardkurve

Tube # 0	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau (Konz. 0 µg/ml)
Tube # 2	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau 1 µg Albumin (Konz. 2 µg/ml)
Tube # 4	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau 2 µg Albumin (Konz. 4 µg/ml)
Tube # 6	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau 3 µg Albumin (Konz.6 µg/ml)
Tube # 8	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau 4 µg Albumin (Konz. 8 µg/ml)
Tube # 10	1 ml Coomassie-Brilliant-Blau 5 µg Albumin (Konz.10 µg/ml)

Nach 10 Minuten Inkubationszeit wurden jeweils 200 µl aus den Tubes in eine nicht-haftende Platte abpipettiert (non-binding plates, Greiner Bio-one, Kremsmünster, Oberösterreich). Hier mussten nicht-haftende Platten

herangezogen werden, um Fehler bei der Extinktionsmessung durch noch haftende Proteine zu minimieren.

2.7.6 Messung des alpha-Synukleins

Tabelle 2: Komponenten des Kits

Komponente A	Anti-alpha-Synuklein 8 Streifenplatten
Komponente B	Alpha-Synuklein Standard (1 µg/ Glasfläschen)
Komponente C	Sample Dilution Buffer (Proben-Verdünnungspuffer)
Komponente D	Wash Buffer (Waschpuffer)
Komponente E	TMB Color Substrate Solution (TMB Farbsubstratlösung)
Komponente F	Stop Solution (Stop Lösung)
Komponente G	Detection Antibody (0,2 mg/ml) (Antikörper-Nachweis)
Komponente H	Adhesive Plate Covers (adhäsive Platte mit Abdeckung)

a. Standards herstellen

Als Erstes wurden Standards hergestellt. Hierfür wurde 990 µl RIPA-Buffer mit 10 µl Protease-Inhibitor gemischt. Dies sei *Mischung B*.

Anschließend wurden 6300 µl der Komponente C des Kits (Sample Dilution Buffer) mit 700 µl von Mischung B gemischt - also im Verhältnis 10:1. Dies sei *Mischung C*.

- *Schritt 1:* 1 ml der Mischung C wurde mit der Komponente B des Kits (alpha-Synuklein Standard, 1 µg) bei Mot 300 1/min 15 Minuten gemischt. Diese *Mischung D* enthielt somit eine Konz. von 1 000 000 pg/ml.
- *Schritt 2:* Im nächsten Schritt wurden 990 µl der Mischung C (990 µl RIPA-Buffer und 10 µl Protease-Inhibitor) mit 10 µl der Mischung D gevortext (Konz.: 10 000 pg/ml).
- *Schritt 3:* Im nächsten Schritt wurde 950 µl der Mischung C mit 50 µl der Endlösung von Schritt zwei gevortext (Konz.: 500 pg/ml).
- *Schritt 4:* Hier wurden 500 µl der Mischung C mit 500 µl der Endlösung von Schritt drei gevortext (Konz.: 250 pg/ml).
- *Schritt 5:* 500 µl der Mischung C wurden mit 500 µl der Endlösung von Schritt vier gevortext (Konz.: 125 pg/ml).
- *Schritt 6:* 500 µl der Mischung C wurden mit 500 µl der Endlösung von Schritt fünf gevortext (Konz.: 62,5 pg/ml).

- *Schritt 7:* 500 µl der Mischung C wurden mit 500 µl der Endlösung von Schritt sechs gevortext (Konz.: 31,25 pg/ml).
- *Schritt 8:* 500 µl der Mischung C wurden mit 500 µl der Endlösung von Schritt sieben gevortext (Konz.: 15,625 pg/ml).
- *Schritt 9:* 500 µl der Mischung C wurden mit 500 µl der Endlösung von Schritt acht gevortext (Konz.: 7,8125 pg/ml).

Tabelle 3: Herstellerangabe über Verdünnungsreihe für Standardkurven.

Step	Concentration [pg/ml]	α-Synuclein Standard (Component B)	Sample Dilution Buffer (Component C)
1	1000000	*Prepare as described in Step 1.1*	
2	10000	10 µl from step 1	990 µl
3	**500**	50 µl from step 2	950 µl
4	**250**	500 µl from step 3	500 µl
5	**125**	500 µl from step 4	500 µl
6	**62.5**	500 µl from step 5	500 µl
7	**31.25**	500 µl from step 6	500 µl
8	**15.625**	500 µl from step 7	500 µl
9	**7.8125**	500 µl from step 8	500 µl

©AnaSpec, Inc. 34801 Campus Drive, Fremont, CA 94555
Tel: (800)-452-5530 | service@anaspec.com | www.anaspec.com

Abdruck mit freundlicher Genehmigung von AnaSpec

b. Zahnsteinproben verdünnen

Folgendes musste bei der Verdünnung der Proben beachtet werden: Die Bearbeitung der Zahnsteinproben erfolgte hier ohne den Protease-Inhibitor da dieser bereits zuvor zugefügt worden war.

Je 189 µl Dilution-Buffer wurde in einem neuen Satz Tubes mit 21 µl Probe verdünnt (Verdünnung im Verhältnis 10:1). Dies sei *Mischung E.*
Die Tubes wurden leicht geschüttelt. Vortexen war hier nicht indiziert, da der Dilution-Buffer ein Waschmittel enthielt und die Probe somit geschäumt und die weitere Bearbeitung verzögert hätte.

c. Antikörper vorbereiten

Zuerst wurde die Detection Antibody-Ampulle zentrifugiert.
5472,5 µl Dilution C wurde mit 27,5 µl Detection Antibody (Komponente G) vermischt. Dies kann als *Mischung F* angesehen werden.

In einen neuen Satz Tubes wurden für die sechs Standard-Tubes jeweils 50 µl der Mischung F und 100 µl der Mischung C gefüllt (Sample-Dilution Buffer, RIPA-Buffer, Protease-Inhibitor).
In die Tubes der Zahnsteinproben wurde analog 50 µl der Mischung F und 100 µl der Mischung E gefüllt. Diese Mischungen der Zahnsteinproben bzw. der Standard-Tubes wurden in eine 96-Lochplatte pipettiert.
Über die Platte wurde eine dafür vorgesehene Folie gespannt. Die Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert.

d. Vorbereitung zur Messung

Nach einer Inkubationszeit wurde am nächsten Morgen eine Waschlösung hergestellt: *Mischung G*. Dazu wurden 30 ml Wash-Buffer (Komponente D) mit 270 ml Ampuwa (Teile 1:9) gemischt.
Insgesamt wurden die Vertiefungen der Platte nach Herstellerangaben sechsmal mit jeweils 350 µl der Mischung G gespült. Nach jeder Befüllung wurde die Platte bei Mot 100 1/min 10 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurde die Mischung G ausgeworfen. Dies wurde sechsmal durchgeführt. Beim letzten Mal musste darauf geachtet werden, dass die Vertiefungen vollständig frei von Resten der Mischung G waren. Dazu wurde die Platte zwei- bis dreimal auf eine weiche Unterlage geklopft.
Es wurde in jede Vertiefung 100 µl der Komponente E des Kits, die TMB Color Substrate Solution, pipettiert. Die Platte wurde daraufhin 15 Minuten stehen gelassen.
Proben, welche intensiver blau gefärbt waren als der höchste Standard, lagen außerhalb der Range. Diese Proben mussten später erneut bestimmt werden.

Anschließend wurde der Vorgang durch jeweils 50 µl Stop-Solution (Komponente F) angehalten.

e. Messung

Die Platte wurde anschließend mit Hilfe des Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) 10 Sekunden geschüttelt. Anschließend wurde die Extinktion der jeweiligen Proben mit dem Infinite M200 PRO gemessen.

Tabelle 4: Übersicht der Mischungen

Mischung A	3960 µl RIPA-Buffer	40 µl Halt™ Protease Inhibitor
Mischung B	990 µl RIPA-Buffer	10 µl Halt™ Protease-Inhibitor
Mischung C	6300 µl Sample Dilution Buffer (Kit-Komponente C)	700 µl von Mischung B
Mischung D	1 ml der Mischung C	alpha-Synuklein Standard, 1 µg (Kit-Komponente B)
Mischung E	189 µl Dilution-Buffer	21 µl der Zahnsteinprobe
Mischung F	5472,5 µl Dilution Buffer	27,5 µl Detection Antibody (Kit-Komponente G)
Mischung G	30 ml Wash-Buffer (Kit-Komponente D)	270 ml Ampuwa

2.7.7 Messung des Hämoglobins

Das Hämoglobin wurde mit Hilfe des Human Hemoglobin ELISA Kits (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) gemessen. Dieses Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist für den Nachweis von menschlichem Hb im Blut, Serum und Plasma, sowie der CSF oder in Zellkultur-Medien, geeignet. Das Kit enthält ausreichend viele Komponenten um bis zu 40 Proben menschlichen Hämoglobins in doppelter Ausführung zu testen.

Hintergrund

Hb ist ein eisenhaltiges Protein, welches über 97% der Masse der roten Blutzellen ausmacht. Das Hb-Molekül setzt sich aus zwei 141-α-Ketten und zwei 146-β-Ketten zusammen, welche einen α2β2-Komplex bilden.

Wie bereits eingangs erwähnt bestand die Möglichkeit, dass einige Ergebnisse der Zahnsteinproben aufgrund einer Kontamination durch Hb verfälscht waren.

Mithilfe des Human Hemoglobin ELISA Kits wurde diese mögliche Kontamination überprüft.

Prinzip des Assays

Dieses Kit basiert auf einem Sandwich ELISA.

Das humane Hämoglobin in der Testprobe wird durch anti-humane Hämoglobin-Antikörper eingefangen, die auf der Oberfläche der Mikrotiter-Vertiefungen zuvor angebunden worden sind.

Nachdem die Probe angebunden ist, werden ungebundene Moleküle und Proteine abgespült. Anschließend werden Detektionsantikörper zugegeben, welche das Hb binden. Eine Streptavidin-konjugierte Horseradish-Peroxidase (SA-HRP) wird zugefügt, welche eine kolorimetrische Reaktion mit dem chromogenen Tetramethylbenzidin (TMB) eingeht.

Die kolorimetrische Reaktion ruft ein blaues Produkt hervor welches sich gelb verfärbt, sobald die Reaktion durch Zugabe verdünnter Schwefelsäure beendet wird. Die Absorption von 450 nm des gelben Produkts ist zur Menge des Hämoglobin-Analyts der Probe proportional. Daraus kann eine Vier-Parameter-Standardkurve entworfen werden.

Die Hämoglobin-Konzentrationen in den Proben können über Interpolation ihrer Absorption aus der Standardkurve bestimmt werden.

Durch Einbezug eines Probenverdünners kann schließlich die Hämoglobin-Konzentration in der ursprünglichen Probe berechnet werden.

2.7.8 Statistik

Die Vermessung der Patienten- und Kontrolldatensätze erfolgte verblindet, das heißt ohne Kenntnisse der Gruppenzugehörigkeit oder der Erkrankung des zum Datensatz gehörenden Patienten oder Kontrollprobanden.

Bei der statistischen Auswertung wurde beim Vergleich der Fall- und Kontrollkohorte von einer Nicht-Normalverteilung ausgegangen: Es handelte sich um humane Proben, welche auf Grund starker, interindividueller Unterschiede von Menschen, in der Regel nicht normalverteilt sind. Aus diesem Grund wurde beim Vergleich der beiden Gruppen der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet.

Die Korrelationsanalysen wurden mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) berechnet.

Das Signifikanzniveau wurde, sofern nicht anders angegeben, auf $p<0,05$

festgelegt. Betrug das Signifikanzniveau $p<0,05$ wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein signifikanter Unterschied vorliegt. Blieb der ermittelte Wert über diesem Niveau ($p>0,05$) wurde die Hypothese aufgestellt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen Fall- und Kontrollgruppe vorhanden ist.

Die Auswertung und die graphische Darstellung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism Version 7.0a für Macintosh (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

3 Ergebnisse

3.1 Alpha-Synuklein Messung

Die Messung der α-SYN-Konzentration im Zahnstein erfolgte im HNO-Forschungslabor der Universität Ulm auf dem Michelsberg.

Insgesamt wurden 100 Proben untersucht - 50 Proben von Erkrankten und 50 Proben von Kontrollen. Die α-SYN-Konzentration in pg wurde pro mg Zahnstein bestimmt. Fünf Proben der Parkinsonpatienten und zwei Proben der Kontrollen enthielten ungenügend Zahnstein und konnten nicht ausgewertet werden.

Die Parkinsonerkrankten (n=45) wiesen im Mittel einen Wert von 10,52 ± 16,67 pg α-SYN/mg Zahnstein auf. Der Median lag bei 7,18 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 (25% Perzentil) von 3,14 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 (75% Perzentil) von 11,65 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Für die Kontrollen (n=48) ergab sich ein Mittelwert von 30,05 ± 123,35 pg α-SYN/mg Zahnstein. Hier betrug der Median 8,78 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,84 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 14,82 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Das Ergebnis des Mittelwerts schien auf den ersten Blick recht eindeutig zu sein und darauf hinzuweisen, dass die α-SYN-Konzentration bei den Erkrankten niedriger ist als bei den Kontrollen. Bei der statistischen Auswertung sowie bei der Bestimmung der Standardabweichungen und des Median zeigte sich jedoch, dass die Werte innerhalb der beiden Gruppen sehr starke Streuungen aufwiesen (Abb.1). Aufgrund der Tatsache, dass die Messwerte nicht normalverteilt sind, wurde der Mann-Whitney-U-Test beim angewendet.

Das Signifikanzniveau lag bei p=0,2070. Ein signifikanter Unterschied konnte somit nicht gezeigt werden.

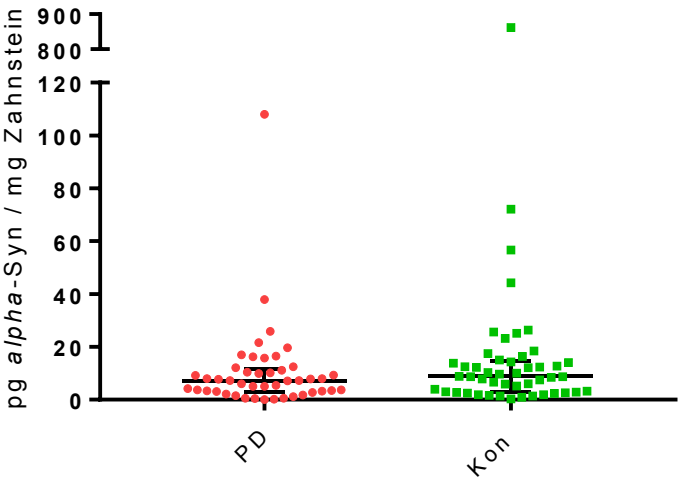


Abbildung 1: Darstellung der α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Grafische Darstellung der Messergebnisse der jeweils bestimmten α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein bei Parkinsonerkrankten (PD) (n=45) sowie Kontrollen (Kon) (n=48). Angabe der Messergebnisse in pg α-SYN/mg Zahnstein.

Die Parkinsonerkrankten wiesen einen Median von 7,18 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 3,14 und einem Quartil Q_3 von 11,65 auf.

Für die Kontrollen ergab sich ein Median von 8,78 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,84 und einem Quartil Q_3 von 14,82.

Es lag keine Signifikanz der Messergebnisse vor (p= 0,2070).

Aufgrund des Verdachtes, dass einige Zahnsteinproben mit Blut verunreinigt waren, wurden die Proben anschließend im Zentrum für Klinische Forschung mit Hilfe des Human Hemoglobin ELISA Kits auf Hb untersucht.

3.2 Hämoglobin Messung

Wie vermutet bestand eine Korrelation zwischen dem Hämoglobingehalt und der α-SYN-Konzentration in den Zahnsteinproben. Insbesondere die Proben mit ungewöhnlich hohen α-SYN-Konzentrationen wiesen eine deutliche Blutkontamination auf.

Die Korrelation zwischen Hb und α-SYN schien aber nicht ganz linear, sondern erst ab einer Hämoglobinkonzentration von ca. 4000 ng/ml stiegen die α-SYN-Werte deutlich an (Abb.2). Hier lag eine Signifikanz der Messergebnisse vor ($p<0,0001$). Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient betrug $r_s=0,4$.

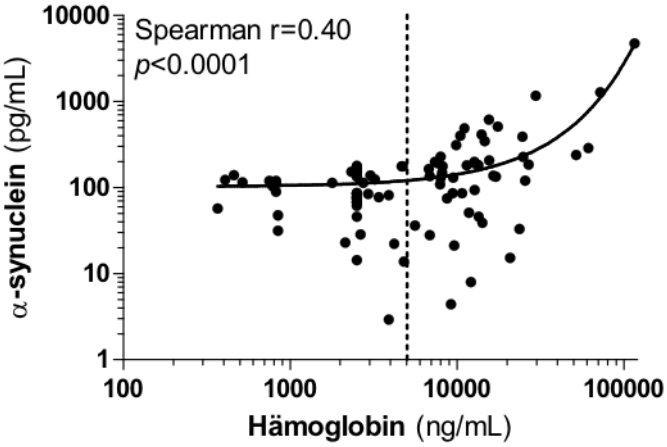


Abbildung 2: Beziehung von Hämoglobin zu α-SYN (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Darstellung der Beziehung von Hämoglobin (ng/ml) zu α-SYN (pg/ml) im Zahnstein.

Die Korrelation zwischen Hämoglobin und α-SYN scheint nicht ganz linear. Erst ab einer Hämoglobinkonzentration von ca. 4000 ng/ml steigen die α-SYN-Werte deutlich an. Es lag eine Signifikanz der Messergebnisse vor (p<0,0001).

Aus diesem Grund wurden alle Proben mit einer Hämoglobinkonzentration >4000 ng/ml von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Es folgte eine Auswertung mit Ausschluss aller Proben, welche eine Hämoglobinkonzentration >4000 ng/ml aufgewiesen haben.

Der Mittelwert betrug 7,06 ± 6,04 pg α-SYN/mg Zahnstein bei den Parkinsonerkrankten (n=16). Der Median lag bei 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein mit

einem Quartil Q_1 von 2,91 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 9,74 pg α-SYN/mg Zahnstein. Bei den Kontrollen (n=26) betrug der Mittelwert 11,31 ± 14,32 pg α-SYN/mg Zahnstein. Der Median lag hier bei 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,6 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 13,14 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.3).
Auch hier wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei p=0,4042. Somit kann auch hier von keinem signifikanten Unterschied ausgegangen werden.

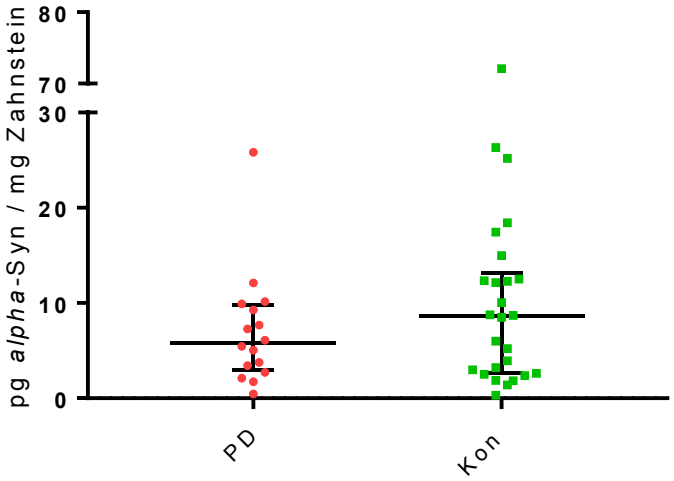


Abbildung 3: Darstellung der α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein (<4000ng/ml Hb) mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)
Grafische Darstellung der Messergebnisse der jeweils bestimmten α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein bei Parkinsonerkrankten (PD) (n=16) sowie Kontrollen (Kon) (n=26) nach Ausschluss der Proben mit einer Hb-Konzentration > 4000ng/ml. Angabe der Messergebnisse in pg α-SYN/mg Zahnstein.
Der Median bei den Parkinsonerkrankten betrug 5,76 pg *α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,91 und einem Quartil Q_3 von 9,74. Für die Kontrollen ergab sich ein Median von 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,6 und einem Quartil Q_3 von 13,14.*
Es lag keine Signifikanz der Messergebnisse vor (p= 0,4042).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Tendenz vorliegt, dass die α-SYN - Werte im Zahnstein bei den Erkrankten im Mittel geringfügig niedriger sind.

3.3 Riechtest

Bei der Auswertung wurden nur die Ergebnisse des Riechtests von Probanden mit eingeschlossen, deren Zahnsteinprobe einen Wert von < 4000 ng/ml Hb aufwies. So konnte eine korrekte Darstellung der Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und dem Ergebnis des Riechtests sichergestellt werden.

Parkinsonerkrankte

Beim Riechtest schnitten die Parkinsonerkrankten deutlich schlechter ab als die Kontrollen: Die Erkrankten (n=16) hatten im Mittel 6,3 ± 2,7 Stiften den richtigen Geruch zugeordnet. Der Median lag bei 5,5 Stiften mit einem Quartil Q_1 von 5 Stiften und einem Quartil Q_3 von 8,5 Stiften. Die mediane α-SYN-Konzentration betrug 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.4).

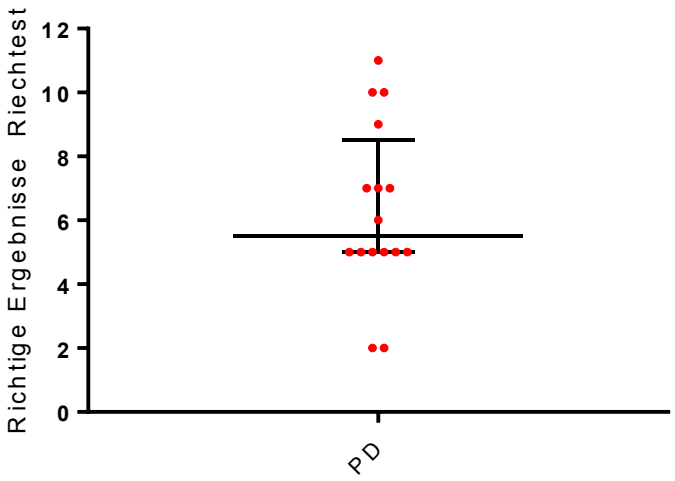


Abbildung 4: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei der PD-Kohorte mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei den Parkinsonerkrankten (n=16). Insgesamt wurden den Probanden 12 Snifflin' Sticks gereicht. Ausschließlich Einbezug von Proben <4000 ng/ml Hb.

Der Median lag bei 5,5 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 5 und einem Quartil Q_3 von 8,5.

Kontrollen

Die Kontrollprobanden (n=26) erkannten durchschnittlich von 10,4 ± 1,2 Stiften den richtigen Geruch. Der Median lag hier bei 10 Stiften mit einem Quartil Q_1 von 9,8 Stiften und einem Quartil Q_3 von 11,3 Stiften. Die mediane α-SYN-Konzentration betrug 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.5).

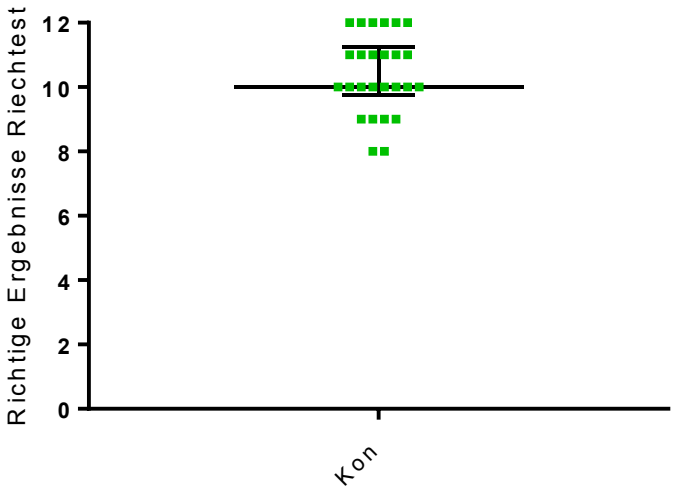


Abbildung 5: Graphische Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei der Kontrollkohorte mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei den Kontrollen (n=26). Insgesamt wurden den Probanden 12 Snifflin' Sticks gereicht. Ausschließlich Einbezug von Proben <4000 ng/ml Hb.

Der Median lag bei 10 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 9,8 und einem Quartil Q_3 von 11,3.

Parkinsonerkrankte vs. Kontrollen

Zum statistischen Vergleich der Riechergebnisse zwischen Erkrankten (n=16) und Kontrollen (n=26) wurde erneut der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Das Signifikanzniveau lag bei p<0,0001. Somit liegt ein signifikanter Unterschied im Riechvermögen zwischen Erkrankten und Kontrollen vor. Bei den Erkrankten lag der Median bei 5,5 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 5 Stiften und einem Quartil Q_3 von 8,5 Stiften. Bei den Kontrollen lag der Median bei 10 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 9,8 Stiften und einem Quartil Q_3 von 11,3 Stiften (Abb.6).

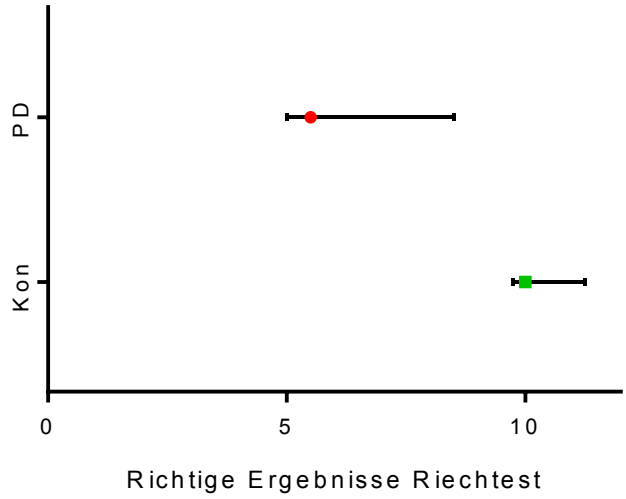


Abbildung 6: Graphische Darstellung des Ergebnisses des Riechtests bei Parkinsonerkrankten und Kontrollen mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen Ergebnis des Riechtests bei den Parkinsonerkrankten (PD) (n=16) und den Kontrollen (Kon) (n=26). Das Signifikanzniveau lag bei p< 0,0001. Der Median lag bei den Erkrankten bei 5,5 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 5 und einem Quartil Q_3 von 8,5.

Bei den Kontrollen lag der Median bei 10 richtig zugeordneten Stiften mit einem Quartil Q_1 von 9,8 und einem Quartil Q_3 von 11,3.

3.4 Relevante Ergebnisse Fragebogen

Korrelation zwischen Ergebnis Riechtest und Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung

Im Durchschnitt hatten die Patienten (n=16) seit 9,06 ± 6,35 Jahren die Diagnose M. Parkinson. Der Median der richtig zugeordneten Gerüche betrug 5,5 Stifte (Abb.7). Die Dauer seit Erstdiagnose stand hierbei nicht in Korrelation mit dem Riechtest: Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient lag bei r_s= -0,2008 (p=0,4531).

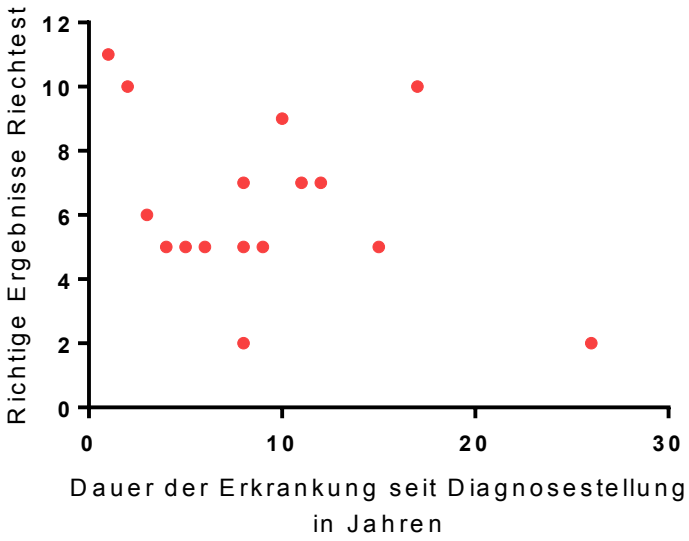


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Ergebnisses des Riechtests zur Dauer seit der Erstdiagnose (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen den Ergebnissen des Riechtests und der Dauer seit der sicheren Diagnosestellung bei Parkinsonerkrankten (n=16). Ausschließlich Einbezug von Proben <4000 ng/ml Hb. Die Probanden hatten seit 9,06 ± 6,35 Jahren die Diagnose und ordneten im median 5,5 Stiften den richtigen Geruch zu.

Korrelation zwischen α-SYN-Konzentration und Jahre seit Diagnosestellung bei Parkinsonerkrankten

Im Fragebogen wurden die Parkinsonpatienten zu dem Zeitpunkt ihrer Erstdiagnose befragt.

Die Probanden, welche in die Studie eingeschlossen wurden, wiesen bei der Befragung eine Dauer seit Diagnosestellung zwischen 1 und 26 Jahren auf (Abb.8). Im Durchschnitt hatten die Patienten (n=16) seit 9,06 ± 6,35 Jahren die Diagnose. Sie wiesen eine mediane Konzentration von 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein auf.

Statistisch dargestellt zeigte sich jedoch keine Tendenz zu steigender oder sinkender α-SYN-Konzentration mit der Dauer der Erkrankung: Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient lag bei $r_{s=}$ -0,1504 (p=0,5776).

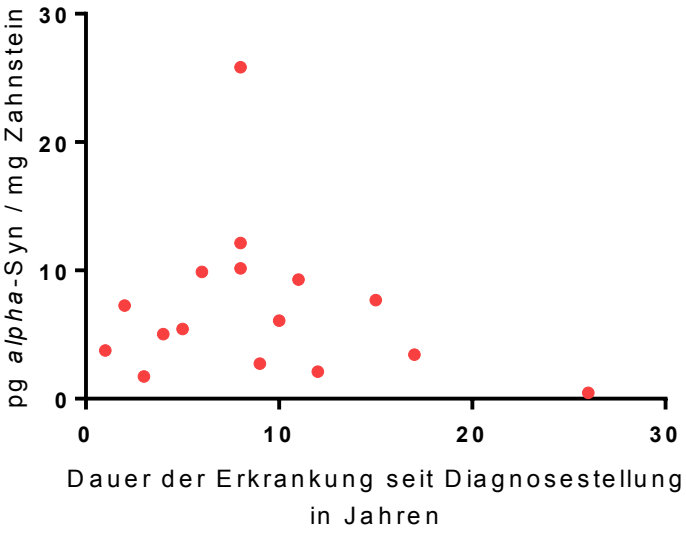


Abbildung 8: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung bei Parkinsonerkrankten (Universitäts- und Rehabilitations-kliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Erkrankungsdauer bei Parkinsonpatienten (n=16). Ausschließlich Einbezug von Proben <4000 ng/ml Hb. Die Probanden hatten seit 9,06 ± 6,35 Jahren die Diagnose. Der Median betrug 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein auf.

<u>Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Geschlecht</u>

Parkinsonerkrankte

Innerhalb der Kohorte der Erkrankten waren n=10 Probanden männlich und n=6 Probanden weiblich.

Die Männer wiesen im Mittel eine α-SYN-Konzentration von 7,76 ± 7 pg α-SYN/mg Zahnstein auf. Der Median betrug 6,36 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 3,5 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 9,5 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Die Frauen wiesen durchschnittlich eine α-SYN-Konzentration von 5,89 ± 4,3 pg α-SYN/mg Zahnstein auf. Hier betrug der Median 4,76 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,01 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 10,46 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.9).

Das Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U-Test) für eine Abhängigkeit zwischen Geschlecht und α-SYN-Konzentration betrug bei der Fallkohorte p=0,7128.

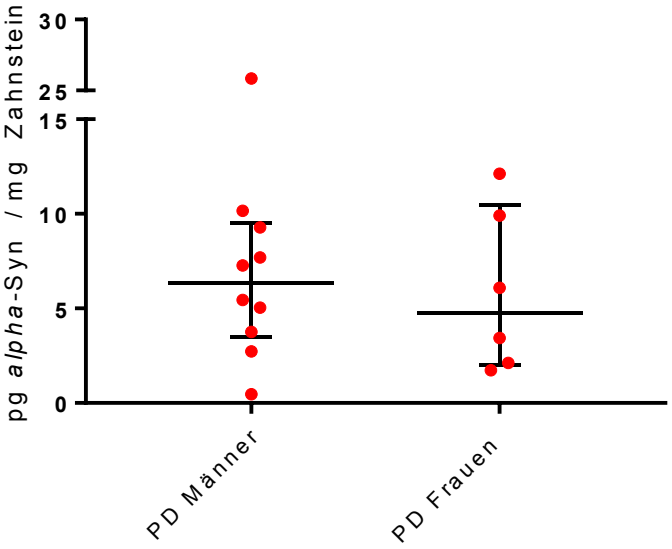


Abbildung 9: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht bei Parkinsonerkrankten mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht. Innerhalb der Fallkohorte waren n=10 männlich und n=6 weiblich. Der Median lag bei den Männern bei 6,36 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 3,5 und einem Quartil Q_3 von 9,5.

Bei den Frauen lag der Median bei 4,76 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,01 und einem Quartil Q_3 von 10,46.

Kontrollen

Innerhalb der Kontrollkohorte waren n=13 Probanden männlich und n=13 Probanden weiblich. Hier wiesen die Männer im Mittel eine α-SYN-Konzentration von 10,23 ± 18,94 pg α-SYN/mg Zahnstein auf. Der Median betrug 3,22 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,44 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 9,4 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Die Frauen hatten im Mittel eine α-SYN-Konzentration von 12,39 ± 8,11 pg α-SYN/mg Zahnstein. Hier betrug der Median 12,29 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 5,62 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 17,93 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.10).

Das Signifikanzniveau (Mann-Whitney-U-Test) für eine Abhängigkeit zwischen Geschlecht und α-SYN- Konzentration betrug bei den Kontrollen p=0,0908.

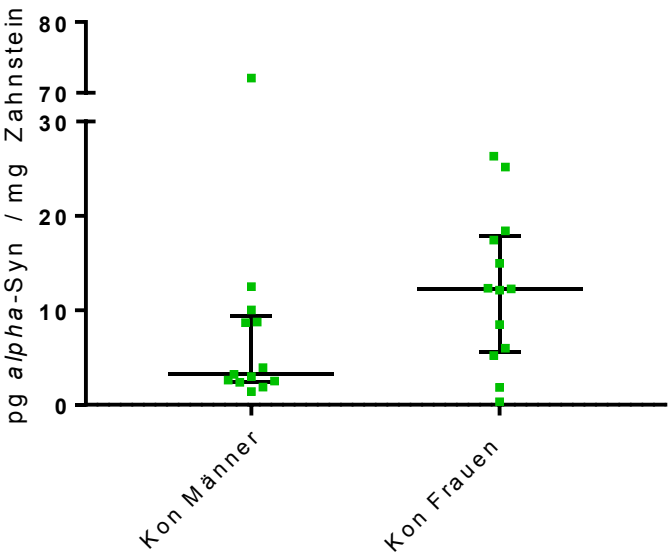


Abbildung 10: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht bei Kontrollen mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht. Innerhalb der Kontrollkohorte waren n=13 männlich und n=13 weiblich. Der Median lag bei den Männern bei 3,22 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,44 und einem Quartil Q_3 von 9,4.

Bei den Frauen lag der Median bei 12,29 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 5,62 und einem Quartil Q_3 von 17,93.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Diabetes

Innerhalb der Fallgruppe gaben n=5 an, an Diabetes zu leiden. In der Kontrollkohorte war es nur ein Proband (n=1).

Alle Zahnsteinproben von Probanden mit Diabetes wurden aufgrund zu hoher Hämoglobinwerte von der Untersuchung ausgeschlossen.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und dem Subtyp der Erkrankung: akinetisch-rigider Typ vs. tremordominanter Typ vs. Äquivalenztyp

Innerhalb der Gruppe der Parkinsonerkrankten (n=16) wiesen n=5 den akinetisch-rigiden Typ des M. Parkinson auf. Im Mittel hatten sie eine α-SYN-Konzentration von 6,32 ± 3,85 pg α-SYN/mg Zahnstein. Der Median lag bei 7,69 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,23 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 9,72 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Fünf Erkrankte (n=5) waren an dem tremordominanten Typ des M. Parkinson erkrankt. Sie wiesen im Durchschnitt eine α-SYN-Konzentration von 10,11 ± 9,23 pg α-SYN/mg Zahnstein. Der Median lag bei 7,27 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 3,78 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 17,87 pg α-SYN/mg Zahnstein.

Sechs Erkrankte (n=6) litten am Äquivalenztyp. Ihre Zahnsteinproben enthielten im Mittel eine α-SYN-Konzentration von 5,15 ± 3,9 pg α-SYN/mg Zahnstein. Der Median lag hier bei 4,4 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,69 pg α-SYN/mg Zahnstein und einem Quartil Q_3 von 7,59 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.11).

Die Auswertung des Signifikanzniveaus des Kruskal-Wallis-Tests zwischen Art der Parkinsonerkrankung und Menge des gemessenen α-SYN im Zahnstein betrug p=0,6420. Somit zeigte sich keine signifikante Korrelation.

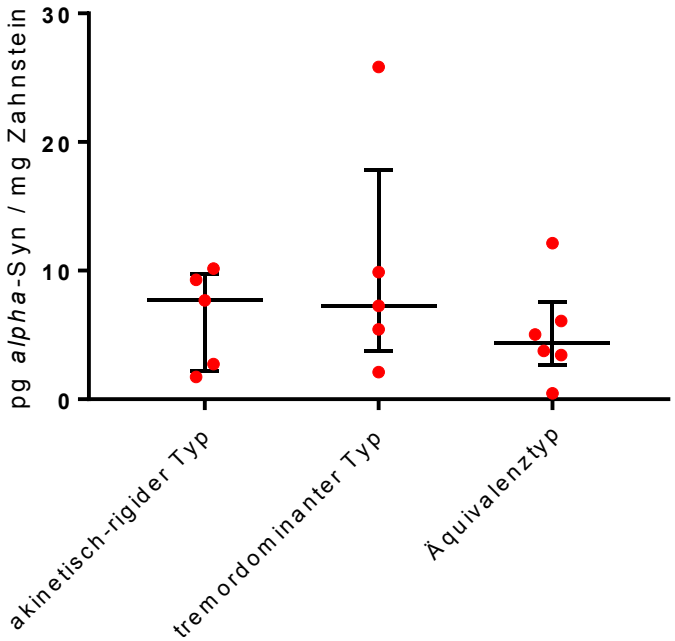


Abbildung 11: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein der Subtypen des M. Parkinson mit Median und Interquartil-Bereich (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und den Subtypen.

Die Parkinsonerkrankten mit akinetisch-rigidem M. Parkinson (n=5) wiesen einen Median von 7,69 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem Quartil Q_1 von 2,23 und einem Quartil Q_3 von 9,72 auf. Die fünf Erkrankte (n=5) mit tremordominantem Typ wiesen einen Median von 7,27 pg α-SYN/mg Zahnstein auf wobei Quartil Q_1 bei 3,78 und Quartil Q_3 bei 17,87 lag. Der Median bei den Erkrankten mit Äquivalenztyp (n=6) betrug 4,4 pg α-SYN/mg Zahnstein mit einem *Quartil Q_1 von 2,69 und einem Quartil Q_3 von 7,59.*

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Lebensalter

Parkinsonerkrankte

Die Erkrankten (n=16) hatten im Durchschnitt ein Alter von 65,68 ± 9,07 Jahren und eine mediane α-SYN-Konzentration von 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.12). Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient lag hier bei r_s= -0,1211 (p= 0,653). Es konnte somit keine signifikante Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Lebensalter gezeigt werden.

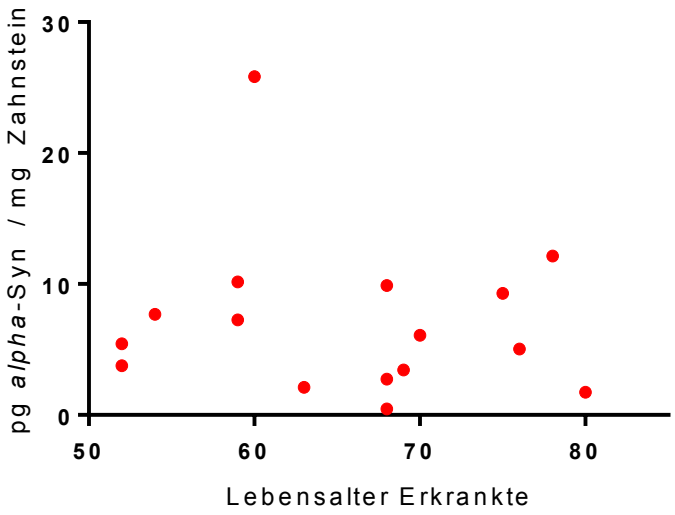


Abbildung 12: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Lebensalter der Parkinsonerkrankten (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und dem Lebensalter. Die Parkinsonerkrankten waren im Durchschnitt 65,68 ± 9,07 Jahre alt und wiesen eine mediane α-SYN-Konzentration von 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein auf.

Kontrollen

Die Kontrollen (n=26) waren im Durchschnitt 67,73 ± 14,7 Jahren alt und wiesen eine mediane α-SYN-Konzentration von 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein auf (Abb.13). Der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient lag bei $r_{s=}$= -0,3481 (p=0,0814). Somit zeigte sich hier keine signifikante Korrelation.

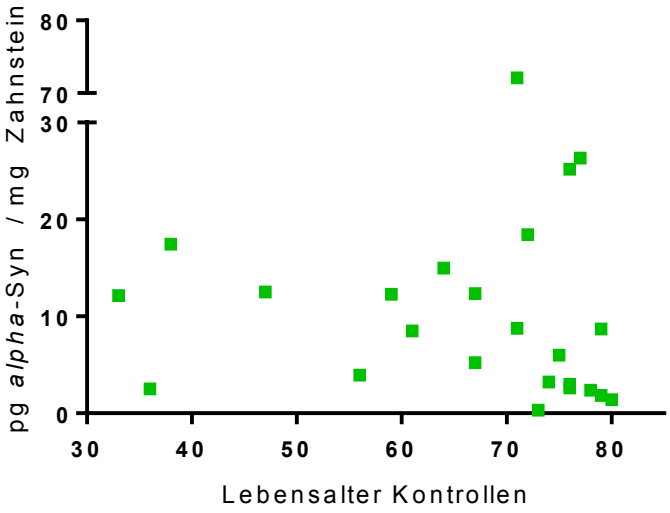


Abbildung 13: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Lebensalter bei den Kontrollen (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und dem Lebensalter. Die Kontrollprobanden waren im Durchschnitt 67,73 ± 14,7 Jahre alt und wiesen eine mediane α-SYN-Konzentration von 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein auf.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und der Speichelkonzentration

Beim Vergleich der α-SYN-Konzentration im Zahnstein mit der in einer anderen Studie, von denselben Probanden, entnommenen α-SYN-Konzentration im Speichel, musste innerhalb der Gruppe der Parkinsonerkrankten ein Proband infolge zu wenig auswertbarer Speichelprobe ausgeschlossen werden. Somit ergab die Fallgruppe hier n=15. Bei der Kontrollkohorte ergab sich aufgrund des Ausschlusses von zwei Probanden n=24.

Parkinsonerkrankte

Die Erkrankten (n=15) wiesen eine durchschnittliche α-SYN-Konzentration von 138,2 ± 4,3 pg α-SYN/ml Speichel auf. Der Median lag bei 33,91 pg α-SYN/ml Speichel mit einem Quartil Q_1 von 21,38 pg α-SYN/ml Speichel und einem Quartil Q_3 von 175,5 pg α-SYN/ml Speichel. Die mediane α-SYN-Konzentration im Zahnstein betrug bei diesen Probanden 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.14).

Hier lag der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient bei r_s= -0,1393 (p=0,6205). Somit zeigte sich keine signifikante Korrelation.

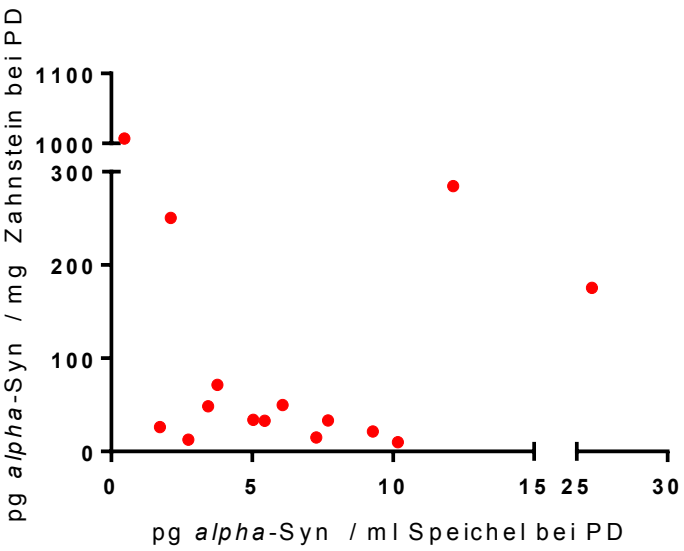


Abbildung 14: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel bei Parkinsonerkrankten (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)
Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel. Die Erkrankten wiesen eine mediane α-SYN-Konzentration von 33,91 pg α-SYN/ml Speichel auf (Quartil Q_1 21,38; Quartil Q_3 175,5) sowie eine mediane α-SYN-Konzentration von 5,76 pg α-SYN/mg Zahnstein (Quartil Q_1 2,91; Quartil Q_3 9,74).

Kontrollen

In der Kontrollkohorte (n=24) wiesen die Probanden eine durchschnittliche α-SYN-Konzentration von 121,43 ± 237,87 pg α-SYN/ml Speichel auf. Der Median lag bei 7,25 pg α-SYN/ml Speichel mit einem Quartil Q_1 von 2,54 pg α-SYN/ml Speichel und einem Quartil Q_3 von 12,48 pg α-SYN/ml Speichel.
Die mediane α-SYN-Konzentration im Zahnstein betrug bei diesen Probanden 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein (Abb.15).

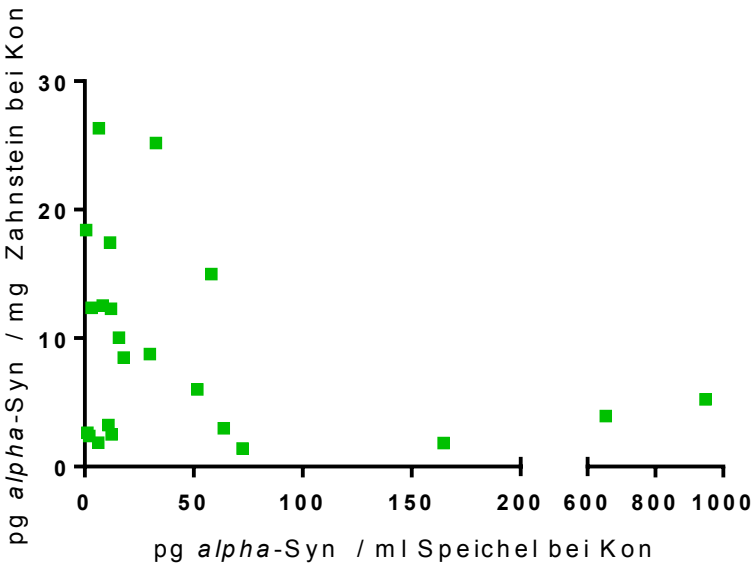


Abbildung 15: Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel bei Kontrollen (Universitäts- und Rehabilitationskliniken Ulm, März 2016)

Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel. Die Kontrollen wiesen eine mediane α-SYN-Konzentration von 7,25 pg α-SYN/ml Speichel auf (Quartil Q_1 2,54; Quartil Q_3 12,48), sowie eine mediane α-SYN-Konzentration von 8,6 pg α-SYN/mg Zahnstein (Quartil Q_1 2,6; Quartil Q_3 13,14).

Familiär gehäuftes Auftreten des M.Parkinson

Unter den Erkrankten (n=50) gaben n=12 an, bereits Fälle von M. Parkinson innerhalb der Familie gehabt zu haben oder zu haben. Davon waren bei n=6 mehr als ein (>1) Familienangehöriger an Parkinson erkrankt.

Anhand der weiteren abgefragten Punkte zur speziellen Anamnese (Stadium der Erkrankung, Medikamente, Benutzung von Kaugummi, Häufigkeit des Zähneputzens/Tag, Auftreten von Gingivitis, Trinkmenge/Tag) konnten keine Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen, und auch keine Auffälligkeiten hinsichtlich der α-SYN-Konzentration im Zahnstein, festgestellt werden.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde analysiert, ob die Bestimmung von α-SYN im Zahnstein ein geeigneter Marker für die prädiagnostische Untersuchung des M. Parkinson darstellt.

Auch wurde geprüft, ob die Ergebnisse der α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein eindeutiger sind als in flüssigen Medien wie beispielsweise dem Speichel oder der CSF.

Außerdem wurde mit Hilfe eines klinischen Riechtests ein möglicher Zusammenhang zwischen der α-SYN-Aggregation und der Beeinträchtigung des olfaktorischen Systems untersucht.

4.1 Alpha-Synuklein im Zahnstein

Primäre Untersuchung der Proben

Bei der primären Untersuchung im Rahmen dieser Studie wurde mit Hilfe eines ELISAs die α-SYN-Konzentration in den Zahnsteinproben bestimmt. Hierbei war der Median der α-SYN-Konzentration bei den Erkrankten etwas geringer als bei der Kontrollkohorte. Allerdings ergaben sich sehr große Streuungen der α-SYN-Werte innerhalb der Fall- und Kontrollkohorte. Durch einige Ausreißer resultierten sehr starke Überlagerungen der Höhe der Messwerte zwischen den Gruppen. Dies äußerte sich bei beiden Kohorten in hohen Standardabweichungen – vor allem innerhalb der Kontrollgruppe waren diese enorm.

Somit konnte mit dem Ergebnis der primären Untersuchung der Proben kein eindeutiger diagnostischer Grenzwert zwischen Erkrankten und Kontrollen bestimmt werden - welcher für die Prädiagnostik unabdingbar ist.

Rolle der Verunreinigungen durch Hämoglobin – Frage der Blutbeimengungen

Aufgrund des Verdachtes, dass einige Proben mit Blut und somit Hb verunreinigt waren, wurden die Zahnsteinproben einer Hämoglobinmessung unterzogen.

Hierbei ergab sich ein Hämoglobingrenzwert von 4000 ng/ml: Es konnte beobachtet werden, dass die α-SYN-Konzentrationen ab einer Hämoglobinkonzentration von 4000 ng/ml deutlich anstiegen. Daraus konnte ein Grenzwert abgeleitet werden unterhalb dessen keine Verfälschung der Ergebnisse durch Hb angenommen wurde.

Nach Ausschluss aller Proben mit einer Hämoglobinkonzentration > 4000 ng/ml ergaben sich deutlichere Ergebnisse: Die Mediane der α-SYN-Konzentrationen beider Kohorten lagen deutlich weiter auseinander als bei der primären Untersuchung der Proben. Auch nahmen die Standardabweichungen innerhalb beider Kohorten, im Vergleich zur primären Untersuchung, deutlich ab.
Somit zeigte sich nach Ausschluss der durch Hb verunreinigten Proben eine deutlichere Tendenz, dass die α-SYN-Konzentration im Zahnstein bei Parkinsonpatienten erniedrigt ist.

In der Literatur sind ähnliche Ergebnisse bei Untersuchungen der CSF vorzufinden: Es wurde beschrieben, dass Erkrankte im Mittel geringere α-SYN-Konzentrationen aufwiesen. Jedoch gab es auch hier eine, nicht unwesentliche, Streuung der Messwerte innerhalb beider Kohorten (Kang et al., 2016a).
Auch Studien, welche die α-SYN-Konzentrationen in anderen flüssigen Medien wie Blut und Speichel untersucht haben, kamen zu ähnlichen Ergebnissen: Hier lag ebenfalls eine Tendenz vor, dass Parkinsonerkrankte geringere Werte an α-SYN aufwiesen. Es ergaben sich, wie bei der Zahnsteinuntersuchung, starke Streuungen innerhalb der Gruppen (Shi et al., 2010; Devic et al., 2011; Al-Nimer et al., 2014).
In der Literatur wird allerdings auch von CSF- und Speichel-Untersuchungen berichtet, welche keine Unterschiede der α-SYN-Konzentrationen zwischen Erkrankten und Kontrollen feststellen konnten (Borghi et al., 2000; Parnetti et al., 2016). Allerdings ist hier zu erwähnen, dass bei diesen Ergebnissen keinerlei Untersuchungen auf Blutverunreinigungen durchgeführt wurden.

Es ist bekannt, dass im Blut große Mengen an α-SYN vorzufinden sind. Somit ist die Untersuchung des jeweiligen Mediums auf mögliche Hämoglobinverunreinigung entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse.
Die Ergebnisse der hier durchgeführten Studie zeigen auf, dass bei symptomatischen Patienten mit M. Parkinson, auch im Zahnstein, die mediane α-SYN-Konzentration erniedrigt ist. Allerdings sind die technisch unvermeidlichen Hämoglobinverunreinigungen ein zu berücksichtigender Faktor: Blutverunreinigungen führen durch die damit bedingte Hämolyse zu stark erhöhten Synukleinspiegeln (Wang et al., 2015).

Aus diesem Grund sollte bei jeglicher Untersuchung von α-SYN darauf geachtet werden, iatrogene Blutungen zu vermeiden. Auch sollten die Proben anschließend stets auf Hämoglobinverunreinigung untersucht werden – selbst wenn makroskopisch keine Anzeichen für die Notwendigkeit einer solchen Untersuchung gegeben sind.

Bei der hier durchgeführten Zahnsteinuntersuchung konnte gezeigt werden, dass Parkinsonerkrankte im Median niedrigere α-SYN-Konzentrationen aufweisen. Allerdings überlappen sich die Bereiche der Messwerte häufig - auch nach Ausschluss der durch Hb verunreinigten Proben.
Dadurch kann, auch unter Berücksichtigung der Hämoglobinverunreinigungen, kein eindeutiger diagnostischer Grenzwert der α-SYN-Konzentrationen zwischen Erkrankten und Kontrollen festgelegt werden.

Welche möglichen Störgrößen könnten ursächlich für diese Streuungen der Messwerte innerhalb der Kohorten sein, welche es nicht möglich machen, einen Grenzwert zwischen Erkrankten und Kontrollen zu definieren? Was könnten Ursachen für die erniedrigte mediane α-SYN-Konzentration bei den Erkrankten sein?

a. Normales- vs. fehlgefaltetes α-SYN

Es ist bekannt, dass missgefaltete α-SYN-Aggregate für die Pathologie des M. Parkinson verantwortlich sind. Allerdings besitzt jeder Mensch α-SYN – wobei die physiologische Funktion des korrekt gefalteten Proteins weiterhin nicht vollständig geklärt ist (Butler et al., 2016). Das nahezu ungefaltete und hoch lösliche Protein α-SYN ist vor allem an der Präsynapse lokalisiert (Clayton und George, 1998). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass es möglicherweise an der Regulation der normalen Zellfunktion, durch Interaktionen mit Bindungsproteinen, beteiligt sein könnte. Außerdem wird angenommen, dass es bei der Freisetzung von Neurotransmittern und dem Vesikeltransport eine Rolle spielt (Cooper et al., 2006; Ben Gedalya et al., 2009; Lee et al., 2011). Es wurde gezeigt, dass α-SYN bis zu 1% der Gesamtproteinmenge im neuronalen Zytosol ausmacht (Stefanis, 2012). Somit besitzt jeder Mensch, physiologisch, eine nicht zu unterschätzende Menge an α-SYN.

Ein ELISA ist ein immunologisches Verfahren zur Quantifizierung bestimmter Proteine im gelösten Zustand.
Der ELISA, welcher für die Untersuchungen der Zahnsteinproben verwendet wurde, misst α-SYN.
Dieses liegt bei gesunden Probanden ungefaltet vor (α-SYN). Bei Parkinsonerkrankten ist es unlöslich aggregiert oder liegt als dessen Vorstufe in Form von löslichen, aggregierten Oligomeren vor (o-α-SYN).

Oligomere
Oligomere stellen, wie bereits erwähnt, die Vorstufe des fibrillären, unlöslichen α-SYN in den LB dar. In der Literatur gibt es Hinweise, dass möglicherweise die nicht-fibrillären Oligomere die ursächliche, toxische Spezies des M. Parkinson darstellen (Goldberg und Lansbury, 2000; Masliah et al., 2000).

Bei der durchgeführten Zahnsteinuntersuchung traten starke Streuungen der Messwerte innerhalb beider Kohorten auf.
Es ist anzunehmen, dass der ELISA physiologisches α-SYN nicht von pathologischen α-SYN-Oligomeren, welche ebenfalls löslich sind, unterscheiden kann - was zu hohen Standardabweichungen und Überlagerungen der Messwerte führt.
Somit tragen sowohl physiologisches α-SYN als auch pathologisch aggregierte Oligomere zu erhöhten Konzentrationen bei.
Dies könnte die Ursache sein, dass kein α-SYN-Grenzwert zwischen beiden Kohorten definiert werden kann.

In der Literatur wurde auch beschrieben, dass zwei- oder dreiwertige Metallionen wie Quecksilber, Aluminium, Eisen, Kupfer, Kobald und Mangan die Bildung von o-α-SYN beschleunigen (Uversky et al., 2001). Diese Metalle sind oft Bestandteile zahnärztlicher Restaurationen. Alltägliche Einflüsse, wie beispielsweise die Mastikation, führen zu Abrasion, Attrition und Erosion und verursachen eine Freisetzung minimaler Bestandteile des Zahnersatzes (Shellis und Addy, 2014).
Zahnärztliche Restaurationen könnten durch dieses minimale Herauslösen von Metallionen dazu beitragen, dass sich in der Mundhöhle vermehrt aus physiologischem Synuklein die oligomere Form (o-α-SYN) entwickelt. Auch

werden allgemein beim Vorhandensein eines galvanischen Elements – also wenn zahnärztliche Restaurationen unterschiedlichen Materials in direktem Kontakt zueinander stehen, vermehrt Ionen aus den Restaurationen in die Mundhöhle abgegeben (Williamson, 1996; Sutow et al., 2004; Procházková et al., 2006; Sutow et al., 2008).
Dadurch wären bei Probanden mit multiplen zahnärztlichen Restaurationen erhöhte o-α-SYN-Werte im Zahnstein nachweisbar – obwohl diese nicht auf systemische pathologische Prozesse des Körpers, sondern vielmehr auf lokale Vorgänge im Mundraum, zurückzuführen wären.
Diese erhöhten o-α-SYN-Werte hätten Auswirkungen auf die quantitative Menge an physiologischem α-SYN. Auch würden die Ergebnisse innerhalb beider Kohorten verfälscht werden.
Durch das Erheben eines zahnärztlichen Befundes könnte man diese potentielle Fehlerquelle in die Interpretation der Ergebnisse mit einbeziehen.

Median bei Erkrankten erniedrigt
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen erniedrigte mediane α-SYN-Werte bei den Erkrankten an: Es ist anzunehmen, dass der ELISA vor allem das lösliche α-SYN misst. Die aggregierte Form des α-SYN ist unlöslich und somit für den ELISA nicht zu detektieren. Durch die Faltung und anschließende Aggregation von physiologischem α-SYN resultiert bei den Erkrankten eine quantitativ geringere Menge an α-SYN. Dies führt bei der Messung zu einer geringeren medianen Konzentration an physiologischem α-SYN innerhalb der Fallkohorte.
Die ungewöhnlich hohen einzelnen Konzentrationen innerhalb der Fallkohorte könnten dadurch bedingt sein, dass diese Probanden große Mengen an aggregierten, aber löslichen α-SYN-Oligomeren aufwiesen, welche ebenfalls vom ELISA detektiert wurden.

<u>b. Limitationen des ELISAs</u>
Die α-SYN-Konzentrationen dieser Studie, welche mit dem ELISA Kit nachgewiesen wurden, lagen oft an dessen unterer Nachweisgrenze von 5 pg/ml α-SYN. Möglicherweise ist der benutze ELISA nicht sensitiv genug um auch aussagekräftige Ergebnisse bei geringen α-SYN-Konzentrationen zu erzielen (Aydin, 2015). Dies könnte zu Ungenauigkeiten der Messergebnisse führen.

In der vorliegenden Studie konnten, aufgrund von Einschränkungen des ELISA Kits, nicht alle Proben in einem Lauf validiert und untersucht werden. Es wurden Gruppen von jeweils 40 Proben gebildet. Diese wurden nacheinander untersucht. Möglicherweise wurde so, unbeabsichtigt durch Abweichungen in der Validierung über die Standardkurven der verschiedenen Läufe, das Ergebnis verfälscht.

Generell lässt sich sagen, dass sich bei Untersuchungen von Proteinen häufig Schwierigkeiten ergeben: Die Empfindlichkeit der Untersuchungen sind für geringe Mengen an potentiellem Medium für einen Biomarker häufig ungenügend. Auch sind die Messungen oft schlecht reproduzierbar (Zhao et al., 2016).

Somit ist die α-SYN-Messung mithilfe eines ELISAs momentan eventuell noch nicht ausreichend ausgereift: Bei der Untersuchung von Zahnstein sind momentan noch keine optimalen Bedingungen geschaffen, dieses Medium mit Hilfe eines ELISAs für die Prädiagnostik des M. Parkinson zu nutzen.

c. Speicheldrüsen als Ursache?

Es gab bereits einige α-SYN-Untersuchung der Speicheldrüsen. Die Ergebnisse von Biopsien der Glandula submandibularis ergaben bei 90-100% der Erkrankten intraneuronal aggregiertes α-SYN – wohingegen dieses bei keinem der Kontrollprobanden nachgewiesen werden konnte (Del Tredici et al., 2010; Beach et al., 2013).

Warum also liefern diese Biopsien von Speicheldrüsen eindeutige Ergebnisse – die Zahnsteinuntersuchungen aber nicht?

Vielleicht lässt sich das Studienergebnis der durchgeführten Zahnsteinuntersuchung durch anatomische Ursachen erklären.

Hyposalivation

Die Ursache für das Studienergebnis könnte in einer Unter- oder Fehlfunktion der Speicheldrüsen liegen. Erkrankte weisen oft eine Hyposalivation auf, welche häufig infolge der Medikation im Rahmen der Therapie auftritt (Persson et al., 1992). Vor allem Levodopa, ein Medikament zur Substitution von Dopamin, hat erheblichen Einfluss auf die Speichelproduktion von Parkinsonerkrankten (Proulx et al., 2005). Diese Hyposalivation führt möglicherweise dazu, dass durch den

geringeren Speichelfluss auch quantitativ weniger α-SYN bzw. o-α-SYN in die Mundhöhle gelangt. Dies hätte Auswirkungen auf die Aussagekraft der gemessenen Konzentrationen.

Haftung an Nervenfasern

Wie bereits erwähnt wurden lediglich erhöhte Werte an aggregiertem α-SYN bei der Biopsie der großen Speicheldrüsen innerhalb der Fallkohorte festgestellt (Del Tredici et al., 2010; Beach et al., 2013). In jedem flüssigen Medium wie der CSF, Blut oder Speichel waren die Konzentrationen an α-SYN bei den Patienten im Mittel geringer oder gleich wie bei den Kontrollen.

Aggregiertes α-SYN befällt in Form von LB vor allem das PNS. Möglicherweise haften die unlöslichen, aggregierten α-SYN-Proteine fest an den befallenen Nervenfasern. Zahnstein, welcher aus Speichelbestandteilen besteht, würde somit aufgrund der Retention von aggregiertem α-SYN in den Speicheldrüsen auch keine höhere Konzentration an aggregiertem α-SYN aufweisen.

4.2 Riechtest

Der M. Parkinson schreitet in einer vorgegebenen Richtung voran. Er beginnt mit der frühen nicht-motorischen Manifestation, welche sich unter anderem in einer Hyposmie oder Anosmie äußert (Klingenhoefer und Reichmann, 2015). Zwischen 50-90% der Erkrankten leiden an Riechstörungen (Doty et al., 1988; Boesveldt et al., 2008). Beginnend im Bulbus olfactorius oder dem enterischen Nervensystem (ENS) schreitet die Pathologie in Form von α-SYN-Aggregaten über synaptische Zell-zu-Zell-Übertragungen in die Substantia nigra und das zentrale Nervensystem voran. Hierbei ist festzuhalten, dass sowohl der Riechkolben als auch das ENS mit der Umwelt in Verbindung stehen. Möglicherweise sind es Umweltfaktoren, welche die Pathogenese des M. Parkinson auslösen (Klingenhoefer und Reichmann, 2015).

In der vorliegenden Studie wurde ein klinischer Riechtest durchgeführt, um die Diagnose und den Einfluss der Erkrankung auf das olfaktorische System nochmals zu überprüfen.

Bei dem durchgeführten Snifflin' Sticks-Riechtest mit 12 Stiften ergab sich eine eindeutige Tendenz, dass viele Patienten eine deutliche Einschränkung in ihrem Riechvermögen aufweisen. Dieses Resultat untermauert die Ergebnisse bereits durchgeführter Studien.

Bei dem durchgeführten Riechtest schnitten vier von 16 Erkrankten, also 25%, im Vergleich zu den anderen Erkrankten außergewöhnlich gut ab. Dies deckt sich mit Angaben der Literatur welche angeben, dass zwischen 50-90% der Parkinsonpatienten an Riechstörungen leiden (Doty et al., 1988; Boesveldt et al., 2008).

Die Prüfung des Geruchssinns stellt somit eine gute unterstützende Methode der Parkinson-Diagnostik dar (Daum et al., 2000; Casjens et al., 2013).

4.3 Fragebogen

Korrelation zwischen Ergebnis Riechtest und Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung

Im Zuge des Fragebogens wurden die Patienten nach der Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung befragt.

Die Dauer der Erkrankung stand hierbei nicht in Korrelation mit dem Riechvermögen. Es lässt sich mit den Ergebnissen zwar die Hypothese aufstellen, dass der Geruchssinn zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Durchschnitt etwas besser ist als mit fortschreitender Krankheit - jedoch entwickelt sich der Verlust des Riechvermögens individuell unterschiedlich. Allerdings konnte mit dem Ergebnis des Riechtests aufgezeit werden, dass die Riechstörung oft ein frühes Symptom des M. Parkinson darstellt.

In Studien wurde untersucht, ob durch Training die Empfindlichkeit gegenüber Gerüchen bei Patienten verbessert werden kann. Hierbei wurde gezeigt, dass die Erkrankten, welche sich einem Riechtraining unterzogen, eine deutliche Steigerung der olfaktorischen Funktionen aufwiesen. Somit scheint Riechtraining die Geruchsempfindlichkeit bei Parkinsonpatienten erhöhen zu können (Haehner et al., 2013). Auch scheint ein gewisses Rehabilitationspotential vorhanden zu sein (Knudsen et al., 2015).

Möglicherweise erklärt dies auch die interindividuell unterschiedliche Entwicklung des Riechvermögens im Verlauf der Erkrankung. Durch individuell unterschiedliche Lebensumstände und Lebensverhältnisse setzen manche Patienten ihren Riechsinn intensiver und bewusster ein als andere.

Korrelation zwischen α-SYN-Konzentration und Jahre seit Diagnosestellung bei Parkinsonerkrankten

Die in der vorliegenden Studie erhobenen α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein standen in keinem Verhältnis zu den Jahren seit Diagnosestellung.

Hong et al zeigten auf, dass die Konzentration an α-SYN bei Patienten im Verlauf der Erkrankung sinkt. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde auch das Ausmaß der Blutkontamination mit einbezogen (Hong et al., 2010). Dieses Ergebnis scheint schlüssig: Durch fortschreitende Krankheit aggregieren immer

mehr α-SYN-Proteine was eine abnehmende Konzentration an physiologischem α-SYN zur Folge hat.
Momentan liegen keine weiteren Studien zur Korrelation von α-SYN mit der Dauer der Erkrankung vor.
Auf Grundlage dieser aktuellen Literaturlage kann die Hypothese aufgestellt werden, dass bei Erkrankten die Menge an pathologisch aggregiertem α-SYN mit steigendem Alter zunimmt, wohingegen die Konzentration an physiologischem α-SYN im Verlauf der Erkrankung sinkt.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Geschlecht

In der durchgeführten Studie wurde außerdem analysiert, ob die α-SYN-Konzentration intersexuelle Unterschiede aufweist.
An Parkinson erkrankte Männer wiesen eine etwas höhere mediane α-SYN-Konzentration auf - allerdings ist diese Tendenz durch hohe Standardabweichungen zu vernachlässigen.

Carcani et al. untersuchten die α-SYN-Konzentration im Plasma. Hierbei zeigte sich, dass an M. Parkinson erkrankte Männer geringere Werte aufwiesen als Frauen (Caranci et al., 2013).
Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Studie anhand von Zahnstein nicht bestätigt werden.
Die klinische Manifestation, und somit die Prognose der Erkrankung, scheint bei Männern und Frauen annähernd gleich abzulaufen (Dahodwala et al., 2016). Möglicherweise ist die höhere mediane α-SYN-Konzentration im Zahnstein bei Männern auf eine höhere Konzentration an o-α-SYN zurückzuführen.

Bei der Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und dem Geschlecht innerhalb der Kontrollkohorte wiesen die Männer eine deutlich geringere mediane α-SYN-Konzentration auf als die Frauen. Allerdings waren auch hier starke Streuungen der Werte vorhanden. Es ist anzunehmen, dass diese Tendenz durch die geringe Fallzahl bedingt ist.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Diabetes

Über 90% der Diabetiker leiden an Diabetes mellitus Typ 2 (Maleckas et al., 2015). Charakteristisch für diesen Typ des Diabetes sind eine chronische Hyperglykämie, sowie eine Insulinresistenz (Kaneto, 2015).

Innerhalb der Fallkohorte wiesen fünf Probanden Diabetes mellitus Typ 2 auf, innerhalb der Kontrollkohorte war ein Proband daran erkrankt.

Die statistische Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Diabetes konnte nicht durchgeführt werden: Alle Zahnsteinproben von Probanden mit Diabetes wurden aufgrund zu hoher Hämoglobinwerte von der Untersuchung ausgeschlossen.

Der Grund für diese generalisierte Blutkontamination bei Diabetikern könnte Parodontitis sein: Parodontitis, eine chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnfleisches, geht mit einem erhöhten Entzündungsgrad und somit einer höheren Blutungsneigung der Gingiva einher (Chaves et al., 1993).

Es ist bekannt, dass zwischen Diabetes und Parodontitis eine bidirektionale Beziehung besteht - die Erkrankung an einem der beiden steigert das Risiko, auch an der anderen Krankheit zu erkranken (Chee et al., 2013; Zhou et al., 2015). Somit wäre es denkbar, dass die an Diabetes erkrankten Probanden auch an Parodontitis leiden.

Rodriguez-Arauja et al. haben eine gewisse Korrelation zwischen Insulinresistenz, also Diabetes, und α-SYN-Aggregaten festgestellt: Eine niedrige Konzentration an α-SYN im Blutserum geht mit einer steigenden Insulinresistenz einher (Rodriguez-Araujo et al., 2015). Eine niedrige Konzentration an α-SYN geht vermutlich mit einer hohen Konzentration an aggregiertem α-SYN einher. Diese Beobachtungen könnten einen Zusammenhang zwischen Diabetes und M. Parkinson wiederspiegeln.

Studien deuten darauf hin, dass Parkinsonerkrankte mit Diabetes an ausgeprägteren und schwereren klinischen Symptomen leiden als Parkinsonerkrankte ohne Diabetes. Untersuchungen ergaben, dass sich Diabetes deutlich auf das Volumen der grauen Substanz auswirkt: Diabetes kann die Atrophie des Frontallappens sowie den Abbau kognitiver Funktionen verstärken.

Allerdings sind die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt (Petrou et al., 2016).
Angesichts der Tatsache, dass viele ältere Menschen an Diabetes erkranken ist es von Bedeutung, die genauen Auswirkungen des Diabetes auf den M. Parkinson zu klären.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und dem Subtyp der Erkrankung: akinetisch-rigider Typ vs. tremordominanter Typ vs. Äquivalenztyp

Die idiopathische Form des M. Parkinson kann, abhängig vom Muster der Symptomatik, in drei Subtypen unterteilt werden: den akinetisch-rigiden Typ, den tremordominanten Typ und den Äquivalenztyp.
Die korrekte Diagnosestellung des klinischen Subtyps ist für die Therapie von großer Bedeutung. Die Subtypen unterliegen vermutlich unterschiedlichen pathophysiologischen Prozessen. Diese Unterschiede haben möglicherweise unterschiedliche Reaktionen und Auswirkungen auf die Therapie (Solla et al., 2015).

Bei der Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Studie waren die α-SYN-Konzentrationen bei Erkrankten, welche am akinetisch-rigiden Typ bzw. am tremordominanten Typ erkrankt waren, annähernd gleich hoch.
Parkinsonerkrankte, welche am Äquivalenztyp erkrankt waren wiesen, im Vergleich zu den beiden anderen Typen, deutlich geringere mediane α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein auf.
In Anbetracht dieser Ergebnisse könnte somit die Hypothese aufgestellt werden, dass die erhöhten α-SYN-Werte beim akinetisch-rigiden Typ und tremordominanten Typ ein Zeichen für einen langsamer fortschreitenden M. Parkinson darstellt. Möglicherweise deuten die hohen α-SYN-Werte an, dass die pathologische Akkumulation, in Form von LB, noch nicht so weit fortgeschritten ist wie beim Äquivalenztyp.
Allerdings liegen hierfür in der Literatur noch keine Belege vor.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und Lebensalter

Altern stellt den stärksten Risikofaktor dar, an der idiopathischen Form des M. Parkinson zu erkranken (Reeve et al., 2014).

Untersuchungen des motorischen Cortex an Mäusen zeigten auf, dass die Menge an aggregiertem α-SYN mit steigendem Alter zunimmt – auch bei Mäusen welche nicht am M. Parkinson erkrankt waren (Takahashi et al., 2016).

Demgegenüber berichtet Yang et al. von Untersuchungen an nichtmenschlichen Primaten welche aufzeigten, dass die α-SYN-Konzentration im Gehirn im Laufe des Alters zunimmt (Yang et al., 2015). Außerdem stieg in Gehirnen von Affen die o-α-SYN-Konzentration mit dem Alter an (Chen et al., 2016).

Somit scheint es im Laufe des Lebens zu einer quantitativ höheren Menge an löslichem als auch unlöslichem α-SYN zu kommen – welche in einem gewissen Ausmaß als physiologisch angesehen werden können und nicht unmittelbar zur Entwicklung eines M. Parkinson führen.

Dies würde auch das mit dem Altern steigende Risiko, an M. Parkinson zu erkranken, erklären: Es ist denkbar, dass es individuell unterschiedliche Ausgangsalter für die Entwicklung erster α-SYN Aggregate gibt. Je früher sich solche α-SYN Aggregate bilden, desto wahrscheinlicher scheint die Entwicklung eines M. Parkinson im Laufe des weiteren Lebens.

Es stellt sich bei den Erkrankten die Frage, wie sich der Verlauf des M. Parkinson und die α-SYN-Konzentration im Laufe des Alterns verhält.

Untersuchungen an Patienten in verschiedenen Altersklassen haben aufgezeigt, dass die Symptome zwischen den verschiedenen Altersgruppen ähnlich sind – allerdings steigt die Schwere der Symptomatik mit steigendem Lebensalter (Pagano et al., 2016).

In der vorliegenden Studie wurde die Korrelation zwischen α-SYN-Konzentration im Zahnstein und dem Lebensalter untersucht: Innerhalb beider Kohorten bestand kein Zusammenhang zwischen der α-SYN-Konzentration und dem Lebensalter.

Nach aktuellem Stand der Literatur kann jedoch angenommen werden, dass sich die α-SYN-Konzentration, abhängig vom Alter, verändert – auch wenn dies im Rahmen der Zahnsteinuntersuchung nicht belegt werden konnte.

Die hier durchgeführte Studie hat aufgezeigt, dass das Verhältnis der α-SYN-Konzentration im Zahnstein zum Lebensalter bei den Erkrankten individuell verschieden ist. Dies ist vermutlich auf das unterschiedliche Ausgangsalter zu Beginn der Krankheit und somit die bisherige Gesamtdauer der Erkrankung zurückzuführen. Möglicherweise würden regelmäßige Kontrolluntersuchungen und –messungen der α-SYN-Konzentration im Zahnstein eine deutlichere Tendenz aufzeigen, wie sich der Wert im Laufe der Erkrankung entwickelt.

Korrelation zwischen der α-SYN-Konzentration und der Speichelkonzentration

In der hier durchgeführten Studie wurde von den Probanden außerdem eine Speichelprobe entnommen. Die Auswertung dieser Speichelproben auf α-SYN war Bestandteil einer anderen Studie. Trotzdem standen die Ergebnisse für eine Korrelation mit den Ergebnissen der Zahnsteinuntersuchung zur Verfügung.

Bei der Korrelation der α-SYN-Konzentration im Zahnstein und im Speichel zeigte sich sowohl innerhalb der Fall- als auch der Kontrollgruppe keine nennenswerte Beziehung.

Die mediane α-SYN-Konzentration war in den Speichelproben der Kontrollen niedriger - allerdings gab es hier enorme Standardabweichungen. Somit lag eine Tendenz vor, dass die α-SYN-Konzentration im Speichel bei Erkrankten höher ist als bei den Kontrollen.

Andere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass die Konzentration von α-SYN im Speichel bei Parkinsonerkrankten geringer ist als bei den Kontrollen (Devic et al., 2011; Al-Nimer et al., 2014). In wieder anderen Studien gab es keine Unterschiede der α-SYN-Konzentration zwischen beiden Kohorten (Kang et al., 2016b). Demgegenüber stehen Untersuchungen bei denen erhöhte o-α-SYN-Konzentration im Speichel von Erkrankten gemessen werden konnten.

Es ist anzunehmen, dass die Konzentration an löslichem, physiologischem α-SYN bei Erkrankten abnimmt indem sich diese Monomere zu unlöslichen LB und löslichen Oligomeren umwandeln (Vivacqua et al., 2016).

Die Studienlage ist auch beim Speichel nicht eindeutig. Möglicherweise wird durch die interindividuell sehr unterschiedliche Speichelfließrate die Konzentration an α-SYN im Speichel beeinflusst was große Streuungen bedingt.

Familiär gehäuftes Auftreten des M. Parkinson

15% der Krankheitsfälle rechnet man familiären Formen zu (McDonnell et al., 2006). Zum heutigen Zeitpunkt sind drei Punktmutationen innerhalb des α-SYN-Gens bekannt, welche für die familiäre Form des M. Parkinsons verantwortlich gemacht werden (A30P (Plaas et al., 2008), E46K (Zarranz et al., 2004), A53T (Polymeropoulos et al., 1997).

Es gibt Studien welche darauf hindeuten, dass diese mutierten Gentranskripte die Aggregation von α-SYN fördern (Conway et al., 1998; Narhi et al., 1999).

In der durchgeführten Studie gaben 12 von 50 Erkrankten an, weitere Fälle von M. Parkinson in der Familie zu haben. Bei sechs Erkrankten litt mehr als ein Verwandter an dieser Krankheit.

Somit gaben in der vorliegenden Untersuchung 24% der Patienten an, dass Parkinson in ihrer Familie gehäuft vorkommt.

Dieses Ergebnis ist im Vergleich zu Angaben der Literatur sehr hoch. Bei einigen dieser Probanden ist es möglicherweise Zufall, dass es weitere Parkinsonerkrankte in ihrer Familie gab bzw. gibt.

Zudem basieren diese Angaben ausschließlich auf den Aussagen der Probanden. Die Richtigkeit wurde nicht überprüft. Möglicherweise litten manche Verwandte an anderen Krankheiten - welche sich in ähnlichen klinischen Symptomen geäußert haben. Beispielsweise treten bei anderen Synukleinopathien, wie der Multisystematrophie oder der Lewy-Körper-Demenz, ähnliche klinische Symptome auf (Barker und Williams-Gray, 2016).

Auch ein sekundärer Parkinsonismus ähnelt in seiner Symptomatik dem M. Parkinson. Unter einem sekundären Parkinsonsimus versteht man den Verlust dopaminerger Neurone infolge verschiedener Auslöser: Beispielsweise können bestimmte Medikamente, wie Antipsychotika oder Calciumantagonisten, solche Symptomen herbeiführen (Bohlega und Al-Foghom, 2013; Fogel et al., 2014). Auch sind Fälle beschrieben, in denen Hirntumore oder Mumps parkinsonähnlichen Symptome zur Folge haben können (García de Y'ebenes et al., 1982; Abbas et al., 2015).

Allerdings scheint es belegt, dass ein nicht zu unterschätzender Prozentsatz der Parkinsonpatienten an einer familiären Form des M. Parkinson leiden.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit auf, dass die Untersuchung von α-SYN im Zahnstein mithilfe eines ELISAs momentan noch keine geeignete Methode zur Prädiagnostik des M. Parkinson darstellt. Aufgrund von Hämoglobinverunreinigungen der Proben, sowie möglicherweise ungenügender Sensitivität des ELISAs, kommt es zu hohen Standardabweichungen. Dadurch lässt sich kein exakter Grenzwert zwischen Erkrankten und Kontrollen festlegen.

Untersuchungen deuten darauf hin, dass die nicht-fibrillären, löslichen Oligomere die toxische Spezies des M. Parkinson darstellen (Goldberg und Lansbury, 2000; Masliah et al., 2000). Möglicherweise sollte in Zukunft das Augenmerk mehr auf sie gerichtet werden. Es sollten Methoden entwickelt werden, welche α-SYN-Oligomere von physiologischem α-SYN unterscheiden können.

Auch wären Verfahren hilfreich, welche es möglich machen würden, patholgische α-SYN-Aggregate aus dem Zahnstein zu lösen und quantitativ zu messen.
Ein Ansatz hierfür ist möglicherweise die SDS-PAGE: Dies ist ein Verfahren, welches Stoffgemische anhand ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld auftrennt und durch ihre atomare Masse ordnet. Bedingung hierfür ist, dass die ungefähre kDa-Zahl des gesuchten Proteins, also des aggregierten α-SYN, bekannt ist.
Mit Hilfe von Antikörpern kann anhand der gemessenen Lichtintensität die quantitative Menge an aggregiertem unlöslichen α-SYN bestimmt werden.

5 Zusammenfassung

Der Morbus Parkinson (M. Parkinson) ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. Ihm liegt eine Degeneration dopaminerger Neurone zugrunde, die zu einer akinetisch-rigiden Bewegungsstörung mit Tremor und posturaler Instabilität führt.

Aufgrund der demographischen Entwicklung wird die Relevanz dieser Erkrankung für das Gesundheitssystem voraussichtlich weiter zunehmen.

Für die Therapie des M. Parkinson gibt es gegenwärtig noch keinen kausalen Ansatz. Momentan kann die Krankheit nur symptomatisch behandelt werden. Auch erweist sich die Diagnosestellung in frühen Stadien der Erkrankung oft schwierig. Somit ist es besonders wichtig Möglichkeiten für eine frühe Diagnosestellung zu entwickeln um frühzeitig symptomatisch, und vielleicht in der Zukunft kausal, therapieren zu können.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mittels der alpha-Synuklein (α-SYN) Untersuchung im Zahnstein einen aussagekräftigen und stabilen Biomarker für den M. Parkinson zu finden, mit dessen Hilfe ein einfaches, minimalinvasives und großflächiges prädiagnostischen Screening möglich ist. Außerdem wurde ein Riechtest durchgeführt um die Hyposmie bzw. Anosmie, welche bei 50-90% der Erkrankten auftritt, aufzuzeigen.

Zu Beginn der Studie wurden Zahnsteinproben von Patienten und Kontrollprobanden entnommen. Außerdem wurde bei beiden Kohorten ein Snifflin' Sticks-Riechtest mit 12 Stiften durchgeführt (burghart Messtechnik, Wedel, Deutschland), sowie ein Fragebogen ausgefüllt. Die Proben wurden mittels des SensoLyte™ Anti-alpha-Synuclein Quantitative ELISA Kit (Human/Mouse/Rat) (AnaSpec, Fremont, California, USA) untersucht. Es zeigte sich, dass die mediane α-SYN-Konzentration bei Erkrankten niedriger ist als bei gesunden Probanden. Allerdings gab es hohe Standardabweichungen und Überlappungen der Messbereiche – wodurch kein diagnostischer Grenzwert zwischen Erkrankten und Kontrollen definiert werden konnte.

Aufgrund des Verdachtes, dass einige Ergebnisse der Zahnsteinproben durch Hämoglobin (Hb) verfälscht wurden, erfolgte die Untersuchung der Proben mithilfe des Human Hemoglobin ELISA Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA).

Nach Ausschluss der durch Hb verunreinigten Proben waren die Ergebnisse der medianen α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein deutlicher als bei der primären

Untersuchung: Die mediane α-SYN-Konzentration war bei der Fallkohorte geringer als bei den Kontrollen – allerdings überlappten sich die Bereiche der Messwerte auch nach Ausschluss der durch Hb verunreinigten Proben.
Dies deckt sich mit den Ergebnissen der Literatur zu α-SYN-Untersuchungen von Liquor, Blut und Speichel: Auch sie zeigten erniedrigte α-SYN-Konzentrationen bei Erkrankten und auch hier traten große Streuungen und Überlappungen der Werte innerhalb beider Gruppen auf.

Die Untersuchung von α-SYN im Zahnstein erweist sich momentan nicht als aussagekräftiger und zuverlässiger Biomarker für die Prädiagnostik des M. Parkinson. Durch große Überlagerungen der Messwerte lässt sich, auch nach Ausschluss der durch Hb verunreinigten Proben, kein diagnostischer Grenzwert zwischen Kontrollen und Erkrankten festlegen – welcher für die Prädiagnostik unabdingbar ist. Jedoch lässt sich sagen, dass jede hohe α-SYN-Konzentration auf eine mögliche Hämoglobinverunreinigung untersucht werden sollte.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Riechtest ein zuverlässiges Mittel zur Diagnosesicherung des M. Parkinson darstellt.

Möglicherweise können in Zukunft, durch Ausschaltung potenzieller Fehlerquellen, sowie Weiterentwicklung der ELISAs, bessere und eindeutigere Ergebnisse bei der Untersuchung von α-SYN im Zahnstein erzielt werden. Mit den momentan zur Verfügung stehenden ELISAs und Messmethoden ist der Zahnstein nicht dazu geeignet das in ihm enthaltene α-SYN im Rahmen der Prädiagnostik nutzen zu können.

Stattdessen sollte das Augenmerk mehr auf das unlösliche, aggregierte α-SYN gerichtet werden. Außerdem sollten Methoden entwickelt werden, welche α-SYN-Oligomere von physiologischem α-SYN unterscheiden können.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbas M M, Basu P, Reginald V, Kumar R H, Muthane U B: Secondary parkinsonism with Mumps infection. Parkinsonism Relat. Disord., 21: 1288-1289 (2015)

2. Adler C H, Dugger B N, Hentz J G, Hinni M L, Lott D G, Driver-Dunckley E, Mehta S, Serrano G, Sue L I, Duffy A, Intorcia A, Filon J, Pullen J, Walker D G, Beach T G: Peripheral Synucleinopathy in Early Parkinson's Disease: Submandibular Gland Needle Biopsy Findings. Mov. Disord., 31: 250-256 (2016)

3. Al-Nimer M S, Mshatat S F, Abdulla H I: Saliva α-Synuclein and A High Extinction Coefficient Protein: A Novel Approach in Assessment Biomarkers of Parkinson's Disease. N Am J Med Sci, 6: 633-637 (2014)

4. Arkadir D, Bergman H, Fahn S: Redundant dopaminergic activity may enable compensatory axonal sprouting in Parkinson disease. Neurology, 82: 1093-1098 (2015)

5. Aydin S: A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. Peptides, 72: 4-15 (2015)

6. Barker R A, Williams-Gray C H: Review: The spectrum of clinical features seen with alpha synuclein pathology. Neuropathol. Appl. Neurobiol., 42: 6-19 (2016)

7. Beach T G, Adler C H, Dugger B N, Serrano G, Hidalgo J, Henry-Watson J, Shill H A, Sue L I, Sabbagh M N, Akiyama H: Submandibular gland needle biopsy for the diagnosis of Parkinson disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol., 72: 130-136 (2013)

8. Beach T G, Adler C H, Sue L I, Vedders L, Lue L, White Lii C L, Akiyama H, Caviness J H, Shill H A, Sabbagh M N, Walker D G, Arizona Parkinson's

Disease Consortium.: Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. Acta Neuropathol., 119: 689-702 (2010)

9. Becker G, Müller A, Braune S, Büttner T, Benecke R, Greulich W, Klein W, Mark G, Rieke J, Tümmler R: Early diagnosis of Parkinson's disease. J. Neurol., 249: 40-48 (2002)

10. Ben Gedalya T, Loeb V, Israeli E, Altschüler Y, Selke D J, Sharon R: Alpha-synuclein and polyunsaturated fatty acids promote clathrin-mediated endocytosis and synaptic vesicle recycling. Traffic, 10: 218-234 (2009)

11. Bertrand J A, McIntosh R, Postuma R B, Kovacevic N, Latreille V, Panisset M, Chouinard S, Gagnon J F: Brain connectivity alterations are associated with dementia in Parkinson's disease. Brain Connect, 6: 216-224 (2015)

12. Boesveldt S, Verbaan D, Knol D L, Visser M, van Rooden S M, van Hilten J J, Berendse H W: A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease. Mov. Disord., 23: 1984-1990 (2008)

13. Bohlega S A, Al-Foghom N B: Drug-induced Parkinson`s disease. A clinical review. Neurosciences (Riyadh), 18: 215-221 (2013)

14. Borghi R, Marchese R, Negro A, Marinelli L, Forloni G, Zaccheo D, Abbruzzese G, Tabaton M: Full length alpha-synuclein is present in cerebrospinal fluid from Parkinson's disease and nor mal subjects. Neurosci. Lett., 287: 65-67 (2000)

15. Braak H, de Vos R A, Bohl J, Del Tredici K: Gastric alpha-synuclein immunoreactive inclusions in Meissner's and Auerbach's plexus in cases staged for Parkinson's disease-related brain pathology. Neurosci. Lett., 396: 67-72 (2006)

16. Braak H, Del Tredici K: Pathology in Olfactory Structures. Neuroanatomy and Pathology of Sporadic Parkinsons's Disease, 1, Springer, S. 20-21 (2009)

17. Braak H, Ghebremedhin E, Rüb U, Bratzke H, Del Tredici K: Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. Cell Tissue Res., 318: 121-127 (2004)

18. Burn D J, Less A J: Progressive supranuclear palsy: where are we now? Lancet Neurol, 1: 359-369 (2002)

19. Butler B, Sambo D, Khoshbouei H: Alpha-synuclein modulates dopamine neurotransmission. J. Chem. Neuroanat. (2016), http://dx.doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.06.001, 07.06.2016

20. Caranci G, Piscopo P, Rivabene R, Traficante A, Riozzi B, Castellano A E, Ruggieri S, Vanacore N, Confaloni A:Gender differences in Parkinson's disease: focus on plasma α-synuclein. J Neural Transm (Vienna), 120: 1209-1215 (2013)

21. Casjens S, Eckert A, Woitalla D, Ellrichmann G, Turewicz M, Stephan C, Eisenacher M, May C, Meyer H E, Brüning T, Pesch B: Diagnostic value of the impairment of olfaction in Parkinson's disease. PLoS ONE, 8 (2013), https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064735, 07.06.2016

22. Caughey B, Lansbury P T: Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders. Annu. Rev. Neurosci., 26: 267-298 (2003)

23. Cersosimo M G: Gastrointestinal Biopsies for the Diagnosis of Alpha-Synuclein Pathology in Parkinson's Disease. Gastroenterol Res Pract (2015), http://dx.doi.org/10.1155/2015/476041, 07.06.2016

24. Chade A R, Kasten M, Tanner C M: Nongenetic causes of Pakrinson’s disease. J. Neural Transm. Suppl., 70: 147-151 (2006)

25. Chaves E S, Wood R C, Jones A A, Newbold D A, Manwell M A, Kornman K S: Relationship of "bleeding on probing" and "gingival index bleeding" as clinical parameters of gingival inflammation. J. Clin. Periodontol., 20: 139-143 (1993)

26. Chee B, Park B, Bartold P M: Periodontitis and type II diabetes: a two-way relationship. Int J Evid Based Healthc, 11: 317-329 (2013)

27. Chen M, Yang W, Li X, Li X, Wang P, Yue F, Yang H, Chan P, Yu S: Age- and brain region-dependent α-synuclein oligomerization is attributed to alterations in intrinsic enzymes regulating α-synuclein phosphorylation in aging monkey brains. Oncotarget, 7: 8466-8480 (2016)

28. Clayton D F, George J M: The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. Trends Neurosci., 21: 249-254 (1998)

29. Compta Y, Valente T, Saura J, Segura B, Iranzo Á, Serradell M, Junqué C, Tolosa E, Valldeoriola F, Muñoz E, Santamaria J, Cámara A, Fernández M, Fortea J, Buongiorno M, Molinuevo J L, Bargalló N, Martí M J: Correlates of cerebrospinal fluid levels of oligomeric- and total-α-synuclein in premotor, motor and dementiastages of Parkinson's disease. J. Neurol., 262: 294-306 (2015)

30. Conway K A, Harper J D, Lansbury P T: Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinson disease. Nat. Med., 4: 1318-1320 (1998)

31. Cooper A A, Gitler A D, Cashikar A, Haynes C M, Hill K J, Bhullar B, Liu K, Xu K, Strathearn K E, Liu F, Cao S, Caldwell K A, Caldwell G A, Marsischky G, Kolodner R D, Labaer J, Rochet J C, Bonini N M, Lindquist S: Alpha-

synuclein blocks ER-Golgi traffic and Rab1 rescues neuron loss in Parkinson’s models. Science, 313: 324-328 (2006)

32. Dahodwala N, Pei Q, Schmidt P: Sex Differences in the Clinical Progression of Parkinson's Disease. J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, 45: 749-756 (2016)

33. Daum R F, Sekinger B, Kobal G, Lang C J: Olfactory testing with "sniffin' sticks" for clinical diagnosis of Parkinson disease. Nervenarzt, 71: 643-650 (2000)

34. Del Tredici K, Hawkes C H, Ghebremedhin E, Braak H: Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. Acta Neuropathol., 119: 703-713 (2010)

35. Deutsche Parkinson Gesellschaft e.V.: http://www.parkinson-gesellschaft.de/die-dpg/morbus-parkinson.html, 18.09.2016

36. Devic I, Hwang H, Edgar J S, Izutsu K, Presland R, Pan C, Goodlett D R, Wang Y, Armaly J, Tumas V, Zabetian C P, Leverenz J B, Shi M, Zhang J: Salivary α-synuclein and DJ-1: potential biomarkers for Parkinson's disease. Brain, 134 (2011), http://dx.doi.org/10.1093/brain/awr015, 07.06.2016

37. Doty R, Deems D A, Stellar S: Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. Neurology, 38: 1237-1244 (1988)

38. Eusebi P, Giannandreas D, Biscetti L, Abraham I, Chiasserini D, Orso M, Calabresi P, Parnetti L: Diagnostic utility of CSF α-synuclein species in Parkinson's disease: protocol for a systematic review and meta-analysis. BMJ Open, 6 (2016), http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2016-011113, 22.07.2016

39. Fogel B L, Clark M C, Geschwind D H: The neurogenetics of atypical parkinsonian disorders. Semin Neurol, 34: 217-224 (2014)

40. Folgoas E, Lebouvier T, Leclair-Visonneau L, Cersosimo M G, Barthelaix A, Derkinderen P, Letournel F: Diagnostic value of minor salivary glands biopsy for the detection of Lewy pathology. Neurosci. Lett., 551: 62-64 (2013)

41. Freundt E C, Maynard N, Clancy E K, Roy S, Bousset L, Sourigues Y, Covert M, Melki R, Kirkegaard K, Brahic M: Neuron-to-neuron transmission of α-synuclein fibrils through axonal transport. Ann. Neurol., 72: 517-524 (2012)

42. Fujioka S, Ogaki K, Tacik P M, Uitti R J, Ross O A, Wszolek Z K: Update on novel familial forms of Parkinson's disease and multiple system atrophy. Parkinsonism Relat. Disord. (2014), http://dx.doi.org/10.1016/S1353-8020(13)70010-5, 07.06.2017

43. Galvin J E, Lee V M, Trojanowski J Q: Synucleinopathies: clinical and pathological implications. Arch. Neurol., 58: 186-190 (2001)

44. Gao L, Chen H, Li X, Li F, Ou-Yang Q, Feng T: The diagnostic value of minor salivary gland biopsy in clinically diagnosed patients with Parkinson's disease: comparison with DAT PET scans. Neurol. Sci., 36: 1575-1580 (2015)

45. García de Y'ebenes J, Gervas J J, Iglesias J, Mena M A, Martín del Rio R, Somoza E: Biochemical findings in a case of parkinsonism secondary to brain tumor. Ann. Neurol., 11: 313-316 (1982)

46. George J M: The synucleins. Genome Biol., 3: REVIEWS3002. (2002), https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11806835, 07.06.2017

47. Goldberg M S, Lansbury P T J: Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? Nat. Cell Biol., 2 (2000), http://dx.doi.org/10.1038/35017124, 07.06.2017

48. Haehner A, Tosch C, Wolz M, Klingelhoefer L, Fauser M, Storch A, Reichmann H, Hummel T: Olfactory training in patients with Parkinson's disease. PLoS ONE, 8 (2013), https://doi.org10.1371/journal.pone.0061680, 07.06.2017

49. Hasegawa M, Nonaka T, Masuda-Suzukake M: α-Synuclein: Experimental Pathology. Cold Spring Harb Perspect Med, 6 (2016), http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a024273, 07.06.2017

50. Hellwig E, Klimek J, Attin T: Ätiologie, Histologie und Epidemiologie der Karies und anderer Zahnhartsubstanzdefekte: Karies. Einführung in die Zahnerhaltungskunde, 6, Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln, S. 22-28 (2013)

51. Holmberg K V, Hoffman M P: Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. Monogr Oral Sci,, 24: 1-13 (2014)

52. Hong Z, Shi M, Chung K A, Quinn J F, Peskind E R, Galasko D, Jankovic J, Zabetian C P, Leverenz J B, Baird G, Montine T J, Hancock A M, Hwang H, Pan C, Bradner J, Kang U J, Jensen P H, Zhan J: DJ-1 and α-synuclein in human cerebrospinal fluid as biomarkers of Parkinson's disease. Brain, 133: 713-726 (2010)

53. Hoyer W, Antony T, Cherny D, Heim G, Jovin T M, Subramaniam V: Dependence of alpha-
synuclein aggregate morphology on solution conditions. J. Mol. Biol., 322: 383-393 (2002)

54. Hrocházková J, Podzimek S, Tomka M, Kucerová H, Mihaljevic M, Hána K, Miksovský M, Sterzl I, Vinsová J: Metal alloys in the oral cavity as a cause

of oral discomfort in sensitive patients. Neuro Endocrinol. Lett., 1: 53-58 (2006)

55. Kaneto H: Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. Nippon Rinsho,, 73: 2003-2007 (2015)

56. Kang J: Cerebrospinal Fluid Amyloid β1-42, Tau, and Alpha-Synuclein Predict the Heterogeneous Progression of Cognitive Dysfunction in Parkinson's Disease. J Mov Disord, 9: 89-96 (2016)

57. Kang J, Mollenhauer B, Coffey C S, Toledo J B, Weintraub D, Galasko D R, Irwin D J, Van Deerlin V, Chen-Plotkin A S, Caspell-Garcia C, Waligórska T, Taylor P, Shan N, Pan S, Zero P, Frasier M, Marek K, Kieburtz K, Jennings D, Tanner C M, Simuni T, Singleton A, Toga A W, Chowdhury S, Trojanowski J Q, Shaw L M: CSF biomarkers associated with disease heterogeneity in early Parkinson's disease: the Parkinson's Progression Markers Initiative study. Acta Neuropathol., 131: 935-949 (2016a)

58. Kang W, Chen W, Yang Q, Zhang L, Zhang L, Wang X, Dong F, Zhao Y, Chen S, Quinn T J, Zhang J, Chen S, Liu J: Salivary total α-synuclein, oligomeric α-synuclein and SNCA variants in Parkinsons's disease patients. Sci Rep, 6 (2016b), http://dx.doi.org/10.1038/srep28143, 07.06.2017

59. Klingelhoefer L, Reichmann H: Pathogenesis of Parkinson disease--the gut-brain axis and environmental factors. Nat Rev Neurol, 11: 625-636 (2015)

60. Knudsen K, Flensborg Damholdt M, Mouridsen K, Borghammer P: Olfactory function in Parkinson's Disease - effects of training. Acta Neurol. Scand., 132: 395-400 (2015)

61. Lavedan C: The Synuclein Family. Genome Res., 8: 871-880 (1998)

62. Lee H J, Kang S J, Lee K, Im H: Human α-synuclein modulates vesicle trafficking through its interaction with prenylated Rab acceptor protein1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 412: 526-531 (2011)

63. Logroscino G: The role of early life environmental risk factors in Parkinson's disease: what is the evidence? Environ. Health Perspect., 113: 1234-1238 (2005)

64. Maleckas A, Venclauskas L, Wallenius V, Lönroth H, Fändriks L: Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. Scand J Surg, 104: 40-47 (2015)

65. Malek N, Swallow D, Grosset K A, Anichtchik O, Spillantini M, Grosset D G: Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review. Acta Neurol. Scand., 130: 59-72 (2014)

66. Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L: Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. Science, 287: 1265-1269 (2000)

67. McDonnell S K, Schaid D J, Elbaz A, Strain K J, Bower J H, Ahlskog J E, Maraganore D M, Rocca W A: Complex segregation analysis of Parkinson's disease: The Mayo Clinic Family Study. Ann. Neurol., 59: 788-795 (2006)

68. Müller T, Fuchs G, Hahne M, Klein W, Schwarz M: Diagnostic aspects of early Parkinson's disease. J. Neurol., 253 (2006), http://dx.doi.org/10.1007/s00415-006-4006-2, 07.06.2017

69. Munhoz R P, Moro A, Silveira-Moriyama L, Teime H A: Non-motor signs in Parkinson's disease: a review. Arq Neuropsiquiatr, 73: 454-462 (2015)

70. Narhi L, Wood S J, Stevenson S, Jiang Y, Wu G M, Anafi D, Kaufman S A, Martin F, Sitney K, Denis P, Louis J C, Wypych J, Biere A L, Citron M:

Both familial Parkinson's disease mutations accelerate alpha-synuclein aggregation. J. Biol. Chem., 274: 9843-9846 (1999)

71. Okun M S, Watts R L: Depression associated with Parkinson's disease: clinical features an treatment. Neurology, 58: 63-70 (2002)

72. Pagano G, Ferrara N, Brooks D J, Pavese N: Age at onset and Parkinson disease phenotype. Neurology, 86: 1400-1407 (2016)

73. Park M J, Cheon S M, Bae H R, Kim S H, Kim J W: Elevated levels of α-synuclein oligomer in the cerebrospinal fluid of drug-naïve patients with Parkinson's disease. J Clin Neurol, 7: 215-333 (2011)

74. Parkinson J: An essay on the shaking palsy. 1817. J Neuropsychiatry Clin Neurosci, 14: 223-226 (2002)

75. Parnetti L, Chiasserini D, Persichetti E, Eusebi P, Varghese S, Qureshi M M, Dardis A, Deganuto M, De Carlo C, Castrioto A, Balducci C, Paciotti S, Tambasco N, Bembi B, Bonanni L, Onofrj M, Rossi A, Beccari T, El-Agnaf O, Calabresi P: Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease. Mov. Disord., 29: 1019-1027 (2014a)

76. Parnetti L, Cicognola C, Eusebia P, Chiasserini D: Value of cerebrospinal fluid α-synuclein species as biomarker in Parkinson's diagnosis and prognosis. Biomark Med, 10: 35-49 (2016)

77. Parnetti L, Farotti L, Eusebi P, Chiasserini D, De Carlo C, Giannandrea D, Salvadori N, Lisetti V, Tambasco N, Rossi A, Majbour N K, El-Agnaf O, Calabresi P: Differential role of CSF alpha-synuclein species, tau, and Aβ42 in Parkinson's Disease. Front Aging Neurosci (2014b), http://dx.doi.org/10.3389/fnagi.2014.00053, 07.06.2017

78. Paschen L, Schmidt N, Wolff S, Cnyrim C, van Eimern T, Zehner K E, Deuschl G, Witt K: The olfactory bulb volume in patients with idiopathic Parkinson's disease. Eur. J. Neurol., 22: 1068-1073 (2015)

79. Pearce R K, Hawkes C H, Daniel S E: The anterior olfactory nucleus in Parkinson's disease. Mov. Disord., 10: 283-287 (1995)

80. Persson M, Osterberg T, Granérus A K, Karlsson S: Influence of Parkinson's disease on oral health. Acta Odontol. Scand., 50: 37-42 (1992)

81. Petrou M, Davatzikos C, Hsieh M, Foerster B R, Albin R L, Kotagal V, Müller M L, Koeppe R A, Herman W H, Frey K A, Bohnen N I: Diabetes, Gray Matter Loss, and Cognition in the Setting of Parkinson Disease. Acad Radiol, 23: 577-581 (2016)

82. Plaas M, Karis A, Innos J, Rebane E, Baekelandt V, Vaarmann A, Luuk H, Vasar E, Koks S: Alpha-synuclein A30P point-mutation generates age-dependent nigrostriatal deficiency in mice. J. Physiol. Pharmacol., 59: 205-216 (2008)

83. Polymeropoulos M H, Lavedan C, Leroy E, Ide S E, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos E S, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson W G, Lazzarini A M, Duvoisin R C, Di Iorio G, Golbe L I, Nussbaum R L: Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. Science, 276: 2045-2047 (1997)

84. Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Stevees T D L: The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. Mov. Disord., 29: 1583-1590 (2014)

85. Proulx M, de Courval F P, Wiseman M A, Panisset M: Salivary production in Parkinson's disease. Mov. Disord., 20: 204-207 (2005)

86. Reeve A, Simcox E, Turnbull D: Ageing and Parkinson's disease: why is advancing age the biggest risk factor? Ageing Res. Rev., 14: 19-30 (2014)

87. Rodriguez-Araujo G, Nakagami H, Takami Y, Katsuya T, Akasaka H, Saitoh S, Shimamoto K, Morishita R, Rakugi H, Kaneda Y: Low alpha-synuclein levels in the blood are associated with insulin resistance. Sci Rep (2015), http://dx.doi.org/10.1038/srep12081, 07.06.2017

88. Rohen J W: Morphologie der Sinnessysteme. Funktionelle Anatomie, 6, Schattauer, S. 156-157 (2001)

89. Schiess M C, Zheng H, Soukup V M, Bonnen J G, Nauta H J: Parkinson's disease subtypes: clinical classification and ventricular cerebrospinal fluid analysis. Parkinsonism Relat. Disord., 6: 69-76 (2000)

90. Schrag A, Sauerbier A, Chaudhuri K R: New clinical trials for nonmotor manifestations of Parkinson's disease. Mov. Disord., 30: 1490-1504 (2015)

91. Shellis R P, Addy M: The interactions between attrition, abrasion and erosion in tooth wear. Monogr Oral Sci, 25: 31-45 (2014)

92. Shi M, Zabetian C P, Hancock A M, Ginghina C, Hong Z, Yearout D, Chung K A, Quinn J F, Peskind E R, Galasko D, Jankovic J, Leverenz J B, Zhang J: Significance and confounders of peripheral DJ-1 and alpha-synuclein in Parkinson disease. Neurosci. Lett., 480: 78-82 (2010)

93. Solla P, Cadeddu C, Cannas A, Deidda M, Mura N, Mercuro G, Marrosu F: Heart rate variability shows different cardiovascular modulation in Parkinson's disease patients with tremor dominant subtype compared to those with akinetic rigid dominant subtype. J Neural Transm (Vienna), 122: 1441-1446 (2015)

94. Spillantini M G, Crowther R A, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M: alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's

disease and dementia with lewy bodies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95: 6469-6473 (1998)

95. Spinelli K J, Taylor J K, Osterberg V R, Churchill M J, Pollock E, Moore C, Meshul C K, Unni V K: Presynaptic alpha-synuclein aggregation in a mouse model of Parkinson's disease. J. Neurosci., 34: 2037-2050 (2014)

96. Stefanis L: α-Synuclein in Parkinson's disease. Cold Spring Harb, 2 (2012), http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009399, 07.06.2017

97. Stewart T, Liu C, Ginghina C, Cain K C, Auinger P, Cholerton B, Shi M, Zhang J: Cerebrospinal Fluid α-Synuclein Predicts Cognitive Decline in Parkinson Disease Progression in the DATATOP Cohort. . Am. J. Pathol., 184: 966-975 (2014)

98. Sutow E J, Maillet W A, Taylor J C, Hall G C: In vivo galvanic currents of intermittently contacting dental amalgam and other metallic restorations. Dent Mater, 20: 823-831 (2004)

99. Sutow E J, Taylor J C, Maillet W A, Hall G C, Millar M: Existence of an electrically insulating layer in amalgam-containing galvanic couples. Dent Mater, 24: 874-879 (2008)

100. Sveinbjornsdottir S: The clinical symptoms of Parkinson's disease. J. Neurochem. (2016), http://dx.doi.org/10.1111/jnc.13691, 07.06.2017

101. Svensson E, Horvát-Puhó E, Thomsen R W, Djurhuus J C, Pedersen L, Borghammer P, Sørensen H T: Vagotomy and Subsequent Risk of Parkinson's Disease. Ann. Neurol., 78: 522-529 (2015)

102. Takahashi K, Oshawa I, Shirasawa T, Takahashi M: Early-onset motor impairment and increased accumulation of phosphorylated α-synuclein in the motor cortex of normal aging mice are ameliorated by coenzyme Q. Exp. Gerontol., 81: 65-75 (2016)

103. Tokuda T, Qureshi M M, Ardah M T, Varghese S, Shehab S A, Kasai T, Ishigami N, Tamaoka A, Nakagawa M, El-Agnaf O M: Detection of elevated levels of α-synuclein oligomers in CSF from patients with Parkinson disease. Neurology, 75: 1766-1772 (2010)

104. Uversky V N, Li J, Fink A L: Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure. J. Biol. Chem., 276: 44284-44296 (2001)

105. Vivacqua G, Latorre A, Suppa A, Nardi M, Pietracupa S, Mancinelli R, Fabbrini G, Colosimo C, Gaudio E, Berardelli A: Abnormal Salivary Total and Oligomeric Alpha-Synuclein in Parkinson's Disease. PLoS ONE, 11 (2016), http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0151156, 07.06.2017

106. von Bohlen und Halbach, O.: Synucleins and their relationship to Parkinson's disease. Cell Tissue Res., 318: 163-174 (2004)

107. Wang X, Yu S, Li F, Feng T: Detection of α-synuclein oligomers in red blood cells as a potential biomarker of Parkinson's disease. Neurosci. Lett., 599: 115-119 (2015)

108. Wang Y, Shi M, Chung K A, Zabetian C P, Leverenz J B, Berg D, Srulijes K, Trojanowski J Q, Lee V M, Siderowf A D, Hurtig H, Litvan I, Schiess M C, Peskind E R, Masuda M, Hasegawa M, Lin X, Pan C, Galasko D, Goldstein D S, Jensen P H, Yang H, Cain K C, Zhang J: Phosphorylated α-synuclein in Parkinson's disease. Sci Transl Med, 4 (2012), http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3002566, 07.06.2017

109. Williamson R: Clinical management of galvanic current between gold and amalgam. Gen Dent, 44: 70-73 (1996)

110. Yang W, Wang G, Wang C E, Guo X, Yin P, Gao J, Tu Z, Wang Z, Wu J,

Hu X, Li S, Li X J: Mutant alpha-synuclein causes age-dependent neuropathology in monkey brain. J. Neurosci., 35: 8345-8358 (2015)

111. Zarranz J J, Alegre J, Gómez-Esteban J C, Lezcano E, Ros R, Ampuero I, Vidal L, Hoenicka J, Rodriguez O, Atarés B, Llorens V, Gomez Tortosa E, del Ser T, Muñoz D G, de Yebenes J G: The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. Ann. Neurol., 55: 164-173 (2004)

112. Zhou X, Zhang W, Liu X, Zhang W, Li Y: Interrelationship between diabetes and periodontitis: role of hyperlipidemia. Arch. Oral Biol., 60: 667-674 (2015)

Anhang

Anhang 1: Patienteninformation und Einwilligungserklärung

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. A. C. Ludolph
RKU- Universitäts- und Rehabilitationsklinik Ulm
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
Telefon: 0731/ 177 1200
Telefax: 0731/ 177 1202
Albert.Ludolph@rku.de
Ulm, 08.02.16

Patienteninformation

Liebe Patientin, lieber Patient,

wir möchten Sie gerne über die von uns geplante Gewinnung einer Speichel- und Zahnsteinprobe informieren.

Hintergrund und Ziel der Studie:
Der Speichel erhöht die Gleitfähigkeit der zerkauten Nahrung, er tötet Bakterien ab und enthält Enzyme, die bereits im Mund anfangen Nahrung aufzuspalten.
Die Unterkieferspeicheldrüse (Glandula submandibularis) ist die zweitgrößte Speicheldrüse des Menschen. Sie ist doppelt vorhanden und liegt jeweils in einem Dreieck, das durch Unterkiefer und der Muskulatur unter der Zunge gebildet wird. Der Ausführungsgang der Drüse endet in einer kleinen Erhebung (der sogenannten Caruncula sublingualis), die sich ebenfalls unter der Zunge und seitlich des Zungenbändchens befindet. Die Drüse besteht aus den Drüsenendstücken, die den Speichel produzieren und dem Ausführungsgangsystem, in dem sich der gebildete Speichel sammelt.

Innerviert wird die Unterkieferdrüse durch das vegetative Nervensystem. Bei Patienten mit Parkinsonerkrankung (wie Sie bei Ihnen vorliegt) kommt es im vegetativen Nervensystem zu Veränderungen, nämlich dem Auftreten falsch gefalteter Proteine, den sogenannten Lewy-Körperchen. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass sich diese Proteine bei Parkinsonpatienten auch in den Unterkieferspeicheldrüsen nachweisen lassen.
In der Studie soll untersucht werden, ob die Zusammensetzung der Bestandteile des Speichels bei Patienten mit Parkinsonerkrankung krankheitsbedingt verändert ist. Ein positives Ergebnis könnte es dann möglicherweise in Zukunft in Kombination mit anderen Testverfahren möglich machen, den menschlichen Speichel als Diagnoseinstrument bei Parkinsonerkrankung zu etablieren.

Ablauf der Studie:
Während der Studie erhalten Sie eine Salivette, auf der Sie 1 Minute kauen sollen. Im Anschluss daran wird Ihnen etwas Zahnstein entnommen. Vor Probeentnahme sollte 30 Minuten lang nichts gegessen, nichts getrunken und keine Zähne geputzt werden. Risiken und Gefahren der Speichel- und Zahnsteingewinnung auf diesem Wege sind nicht bekannt.

Der Zahnstein spiegelt die langfristigen Veränderungen der Zusammensetzung des Speichels wider. Daher ist er besonders gut geeignet etwaige Veränderungen der Speichelzusammensetzung auf längere Sicht darzustellen.

Falls Sie weitere Fragen haben, stehen wir Ihnen natürlich jederzeit gern zur Verfügung. Zudem möchten wir Sie darauf hinweisen, dass Sie jederzeit ohne Angabe von Gründen Ihr Einverständnis zurückziehen können

FREIWILLIGKEIT:
An diesem Forschungsprojekt nehmen Sie freiwillig teil. Auch sollten Sie nicht teilnehmen wollen, entstehen Ihnen natürlich keinerlei Nachteile von Seiten unserer Betreuung. Ihr Einverständnis können Sie jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen, dann werden sämtliche Proben und Daten vernichtet. Dieser eventuelle Widerruf hat für Sie und für die Betreuung keinerlei Nachteile.
Sollten zusätzliche Fragen bestehen, so können Sie jederzeit Prof. Dr. Kassubek unter der Telefonnummer 0731 / 1775210 und den Diensthabenden Arzt unter der Telefonnummer 0731 / 177-5241 erreichen.

Schweigepflicht/Datenschutz:
Alle Personen, welche Sie im Rahmen dieses Projektes betreuen, unterliegen der ärztlichen Schweigepflicht und sind auf das Datengeheimnis verpflichtet.
Die studienbezogenen Untersuchungsergebnisse sollen in anonymisierter Form in wissenschaftlichen Veröffentlichungen verwendet werden.
Soweit es zur Kontrolle der korrekten Datenerhebung erforderlich ist, dürfen autorisierte Personen (z.B.: des Auftraggebers, der Universität) Einsicht in die studienrelevanten Teile der Krankenakte nehmen.
Sofern zur Einsichtnahme autorisierte Personen nicht der obengenannten ärztlichen Schweigepflicht unterliegen, stellen personenbezogene Daten, von denen sie bei der Kontrolle Kenntnis erlangen, Betriebsgeheimnisse dar, die geheim zu halten sind.
Die Speichelentnahme und Zahnsteinentnahme zu Studienzwecken wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt (Ethikantrag Nummer 20/10).

Datum

Name des/der aufklärenden Arztes/Ärzte

EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG

Name der Studie: "Veränderungen der Zusammensetzung der Speichelkomponenten und des Zahnsteins bei Morbus Parkinson"

Inhalt, Vorgehensweise, Risiken und Ziel des obengenannten Forschungsprojektes sowie die Befugnis zur Einsichtnahme in die erhobenen Daten hat mir Dr. ..... ausreichend erklärt.

Ich hatte Gelegenheit Fragen zu stellen und habe hierauf Antwort erhalten.

Ich hatte ausreichend Zeit, mich für oder gegen die Teilnahme am Projekt zu entscheiden.

Eine Kopie der Probandeninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten.

Ich willige in die Teilnahme am Forschungsprojekt ein.

.....
(Name des Probanden)

....
Ort, Datum (Unterschrift des Probanden)

INFORMATION UND EINWILLIGUNGSERKLÄRUNG ZUM DATENSCHUTZ

Bei wissenschaftlichen Studien werden persönliche Daten und medizinische Befunde über Sie erhoben. Die Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser studienbezogenen Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor Teilnahme an der Studie folgende freiwillige Einwilligung voraus:

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie erhobene Daten/Krankheitsdaten auf Fragebögen und elektronischen Datenträgern aufgezeichnet und ohne Namensnennung verarbeitet werden
2) Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass eine autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Person (z.B.: des Auftraggebers, der Universität) in meine erhobenen personenbezogenen Daten Einsicht nimmt, soweit dies für die Überprüfung des Projektes notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Arzt von der ärztlichen Schweigepflicht.

.....
(Name des Probanden)

....
Ort, Datum (Unterschrift des Probanden)

Vom Arzt auszufüllen:

Ich bestätige, dass ich den/die Probanden/in über Wesen, Bedeutung, Tragweite und mögliche Risiken der Blutabnahme aufgeklärt habe und er/sie mit der Teilnahme einverstanden ist.

....
Ort, Datum (Unterschrift des Prüfarztes)

Anhang 2: Fragebogen

Ärztlicher Direktor:
Prof. Dr. med. A. C. Ludolph
RKU- Universitäts- und Rehabilitationsklinik Ulm
Oberer Eselsberg 45
89081 Ulm
Telefon: 0731/ 177 1200
Telefax: 0731/ 177 1202
Albert.Ludolph@rku.de
Ulm, 08.02.16

FRAGEBOGEN

Name: _____

Alter: _____

Geschlecht: _____

Größe: _____

Gewicht: _____

Erstdiagnose: _____

Stadium der Erkrankung: _____

Medikamente: _____

_____

_____

_____

Leiden Sie an Diabetes? Wenn ja, seit wann? _____

Sind in Ihrer Familie Fälle von Parkinson bekannt? Wenn ja, wer Ihrer Verwandten ist betroffen?

_____

Raucher Sie? Wenn ja, seit wann und wieviel am Tag?: _____

Benutzen Sie regelmäßig Kaugummi? _____

Putzen Sie regelmäßig die Zähne (2 mal am Tag)? _____

Haben Sie öfters entzündetes Zahnfleisch (Gingivitis)? _____

Wieviel Wasser trinken Sie ungefähr am Tag? _____

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	*Darstellung der α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 26
Abbildung 2:	*Beziehung von Hämoglobin zu α-SYN*	Seite 27
Abbildung 3:	*Darstellung der α-SYN-Konzentrationen im Zahnstein (<4000ng/ml Hb) mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 28
Abbildung 4:	*Graphische Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei der PD-Kohorte mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 29
Abbildung 5:	*Graphische Darstellung der Ergebnisse des Riechtests bei der Kontrollkohorte mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 30
Abbildung 6:	*Graphische Darstellung des Ergebnisses des Riechtests bei Erkrankten und Kontrollen mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 31
Abbildung 7:	*Graphische Darstellung des Ergebnisses des Riechtests zur Dauer seit der Erstdiagnose*	Seite 32
Abbildung 8:	*Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Dauer der Erkrankung seit Diagnosestellung bei PD-Patienten*	Seite 33
Abbildung 9:	*Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht bei Erkrankten mit Median und Interquartil-Bereich*	Seite 34

Abbildung 10: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Geschlecht bei Kontrollen mit Median und Interquartil-Bereich* Seite 35

Abbildung 11: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein der Subtypen des M. Parkinson mit Median und Interquartil-Bereich* Seite 36

Abbildung 12: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Lebensalter der Erkrankten* Seite 37

Abbildung 13: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und Lebensalter bei den Kontrollen* Seite 38

Abbildung 14: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel bei Erkrankten* Seite 39

Abbildung 15: *Darstellung der Korrelation zwischen pg α-SYN/mg Zahnstein und pg α-SYN/ml Speichel bei Kontrollen* Seite 40

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	*Übersicht Herstellung der 6 Tubes für Standardkurve*	Seite 18
Tabelle 2:	*Komponenten des Kits*	Seite 19
Tabelle 3:	*Herstellerangabe über Verdünnungsreihe für Standardkurven*	Seite 20
Tabelle 4:	*Übersicht der Mischungen*	Seite 22

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. A.C. Ludolph bedanke ich mich sehr herzlich für die freundliche Übernahme der Doktorvaterschaft, die konstante Unterstützung, sowie die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und sein Enthusiasmus haben entscheidend zur Arbeit beigetragen.

Des Weiteren bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Kassubek und Herrn Prof. Pinkhardt, welche mich freundlich in ihrer Parkinson-Sprechstunde aufgenommen und unterstützt haben.

Besten Dank an Frau Cudek aus dem HNO-Forschungslabor für die Untersuchung der Zahnsteinproben.

Auch möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Dr. Öckl aus dem ZKF für die Hämoglobinuntersuchung und die Beantwortung meiner vielen Fragen bedanken.

Ein letzter, sehr großer Dank gilt meiner Familie, die mich im Laufe meines bisherigen Lebens tatkräftig unterstützt hat. Vor allem meinen Eltern möchte ich für die Ermöglichung meines Zahnmedizinstudiums, den stetigen Rückhalt und die Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sabrina Franziska Schmid
Geburtsdatum:	15.12.1991
Geburtsort:	Biberach a.d.Riß

Schulische Ausbildung

1998-2002	Grundschule Warthausen
2002-2011	Pestalozzi-Gymnasium Biberach Allgemeine Hochschulreife

Studium

2011-2014	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
04.10.2012	Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
29.08.2014	Zahnärztliche Vorprüfung an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
2014-2017	Studium der Zahnmedizin an der Universität Ulm