

**Universitätsklinikum Tübingen  
Neurologische Universitätsklinik  
Abteilung für Neurologie mit Schwerpunkt Neurodegenerative  
Erkrankungen**

**Gibt es den inflammatorischen Endophänotyp bei der  
Parkinson-Erkrankung? Assoziation von Genotyp,  
Entzündungsparametern und dem Parkinson-Phänotyp**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Bernard, Alice**

**2016**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. W. Maetzler

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Bischof

Tag der Disputation: 26.07.2016

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>6</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>10</b>
1.1. Die Parkinson-Erkrankung ( <i>Parkinson's Disease</i> , PD) .....	10
1.1.1. Definition.....	10
1.1.2. Epidemiologie .....	11
1.1.3. Ätiologie.....	11
1.1.4. Pathogenese der PD .....	13
1.1.5. Pathologie.....	22
1.1.6. Klinisches Bild der PD .....	23
1.2. Biomarker bei PD: bisherige Erkenntnisse.....	28
1.2.1. Veränderungen im Liquor von PD-Patienten.....	29
1.2.2. Veränderungen im Blut und in Blutbestandteilen von PD-Patienten	31
1.2.3. Veränderungen in anderen Körperflüssigkeiten von PD-Patienten	33
1.3. Arbeitshypothesen .....	33
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>35</b>
2.1. Die COEN-Studie .....	35
2.2. Anteil der Verfasserin am Projekt.....	35
2.3. Rekrutierung.....	36
2.4. Klinische Untersuchung .....	37
2.4.1. Allgemeine Angaben zur Person und Anamnese.....	37
2.4.2. PD-Verlauf.....	38
2.4.3. Körperliche Untersuchung .....	38
2.4.4. REM-Schlaf-Störung und Tagesmüdigkeit .....	39
2.4.5. Beurteilung von Kognition/kognitiver Beeinträchtigung .....	39
2.4.6. Beurteilung des Tremors .....	39
2.4.7. Prüfung des Riechvermögens .....	39
2.4.8. Beurteilung von Stimmung/Gemütslage .....	39
2.4.9. Beurteilung von autonomen Störungen.....	40
2.4.10. Bewegungsanalyse mittels Accelerometer.....	40
2.5. Biomaterial .....	42
2.6. DNA-Analysen.....	42

2.7. Serumanalysen .....	44
2.8. Statistik.....	46
2.8.1. Identifikation der demographischen bzw. klinischen Parameter ....	46
2.8.2. Assoziation der demographischen bzw. klinischen Parameter mit immunologischen Serumparametern.....	48
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>50</b>
3.1. Demographische und klinische Parameter der untersuchten Kohorte..	50
3.2. Ergebnisse der <i>principal component analysis</i> (PCA).....	52
3.3. Extraktion der für den immunologischen PD-Endophänotyp relevanten klinischen/demographischen Parameter aus der PCA in Zusammenschau mit signifikant erhöhten immunologischen Serumparametern .....	53
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
4.1. Die COEN-Kohorte.....	61
4.2. IL-15 und IL-18 bei PD .....	62
4.2.1. Interleukin-15 (IL-15) .....	63
4.2.2. Interleukin-18.....	65
4.2.3. Synergistische Wirkungen von IL-15 und IL-18.....	67
4.3. Assoziation von IL-8 mit frühem Erkrankungsbeginn.....	70
4.4. Korrelation von IL-10 mit dem MoCA-Score .....	72
4.5. Der genetische Risikoscore .....	74
4.6. Der inflammatorische PD-Endophänotyp: Pro und Kontra für die Definition dieses Subtyps.....	75
5. Zusammenfassung.....	78
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....</b>	<b>91</b>
<b>8. VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>93</b>
<b>ANHANG .....</b>	<b>94</b>
Lizenz zur Verwendung der Abbildung 2B aus „Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies“, Malik et al. 2014 (in der vorliegenden Arbeit: Abb. 7) .....	94
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>95</b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: <i>Principal component analysis</i> (PCA) .....	52
Abb. 2: Assoziation der Abnahme des MoCA-Wertes mit verschiedenen immunologischen Serumparametern (IL-15 und IL-18) .....	56
Abb. 3: Assoziation der Abnahme des SCOPA-AUT-Wertes mit IL-15 .....	57
Abb. 4: Assoziation von frühem Erkrankungsalter mit IL-8 und TPO .....	58
Abb. 5: Assoziation von MoCA-Werten mit IL-10 .....	58
Abb. 6: Risikoscore für „immunogene SNPs“ .....	59
Abb. 7: Odds ratio, einen Apoplex zu erleiden, für fünf verschiedene Risikogruppen, die von Malik et al. anhand eines genetischen Risikoscores eingeteilt wurden .....	75

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Geschlechterverteilung der Probanden .....	50
Tab. 2: Verteilung der PD-Subtypen unter den Probanden .....	50
Tab. 3: Demographische und klinische Durchschnittswerte der Probanden	50
Tab. 4: Vergleich klinischer und demographischer Parameter in Zusammenhang mit immunologischen Serumparametern .....	54

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
AAK	Autoantikörper
Abb.	Abbildung
A $\beta$	Abeta
AFP	Alpha-Fetoprotein
APC	<i>antigen-presenting cells</i> (antigenpräsentierende Zellen)
AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BDI	Becks Depressions Inventar
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CA 125	<i>cancer-antigen 125</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CKMB	Kreatinkinase <i>muscle-brain</i> -Typ
Comp.	<i>component</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCL	<i>C-X-C motif ligand</i>
CCL	<i>C-C motif ligand</i>
DAMPS	<i>damage-associated molecular pattern molecules</i>
DNA	<i>deoxyribonucleid acid</i>
DZNE	<i>Deutsches Zentrum für Neurologische Erkrankungen</i>
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

EK	Ekrankung
et al.	<i>et alii</i> = und andere
FABP	<i>fatty acid-binding protein</i>
FSS	<i>Fatigue Severity Scale</i>
g	Gramm
GBA	Glucocerebrosidase (= Glucocerebrosidase-Gen)
ggf.	gegebenenfalls
GH	<i>growth hormone</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRS	<i>genetic risk prediction score</i>
GWAS	<i>genome wide association study</i>
H&Y	Hoehn & Yahr
HIH	Hertie Institut für Klinische Hirnforschung
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
hs-CRP	<i>high-sensitivity C-reaktives Protein</i>
Hz	Hertz
i.e.	id est (= das heißt)
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule-1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-15R $\alpha$	Interleukin-15-Rezeptor $\alpha$
IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
LED	Levodopa-Äquivalenzdosis
LEU	<i>levodopa equivalent units</i>
ln	natürlicher Logarithmus
LOPD	<i>late onset PD</i>
LPS	Lipopolysaccharide
<i>LRRK2</i>	Leukinreiche-Repeat-

	Serin/Threoninkinase (= Leukinreiche-Repeat-Serin/Threoninkinase-Gen)
MBP	Myelin-basisches Protein
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDC	<i>macrophage-derived chemokine</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIP-1 $\beta$	<i>macrophage inflammatory protein 1<math>\beta</math></i>
MMP-3/9	Matrix-Metalloproteinase-3/9
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment-Test</i>
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MTA	medizinisch-technische(r) Angestellte(r)
MW	Mittelwert
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
Ncl.	Nucleus
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
NKG2A/D	<i>natural killer group 2 member A/D</i>
NMI	Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut (Reutlingen)
OR	<i>Odds ratio</i>
PBMC	<i>peripheral mononuclear blood cell</i>
PCA	<i>principal component analysis</i>
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PIGD	<i>PD with postural instability and gait difficulty</i>
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i> (= <i>PTEN-induced putative kinase 1-Gen</i> )
PSA-f	freies Prostata-spezifisches Antigen
RANTES	<i>Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted</i>

REM	<i>rapid eye movement</i>
S.	Seite
SCF	<i>stem cell factor</i>
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
SNCA	Synuclein-alpha (= Synuclein-alpha-Gen)
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
SnPc	Substantia nigra, Pars compacta
TCR	<i>T-cell receptor</i> (T-Zell-Rezeptor)
TF	<i>tissue factor</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF- $\alpha/\beta$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha/\beta$
TPO	Thyreoperoxidase
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
u.a.	unter anderem
UPDRS	<i>Unified Parkinson's Disease Rating Scale</i>
v.a.	vor allem
vs.	versus (= gegen)
YOPD	<i>young onset PD</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Die Parkinson-Erkrankung (*Parkinson's Disease, PD*)

#### 1.1.1. Definition

Die Parkinson-Erkrankung (englisch: *Parkinson's disease, PD*) ist eine degenerative Störung des Zentralen Nervensystems (ZNS), primär ausgelöst durch den Untergang dopaminerger Nervenzellen in der Substantia nigra, Pars compacta (SnPc), und anderen Hirnregionen. Die klinische Diagnose hängt vom Vorhandensein von Bradykinese in Verbindung mit mindestens einem zusätzlichen motorischen Symptom – Tremor, Muskelrigidität oder posturaler Instabilität (Hughes, Daniel et al. 1992) – ab und kann von einer Vielzahl weiterer motorischer und nicht-motorischer Symptome begleitet sein. Während des Krankheitsverlaufs verschlimmern sich die Symptome in der Regel und erreichen verschiedene und oft nicht vorhersehbare Schweregrade als Folge des unaufhaltsam fortschreitenden Zelltodes (Jankovic 2008).

Hinweise auf Störungen, deren Beschreibung an PD denken lässt, finden sich bereits in Aufzeichnungen aus dem Alten Ägypten und in Überlieferungen des griechischen Arztes Galen von Pergamon aus dem 2. Jahrhundert nach Christus (Garcia Ruiz 2004, Raudino 2012). Im Jahre 1787 beschreibt James Parkinson als erster ein spezifisches Krankheitsbild, das bekannt war als „Schüttellähmung“ (englisch: *shaking palsy*). In dieser bedeutsamen Veröffentlichung berichtet Parkinson von sechs Patienten, die unter den typischen Symptomen der später nach ihm benannten Erkrankung litten (Parkinson 2002).

Im klinischen Alltag wird die PD-Diagnose anhand des klinischen Erscheinungsbildes und weiterer Kriterien gestellt. Zum Zwecke der Diagnosevereinheitlichung bzw. -erleichterung wurde von der *UK Parkinson's Disease Society Brain Bank* ein Katalog an Diagnosekriterien mit Ein- und Ausschlussfaktoren – bzw. Kriterien, deren Vorliegen PD wahrscheinlich oder unwahrscheinlich machen – veröffentlicht (Hughes, Daniel et al. 2001).

### 1.1.2. Epidemiologie

PD ist nach Morbus Alzheimer (*Alzheimer's disease, AD*) die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung. In den Industrienationen beträgt die Prävalenz 0,3%, weltweit sind näherungsweise sieben Millionen Menschen betroffen. Da das Alter den Hauptrisikofaktor für die Erkrankung darstellt, ist die Prävalenz in der älteren Bevölkerung höher (1% bei den 60-jährigen, 4% bei den 80-jährigen) (de Lau and Breteler 2006).

### 1.1.3. Ätiologie

Die Ätiologie der Erkrankung ist nicht vollständig geklärt. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Risikofaktoren wird diskutiert, angefangen bei Ernährungs- und Umwelteinflüssen – z. B. Insektiziden und Schwermetallen (de Lau and Breteler 2006, Pan-Montojo, Schwarz et al. 2012) –, über genetische Prädisposition, bis hin zu Inflammation, oxidativem Stress und Eisenakkumulationsstörungen im ZNS (Olanow and Tatton 1999). Synoptisch ist festzustellen, dass es sich bei PD um ein multifaktoriell bedingtes Leiden handelt, bei dem Inflammation unumstritten eine entscheidende Rolle spielt. Aus diesem Grund konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf das Zutun inflammatorischer Prozesse bei PD und die Rolle von Inflammation bei der Erkrankung.

#### 1.1.3.1. Genetischer Hintergrund der PD-Entstehung

Nachdem man PD lange Zeit für ein nicht-erbliches Leiden hielt, hat die Entdeckung mehrerer PD-assoziiierter Genmutationen unser Krankheitsverständnis wesentlich beeinflusst. Aktuell sind Gene bekannt, die für eine autosomal-dominant-vererbte Form von PD verantwortlich sind, z. B. Mutation im Gen für Leukinreiche-Repeat-Serin/Threoninkinase (*LRRK2*) (Khan, Jain et al. 2005) und Synuclein- $\alpha$  (*SNCA*) (Proukakis, Houlden et al. 2013). Ebenso sind rezessiv-vererbte Genmutationen wie *PINK1* (Valente, Salvi et al. 2004) und *PARKIN* (Fukae, Sato et al. 2009) entdeckt worden.

Eine bedeutsamere Rolle für die Mehrheit der PD-Patienten dürfte jedoch die polygene Vererbung spielen. So ist die Mutation im Gen für die Glucocerebrosidase-beta (*GBA*-Gen) die bei sporadischer PD am häufigsten vorkommende Mutation (Brockmann and Berg 2014).

Im Rahmen genomweiter Assoziationsstudien (engl. *genome wide association studies*, GWAS) wurden Variationen einzelner Basenpaare gesucht, die mit PD assoziiert sind. *Single nucleotide polymorphisms* – SNPs – in zahlreichen, funktionell unterschiedlichen Genen konnten so identifiziert werden, deren Assoziation mit PD über einer genomweiten Signifikanzschwelle liegt. In einer Untersuchung aus dem Jahr 2014 fanden die Autoren nach Metaanalysen von GWAS 28 Risikovarianten in 24 verschiedenen Genloci (Nalls, Pankratz et al. 2014). Einen nicht zu vernachlässigenden – wahrscheinlich sogar stärkeren – Einfluss üben jedoch SNPs aus, die unterhalb der genomweiten Signifikanzschwelle liegen (Keller, Saad et al. 2012, Holmans, Moskvina et al. 2013).

Um kausale Einblicke in den Krankheitsmechanismus zu erhalten, müssen die betreffenden SNPs im Kontext ihrer biologischen Funktion und ihrer molekularen Auswirkung untersucht werden. Durch die große Anzahl an Genloci, in denen sich PD-relevante SNPs finden, ist eine entsprechende Vielfalt an biologischen Prozessen betroffen, auf die hier nicht im Einzelnen eingegangen werden kann. Es scheint in Zusammenschau der Ergebnisse aus bisher vorliegenden GWAS und der Fragestellung dieser Arbeiten sinnvoll, SNPs der Gene, die in die Regulation des Immunsystems involviert sind, intensiver zu beleuchten, wie z.B. SNPs in den Genen für Humanes Leukozytenantigen (HLA) (Holmans, Moskvina et al. 2013). Die HLA-Loci gehören zu den komplexesten im menschlichen Genom und spielen eine essentielle Rolle bei der Regulation des Immunsystems. Für mehrere SNPs auf diesen Genen konnte eine Assoziation mit PD nachgewiesen werden (Hill-Burns, Factor et al. 2011) (Pankratz, Beecham et al. 2012) (Ahmed, Tamouza et al. 2012) (Simon-Sanchez, van Hilten et al. 2011), jedoch scheint das PD-Risiko für die einzelnen SNPs auch stark von der ethnischen Herkunft der Individuen abzuhängen. Für einen SNP fand sich beispielsweise ein erhöhtes

PD-Risiko für Nordamerikaner europäischer Herkunft (Hamza, Zabetian et al. 2010), während eine solche Korrelation bei isolierter Untersuchung der schwedischen Bevölkerung ausblieb (Ran, Willows et al. 2013).

Bei der Kategorisierung von SNPs, deren Assoziation mit PD unterhalb der genomweiten Signifikanzschwelle angesiedelt ist, kam eine Studiengruppe zu dem Ergebnis, dass diese Polymorphismen bezüglich ihrer biologischen Funktion zwei wesentlichen Stoffwechselwegen zugeordnet werden können: der Regulation von Leukozyten/Lymphozyten-Aktivierung und der Zytokin-vermittelten Signalkaskade (Holmans, Moskvina et al. 2013). Dazu gehören SNPs im *LRRK2*- und *STK39*-Gen. *LRRK2* wurde eine B-Lymphozyten-regulierende Funktion zugewiesen (Kubo, Kamiya et al. 2010), weshalb möglicherweise eine direkte Verbindung zwischen zellvermittelter Immunität und den pathologischen Vorgängen bei PD besteht. *STK39* als prädisponierender Locus für PD ist ein weiterer immunrelevanter Risikofaktor, da dieses Serin/Threonin-Kinase-Gen mit Entzündungsgeschehen assoziiert ist (International Parkinson Disease Genomics, Nalls et al. 2011).

#### 1.1.3.2. Entzündung und PD: epidemiologische Aspekte

Interessant im Hinblick auf die Rolle von Entzündungsgeschehen ist die Tatsache, dass mehrere epidemiologische Studien einen Zusammenhang zwischen der Einnahme von nicht-steroidalen Antiphlogistika im Erwachsenenalter und der zukünftigen Entwicklung von PD nachweisen konnten. So fand sich beispielsweise dosisassoziiert ein geringeres PD-Risiko bei Einnahme von Ibuprofen (Gao, Chen et al. 2011).

#### 1.1.4. Pathogenese der PD

Lange Zeit hielt man den Untergang dopaminergener Neurone in der SnPc und das konsekutive Dopamindefizit für die Ursache der Erkrankung (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2008). Die Neuronen in der SnPc stimulieren die bewegungsfördernde Komponente des Extrapyramidalmotorischen Systems, während sie gleichzeitig die bewegungshemmende Komponente inhibieren. Es wird daher angenommen, dass durch den Untergang besagter dopaminergener

Neuronen diese physiologische Signalkaskade so gestört wird, dass der bewegungshemmende Anteil überwiegt und die parkinsontypische Klinik resultiert. Neuere Untersuchungen weisen außerdem auf die Beteiligung der Substantia nigra bei Funktionen wie motorischen Lernprozessen, Belohnungsverhalten und Emotionen hin (Lanciego, Luquin et al. 2012). Weitere Untersuchungen geben Hinweise, dass es auch in Hirnregionen wie dem Bulbus olfactorius, dem oberen und unteren Hirnstamm, dem peripheren Nervensystem und dem Rückenmark zum Neuronenverlust kommt. Ebenso kann im Rahmen von PD der Zelltod von cholinergen Neuronen im Nucleus (Ncl.) basalis Meynert und noradrenergen Neuronen des Locus coeruleus sowie serotonergen Neuronen in den Raphekernen beobachtet werden. Manche der genannten Regionen sind unter Umständen früher betroffen als die Substantia nigra, wodurch die Manifestation der nicht-motorischen Symptome vor den motorischen Defiziten erklärt werden könnte (Berg, Lang et al. 2013). Es werden große Anstrengungen unternommen, den Zelltod auf molekularer Ebene zu klären. Trotz jahrzehntelanger Forschung bleibt die Frage, wie und warum es zum Untergang der Neuronen kommt, unbeantwortet. Am wahrscheinlichsten ist es, dass es sich um einen multikausalen Prozess handelt (Obeso, Rodriguez-Oroz et al. 2010), bei dem vor allem die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein sowie die Beeinträchtigung lysosomaler und mitochondrialer Funktionen relevante pathophysiologische Aspekte darstellen (Bourdenx, Bezard et al. 2014). Deshalb soll auf diese drei Prozesse detaillierter eingegangen werden.

Bei  $\alpha$ -Synuclein handelt es sich um ein Protein aus 140 Aminosäuren. Es wird von neuronalen Synapsen exprimiert, reguliert physiologischerweise die Plastizität von Synapsen und die Differenzierung von Neuronen und ist an der Dopaminausschüttung beteiligt. Die Multiplikation des Wildtyp-Gens für  $\alpha$ -Synuclein (des *SNCA*-Gens) verursacht ein familiäres Parkinson-Syndrom (Saracchi, Fermi et al. 2014). Außerdem ist  $\alpha$ -Synuclein der Hauptbestandteil der sog. Lewy-Körper, welche das spezifische pathologische Kennzeichen von PD darstellen (Details hierzu im Kapitel „1.1.5. Pathologie“). Das sich in Lewy-Körpern befindliche  $\alpha$ -Synuclein bildet nach posttranslationaler Modifikation

Oligmere und aggregiert schließlich. Auch eine Prionen-ähnliche Funktion von  $\alpha$ -Synuclein – im Sinne einer Ausbreitung des Proteins von Zelle zu Zelle – steht derzeit zur Diskussion. Im Tiermodell konnte die Toxizität von  $\alpha$ -Synuclein für Zellen, insbesondere für dopaminerge Zellen, nachgewiesen werden (Bourdenx, Bezard et al. 2014). Warum das Protein aggregiert und nicht durch zelluläre Mechanismen abgebaut wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Allerdings konnten weitere molekulare Defekte – in erster Linie mitochondriale und lysosomale Dysfunktion – nachgewiesen werden, die mit der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein in Wechselwirkung stehen (Irvine, El-Agnaf et al. 2008, Bourdenx, Bezard et al. 2014). So leistet mitochondriale Dysfunktion z.B. durch vermehrte Mitochondrien-Fragmentation einen Beitrag zur Entstehung von PD. Im Verlauf entstehen oxidative Sauerstoffspezies (Santos, Esteves et al. 2014), die unter anderem die Membranpermeabilität von Lysosomen beeinträchtigen. Da sich Lysosomen durch einen sehr hohen Kalziumgehalt auszeichnen, steigt beim Untergang dieser Zellorganellen der intrazelluläre Kalziumspiegel an, was zum Zelltod führt (Bourdenx, Bezard et al. 2014, Santos, Esteves et al. 2014). Bezüglich der Mitochondrien wurden mehrere mitochondriale Genvarianten entdeckt, die mit der Entstehung von PD assoziiert sind (Andalib, Vafaei et al. 2014). Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass verschiedene Komplexe der Atmungskette im Mittelhirn und im Striatum bei Mäusen defekt sind, bei denen gleichzeitig eine  $\alpha$ -Synuclein-Akkumulation im ventralen Mittelhirn, Striatum und Cortex zu finden war. Die betroffenen Regionen zeichneten sich durch erhöhte Zeichen von oxidativem Stress aus, während die antioxidativen Schutzmechanismen kompromittiert waren, woraus eine höhere Zellvulnerabilität resultierte (Subramaniam, Vergnes et al. 2014). Zuletzt ist in Zusammenhang mit dem dopaminergen Zelltod auf die Beeinträchtigung der Lysosomen einzugehen. Physiologischerweise dienen Lysosomen dem Abbau von Proteinen, des Weiteren sind diese Zellorganellen u.a. an intrazellulären Signalkaskaden beteiligt (Bourdenx, Bezard et al. 2014). Mehrfach konnte nachgewiesen werden, dass eine beeinträchtigte lysosomale Funktion zur Entstehung von PD und anderen neurodegenerativen Erkrankungen beiträgt (Chu, Dodiya et al. 2009, Dehay, Bove et al. 2010,

Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011). So ist bekannt, dass die Dysfunktion von Lysosomen die Ausschüttung von  $\alpha$ -Synuclein aus Exosomen und konsekutiv die Aggregation des Proteins begünstigt (Alvarez-Erviti, Seow et al. 2011). Im Tiermodell fanden sich in Zellen mit  $\alpha$ -Synuclein-Aggregaten Zeichen von erniedrigter lysosomaler Funktion. Die betreffende Studie kam zu dem Schluss, dass  $\alpha$ -Synuclein-Aggregation im Zusammenspiel mit lysosomaler Dysfunktion und der Beeinträchtigung anderer Mechanismen, die zum Proteinabbau beitragen (den sog. Proteasomen), eine Schlüsselrolle bei neuronalem Zelltod und der Entstehung von Neurodegeneration spielen (Chu, Dodiya et al. 2009). Im Mausmodell von PD wurde außerdem nachgewiesen, dass ein verminderter Lysosomengehalt in dopaminergen Zellen der Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein und dem Zelltod vorausgeht (Dehay, Bove et al. 2010). Festzustellen ist an dieser Stelle, dass die pathologischen Prozesse, die zum dopaminergen Zelluntergang bei PD führen, insbesondere die Aggregation von  $\alpha$ -Synuclein sowie mitochondriale und lysosomale Dysfunktion, nicht isoliert, sondern in komplexem Zusammenspiel wirken.

Bezüglich der Pathogenese von PD muss weiterhin angemerkt werden, dass sich die Krankheit durch ein außergewöhnlich heterogenes klinisches Erscheinungsbild auszeichnet. Dies lässt darauf schließen, dass PD unterschiedliche pathophysiologische Verläufe auf molekularer Ebene zugrunde liegen (van Rooden, Colas et al. 2011). Denkbar wäre, dass bei verschiedenen Individuen verschiedene pathologische Aspekte überwiegen, wie beispielsweise ein „inflammatorischer“ Verlauf, dessen Grad an „Aggressivität“ von gewissen immunologischen Dispositionen abhängt.

#### 1.1.4.1. Die Rolle von Entzündungsprozessen bei der PD-Pathogenese

##### 1.1.4.1.a) Allgemeines zum Immunsystem

Aufgrund des Schwerpunktes dieser Arbeit soll vorab auf die generelle Funktion des Immunsystems eingegangen werden, um die Erklärungen und Theorien, die im Verlauf zur Sprache kommen, in den Gesamtkontext einordnen zu können. Es muss besonders betont werden, dass eine Beteiligung von

Entzündungsprozessen bei Entstehung und Voranschreiten von PD nicht von der Hand zu weisen ist. Aus diesem Grund möchte diese Arbeit dazu beitragen, Forschungslücken zu schließen – auch im Hinblick darauf, dass die Zusammenhänge hier sehr komplex und keineswegs vollständig geklärt sind.

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes System aus Zellen, Proteinen, Signalkaskaden und Mechanismen, die es ihm ermöglichen, den Körper einerseits vor körperfremden Krankheitserregern, andererseits vor entarteten körpereigenen Zellen zu schützen. Die Grundvoraussetzung hierfür ist ein Unterscheiden zwischen körperfremden Strukturen, die eliminiert werden müssen, und körpereigenen Strukturen, die nicht angegriffen werden dürfen. Diese Unterscheidung findet anhand von Oberflächenmolekülen statt – dem *major histocompatibility complex* (MHC) –, die von den bereits erwähnten HLA-Genen (s. Kapitel 1.1.3.1.a)) codiert werden.

Unterteilt wird das Immunsystem in eine angeborene, unspezifische Abwehr und eine erworbene, spezifische Abwehr. Die unspezifische Abwehr umfasst mechanische Barrieren wie Haut und Schleimhäute, die Zellen des unspezifischen Abwehrsystems wie Makrophagen, Granulozyten und Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen), die gegen Krankheitserreger mit unspezifischen Abwehrmechanismen wie Phagozytose vorgehen, und schließlich das Komplementsystem, eine Signalkaskade aus 30 Proteinen (Beck and Habicht 1996).

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch eine spezifische Abwehr mittels Antikörpern aus, die speziell gegen die zu zerstörende Struktur gerichtet sind, und durch die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung. Es umfasst T- und B-Lymphozyten, die in inaktiver Form im Blut und im lymphatischen System zirkulieren und durch Antigenkontakt (präsentiert durch spezielle Antigen-präsentierende Zellen [APC] wie Makrophagen) aktiviert werden. B-Lymphozyten differenzieren sich bei Antigenkontakt weiter zu Plasmazellen, die in der Lage sind, speziell gegen das Antigen gerichtete Antikörper zu produzieren. Ein DNA-basierter Mechanismus ermöglicht außerdem die Bildung von B-Gedächtniszellen, die beim nächsten Kontakt mit demselben Antigen eine effektivere Immunantwort durch schnellere Produktion spezifischer

Antikörper gewährleisten (Beck and Habicht 1996). Außer der Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, verfügen B-Zellen über weitere wichtige Funktionen: Sie können selbst als antigenpräsentierende Zellen fungieren und sind dazu in der Lage, Interleukine zu produzieren (Mauri and Bosma 2012). Durch die Produktion des antiinflammatorischen IL-10 beispielsweise üben B-Zellen eine immunregulatorische Funktion aus und sind *in vitro* in der Lage, Experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE), Kollagen-induzierte Arthritis und Colitis einzudämmen (Mauri and Bosma 2012).

Die zweite wichtige Zellpopulation des erworbenen Immunsystems sind die T-Lymphozyten, die für die Aktivierung bzw. Zell-Zell-Interaktion auf der Oberfläche den T-Zell-Rezeptor (TCR) besitzen. Dieser T-Zell-Rezeptor besteht bei den meisten humanen T-Zellen aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette. Die T-Zell-Aktivierung erfolgt einerseits durch Interaktion des TCR mit Antigenen, die über MHC-II-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden, andererseits durch die Interaktion von Costimulantien (Teile pathogener Keime, Reste zerfallener Zellen, Hitzeschockproteine und andere Moleküle) auf der Oberfläche von T-Zellen und APC. Diese Costimulation ist zwingend notwendig, da die Aktivierung durch einen Signalweg alleine zur Anergie der T-Zellen führt. Dieser Mechanismus soll eine überschießende T-Zell-Reaktion verhindern (Smith-Garvin, Koretzky et al. 2009).

T-Zellen nehmen, abhängig vom T-Zell-Subtyp, nach ihrer Aktivierung eine große Zahl an Aufgaben wahr, wie die Sezernierung verschiedener Zytokine. CD4-positive T-Helfer-Zellen differenzieren sich zu verschiedenen Subtypen und unterstützen die B-Zellen bei der Antikörperproduktion, fördern die Bildung von B-Gedächtniszellen und die Aktivierung anderer Immunzellen wie zytotoxischer T-Zellen und Makrophagen (Olson, Sallam et al. 2013). T-Gedächtnis-Zellen sorgen – vergleichbar mit den B-Gedächtniszellen – bei einer weiteren Infektion mit dem gleichen Krankheitserreger für eine effizientere Immunantwort (Cui and Kaech 2010). CD8-positive zytotoxische T-Zellen initiieren nach MHC-I-vermittelter Antigenpräsentation die Zerstörung von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. T-Suppressorzellen dämpfen die T-Zell-vermittelten Reaktionen gegen Ende der Immunantwort (Hall 2015). Die

Vermittlung zwischen angeborener und erworbener Immunantwort geschieht durch komplexe Mechanismen, an denen nicht nur zahlreiche Zellen (dendritische Zellen, Makrophagen, Monozyten oder B-Zellen) beteiligt sind, sondern ebenso Botenstoffe, die als Zytokine bezeichnet werden. Zytokine sind kleine Proteine bzw. Peptide, die Wachstum und Differenzierung einer Vielzahl an Zellen regulieren und dabei teilweise synergistisch, teilweise antagonistisch (beispielsweise inflammatorisch oder anti-inflammatorisch) wirken. Diese Peptide agieren rezeptorvermittelt und lassen sich in fünf Hauptgruppen unterteilen: Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und Kolonie-stimulierende Faktoren (Han, Lou et al. 2001).

Ein eindrückliches Beispiel für die mannigfaltigen Auswirkungen der Zytokinsekretion stellt die Differenzierung von T-Helfer-Zellen dar: APCs sezernieren Zytokine, welche die Differenzierung von T-Helfer-Zellen in TH1-Zellen und TH2-Zellen bewirken. TH1-Zellen sezernieren Zytokine wie IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ , die zellvermittelte Immunprozesse wie die Aktivierung von Makrophagen bewirken, während TH2-Zellen v.a. IL-4, IL-5 oder IL-13 sezernieren und dadurch die humorale Immunabwehr, u.a. in Form von B-Zell-Aktivierung, herbeiführen. Dadurch sind die APCs und die Zytokine essentiell für die Vermittlung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Bei der Untersuchung von Neuroinflammation im Rahmen autoimmuner Prozesse wie der EAE ergaben sich Hinweise, dass die Zytokinausschüttung durch APCs für die Entstehung autoreaktiver T-Helfer-Zellen verantwortlich ist (Gutcher and Becher 2007).

Den Zytokinen kommt womöglich ebenso eine Schlüsselrolle bei der immunologischen Pathologie der PD zu, da zahlreiche Studien und Untersuchungen veränderte Zytokinspiegel in verschiedenen Körperflüssigkeiten bei PD sowie eine veränderte Zytokinproduktion von stimulierten Immunzellen bei PD entdeckt haben (für Details hierzu siehe Kapitel „1.2. Biomarker bei PD: bisherige Erkenntnisse“). Ebenso liegt wahrscheinlich ein Ungleichgewicht zwischen angeborener und erworbener Immunabwehr bzw. eine fehlgeleitete Vermittlung zwischen diesen beiden Komponenten des Immunsystems bei PD vor.

#### 1.1.4.1.b) Neuroinflammation

Die Beteiligung von Immunprozessen bei Neurodegeneration ist dank zahlreicher Studien heute weitgehend akzeptiert (Nguyen, Julien et al. 2002). Im Tierversuch wurde Neuroinflammation u.a. durch die intrathekale Injektion von Lipopolysacchariden erzeugt (Zheng, Yang et al. 2013). Lipopolysaccharide (LPS) sind Lipide mit mehreren Saccharidketten, die sich an der äußeren Membran gramnegativer Bakterien befinden und starke Immunreaktionen im menschlichen Organismus auslösen können (Moran, Prendergast et al. 1996). Daraus resultiert eine Beeinträchtigung der autophagolytischen Prozesse, wodurch es zu einem Untergang dopaminergener Neuronen im Mittelhirn kommt (Zheng, Yang et al. 2013), so dass zum Beispiel bei Mäusen parkinsonähnliche Symptome ausgelöst werden (Tanaka, Ishii et al. 2013). Eine Schlüsselrolle bei der Neuroinflammation kommt der Mikroglia, den phagozytischen Immunzellen des ZNS, zu. Unter normalen Umständen interagiert die Mikroglia rezeptorvermittelt mit den Neuronen (Perry, Nicoll et al. 2010), um das Mikromilieu des ZNS zu überwachen (Kaushik and Basu 2013). Angemessene Stimuli für die Aktivierung der Mikroglia sind *damage-associated molecular pattern molecules* (DAMPs) – beispielsweise Hitzeschockproteine, DNA, Histone und andere Moleküle, die bei Zelluntergang freigesetzt werden –, die den nicht aktiven Mikroglia-Phänotyp in die aktive Form überführen. Diese aktivierten mikroglialen Zellen können anhand ihrer Morphologie identifiziert werden und finden sich in von PD betroffenen Gehirnen (Perry, Nicoll et al. 2010).

Unabhängig von der Ätiologie der Erkrankung spielt die Mikroglia eine wichtige Rolle bei PD. Sie nimmt sowohl Aufgaben des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems wahr. Nach ihrer Aktivierung sezerniert sie Zytokine bzw. Chemokine, die weitere Immunzellen anlocken und zur Komplementaktivierung führen; des Weiteren kommt es zur Freisetzung freier Radikale und Proteasen (Surendranathan, Rowe et al. 2015). Durch Zelluntergang werden Moleküle wie Adenosintriphosphat (ATP) oder Metalloproteinase-3 (MMP3) frei, wodurch weitere Mikrogliaaktivierung

angeregt wird (Wang, Liu et al. 2015). Das weiter oben angesprochene neurotoxische  $\alpha$ -Synuclein (siehe Kapitel „1.1.4. Pathogenese der PD“) induziert dopaminergen Zelluntergang ebenfalls mithilfe von Mikroglia-Aktivierung. In neuronalen Zellkulturen, die keine Mikroglia enthielten, führte die Exposition gegenüber  $\alpha$ -Synuclein bemerkenswerterweise nicht zum dopaminergen Zellverlust (Surendranathan, Rowe et al. 2015).

Eine weitere wichtige Zellart bei Neuroinflammation sind die Astrozyten. Diese Zellen sind die zahlreichsten im ZNS und essentiell für die Aufrechterhaltung des Mikromilieus und der Zellhomöostase. Außerdem tragen sie zur Neuroprotektion dopaminergischer Neurone bei (Hyman, Hofer et al. 1991, Lingor, Unsicker et al. 2000), indem sie eine Reihe von Neurotrophinen aufnehmen, speichern und durch Exozytose wieder freisetzen (Gimsa, Mitchison et al. 2013). Astrozyten sind immunkompetente Zellen, welche selbst MHC-II-Moleküle zur Antigenpräsentation exprimieren, die T-Zell-gesteuerte Immunantwort regulieren und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Faktoren produzieren können. Somit besitzen diese Zellen eine immunadaptierende Komponente. *Gimsa et al.* gehen davon aus, dass die anti-inflammatorische Komponente der Astrozyten im Falle von ausgeprägter Neuroinflammation überwiegt und diese Zellen dadurch eine Schutzfunktion ausüben können (Gimsa, Mitchison et al. 2013).

Berücksichtigt werden muss in Zusammenhang mit Neuroinflammation die privilegierte Stellung des ZNS gegenüber peripheren Geweben bezogen auf das Immunsystem. Durch *tight junctions* und andere Besonderheiten der Epithelien der Blut-Hirn-Schranke ist das ZNS nicht unmittelbar von peripheren (Entzündungs-)Geschehen betroffen. Jedoch kann nicht davon ausgegangen werden, dass das ZNS gänzlich unangiert bleibt. Erwiesenermaßen bewirken chronische Entzündungen des Gastrointestinaltrakts oder die Besiedelung mit *Helicobacter pylori* eine Verschlechterung der motorischen PD-Symptome (Wang, Liu et al. 2015). Neuroinflammation schädigt die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und ermöglicht den Übertritt von peripheren Toxinen und Entzündungsprozessen ins ZNS (Stone, Reynolds et al. 2009). Mikroskopische Veränderungen in der Anatomie von Hirnkapillaren wurden in diesem

Zusammenhang bereits beschrieben (Hirsch and Hunot 2009). Ergänzend hierzu wurde das Übertreten von T-Lymphozyten aus der Peripherie durch die intakte Blut-Hirn-Schranke ins ZNS nachgewiesen (Hickey, Hsu et al. 1991). Die TNF- $\alpha$ -Sekretion der Mikroglia bei AD bewirkt die Produktion des chemotaktischen IL-8 durch die Endothelien der Blut-Hirn-Schranke, wodurch rezeptorvermittelt die Migration von T-Lymphozyten aus der Peripherie ins ZNS ermöglicht wird (Liu, Guo et al. 2010). Ähnliche Prozesse könnten bei PD eine Rolle spielen.

Entzündungsprozesse, die im ZNS stattfinden, dürfen allerdings nicht nur als schädlich angesehen werden. Möglicherweise übt die aktivierte Mikroglia zumindest zu Erkrankungsbeginn eine Schutzfunktion aus und erst die Chronifizierung verursacht Schaden (Wang, Liu et al. 2015). Weitere Nachforschungen bezüglich der protektiven und schädlichen Funktion der Neuroinflammation bei neurodegenerativen Erkrankungen wie PD sind in jedem Fall notwendig.

#### **1.1.5. Pathologie**

Wie bereits in Kapitel „1.1.4. Pathogenese der PD“ erwähnt, spielt die Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein bei der Pathogenese der Erkrankung eine wichtige Rolle. Der Einfluss des Immunsystems spiegelt sich ebenso in der Pathologie wider. Das mikroskopische Erscheinungsbild von PD ist charakterisiert durch die sog. Lewy-Körper. Hierbei handelt es sich um Proteinaggregate, die hauptsächlich aus  $\alpha$ -Synuclein bestehen und sich im neuronalen Zellsoma finden (Spillantini, Schmidt et al. 1997, Baba, Nakajo et al. 1998). Die pathologischen Beobachtungen legen nahe, dass nicht die Menge an untergegangenen Neuronen und der Nachweis von Lewy-Körpern in den Somata (Hughes, Daniel et al. 1992, Tompkins and Hill 1997), sondern die Ablagerungen von  $\alpha$ -Synuclein insbesondere im synaptischen Bereich mit der Schwere der Erkrankung korrelieren (Schulz-Schaeffer 2010).

#### I.1.5.1. Pathologische Korrelate von Entzündungsvorgängen bei PD

Als histologische Korrelate der Entzündungsvorgänge bei PD befinden sich aktivierte Mikroglia im ZNS. Der aktivierte Mikroglia-Phänotyp zeichnet sich durch einen hypertrophierten Zellkörper und verkürzte, komplex verzweigte Zellausläufer aus (Perry, Nicoll et al. 2010). Bereits 1988 fand man diese aktivierten Mikroglia postmortem in der Substantia nigra von PD-Patienten (McGeer, Itagaki et al. 1988). Entzündungskorrelate in Form von Serumparametern werden aufgrund ihrer Bedeutung für diese Arbeit gesondert weiter unten besprochen.

#### 1.1.6. Klinisches Bild der PD

PD ist gekennzeichnet durch ein heterogenes klinisches Bild aus motorischer und nicht-motorischer Symptomatik. Trotz gewisser Gemeinsamkeiten geht man davon aus, dass verschiedene PD-Subtypen existieren. Diese Theorie fügt sich in die Vermutung, dass der Erkrankung unterschiedliche Entstehungsmechanismen zugrunde liegen (siehe Kapitel „1.1.4. Pathogenese der PD“) (van Rooden, Colas et al. 2011). Eine bislang weit verbreitete Einteilung von PD erfolgt in drei klinische Subtypen: den akinetisch-rigiden PD-Typ, den tremordominanten Typ und den Äquivalenztyp (Thenganatt and Jankovic 2014).

In einem systematischen Review gingen *Thenganatt et al.* von zwei klinischen Haupttypen aus: dem tremordominanten PD und PD mit posturaler Instabilität und Gangschwierigkeiten (*PD with postural instability and gait difficulty*, PIGD). Bezüglich des Erkrankungsbeginns ergaben sich zwei Typen: PD mit frühem Beginn (*young onset PD*, YOPD) – Erkrankungsbeginn mit 20-40 Jahren – und PD mit spätem Beginn (*Late onset PD*, LOPD) (Thenganatt and Jankovic 2014). Innerhalb dieser Subtypen fanden sich in der Bildgebung verschiedene Verteilungsmuster von Lewy-Körpern und Proteinaggregaten und andere distinkte Untersuchungsbefunde, die auf eine spezifische Ätiopathogenese für einzelne klinische Subtypen hinweisen könnten.

Desweiteren fand sich ein spezifischer Phänotyp für PD, bei dem Mutationen im *LRRK2*-Gen ursächlich sind. Dieser Subtyp zeichnet sich durch

asymmetrischen Beginn und Tremor und geringerem Risiko für kognitive Einschränkung aus (Thenganatt and Jankovic 2014).

*Van Rooden et al.* analysierten eine Kohorte von über 400 PD-Patienten mittels Cluster-Analyse und identifizierten vier PD-Cluster, die sich u.a. bezüglich Erkrankungsalter und klinischem Symptomschwerpunkt unterschieden. Höheres Alter scheint assoziiert zu sein mit rascherem Fortschreiten der Erkrankung, mit posturaler Instabilität und Gangschwierigkeiten, kognitivem Abbau und Halluzinationen (van Rooden, Colas et al. 2011).

#### 1.1.6.1. Motorische Symptomatik

Unter der typischen PD-Symptomatik versteht man das Vorhandensein von Bradykinese, Rigor, posturaler Instabilität und/oder Tremor. Klassischerweise wird die PD-Diagnose bei Vorliegen von Bradykinese in Verbindung mit Rigor oder Tremor oder beidem gestellt (Berg, Lang et al. 2013). Das Voranschreiten der Symptome variiert interindividuell und intraindividuell stark. Ein Merkmal des fortgeschrittenen Krankheitsbildes ist das Auftreten von *freezing* bei einer Vielzahl von Patienten, i. e. eine vorübergehende Unfähigkeit zur Initiation von Schrittbewegungen oder eine Unterbrechung des Vorangehens (Fling, Cohen et al. 2014). Bradykinese und Muskelrigidität nehmen im Krankheitsverlauf in der Regel zu und machen es den Betroffenen mit der Zeit schwer oder gar unmöglich, sich ohne Hilfsmittel fortzubewegen. Die posturale Instabilität, die durch medikamentöse Therapie nicht oder kaum beeinflusst werden kann, nimmt zu und verursacht erhöhte Sturzgefahr (Benzinger, Rapp et al. 2014). Der Grad der Behinderung wird wesentlich durch die Verschlechterung der motorischen Symptome bestimmt. Im Endstadium der Erkrankung führt die Bewegungseinschränkung schließlich zu Pflegebedürftigkeit und Bettlägerigkeit (Poewe 2006).

#### 1.1.6.2. Nicht-motorische Symptomatik

Noch mehr Heterogenität als die motorische Symptomatik zeigt das Spektrum an nicht-motorischen Symptomen. Eine Vielzahl an autonomen, psychiatrischen

und anderen Beschwerden ergänzen das Krankheitsbild nicht nur, sondern haben das Potential, als Diagnoseparameter für die Früherkennung der Erkrankung zu dienen. Erste motorische Symptome treten bei Verlust von 60% der dopaminergen Zellen zutage und können deshalb nicht als Früherkennungsmerkmale genutzt werden, wohingegen die aktuelle Studienlage darauf hindeutet, dass ein Teil der nicht-motorischen Symptome den motorischen um Jahre vorausgehen kann (Berg, Lang et al. 2013).

#### 1.1.6.2.a) Olfaktorische Dysfunktion

Die Beeinträchtigung des Riechvermögens gehört zu den Frühsymptomen von PD. Sie geht der motorischen Einschränkung voraus und manifestiert sich bei ca. 85% der Betroffenen (Goldman and Postuma 2014). Prospektive Follow-up-Studien ermittelten für gesunde Probanden mit eingeschränktem Riechvermögen eine Odds ratio (OR) von 3.94 bezüglich der Entwicklung von PD im Vergleich zu Normosmikern, wobei der Verlust der olfaktorischen Wahrnehmung dem Beginn der motorischen Symptome durchschnittlich vier Jahre vorausging (Berg, Marek et al. 2012). Die Zeitangaben bezüglich des Auftretens von Riechverlust bis zum Beginn der motorischen Manifestation variiert je nach Studie zwischen 2 bis 8 Jahren (Goldman and Postuma 2014). Pathologisch korrelieren diese Studienergebnisse mit der Beobachtung, dass Lewy-Körper im Bulbus olfactorius zu finden sind (Ubeda-Banon, Saiz-Sanchez et al. 2010). Es wurden bereits Unterschiede zwischen einzelnen PD-Subtypen bezüglich des Riechvermögens, beziehungsweise dessen Einschränkung, festgestellt (Iijima, Kobayakawa et al. 2011).

#### 1.1.6.2.b) REM-Schlaf-Verhaltensstörung

Das Ausagieren von Traumgehalten in Form von Sprechen bzw. Schreien und Bewegungen aller Art bis hin zum Verlassen der Schlafstätte gilt als wichtigstes Frühzeichen von PD. Die quantitativen Angaben über die Risikozuschreibung für die Entwicklung von PD bei Vorliegen einer *rapid eye movement*-Schlaf-Verhaltensstörung (REM-Schlaf-Verhaltensstörung) variieren jedoch von Studie

zu Studie (Goldman and Postuma 2014). Prospektive Studien geben an, dass 50% der Patienten, die an REM-Schlaf-Störungen leiden, im Verlauf an PD erkranken (Postuma, Lang et al. 2012). Insgesamt finden sich REM-Schlaf-Störungen bei ca. 38% der PD-Patienten (Bjornara, Dietrichs et al. 2014).

#### 1.1.6.2.c) Psychiatrische Störungen

Depression und Angststörungen gehören sowohl zur Klinik der sich bereits motorisch manifestierten Erkrankung als auch zur Frühsymptomatik vor dem Auftreten der motorischen Symptome. So entwickelt sich bei rund 30% der Patienten mit motorischer PD-Symptomatik eine der genannten psychiatrischen Störungen meist früh im Krankheitsverlauf. Ebenso liegen Daten vor, die nahelegen, dass das Vorkommen von Depression und Angststörung als Frühsymptom oder Risikofaktor gesehen werden kann. In Bezug auf Angststörung bzw. ängstliche Persönlichkeiten gibt es Hinweise, dass die Persönlichkeitsstruktur von PD-Patienten geprägt ist von vorsichtigerem Verhalten und dem Vermeiden von Risiken im Allgemeinen, wobei es sich hier um ein Symptom im Frühstadium handeln könnte, aber ebenso um einen Risikofaktor, da dieses Verhalten oft retrospektiv im Jugendalter von Patienten gefunden wird (Goldman and Postuma 2014).

#### 1.1.6.2.d) Autonome Dysfunktionen

Autonome Funktionsstörungen bei PD sind vielfältig und umfassen u.a. gesteigerten Speichelfluss, Verdauungsprobleme v. a. in Form von Obstipation, Harninkontinenz, orthostatische Dysfunktion und pathologische Herzfrequenzvariabilität (Goldman and Postuma 2014). Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass es sich bei Obstipation weder um eine Folge noch um ein Prodromalsymptom der Erkrankung, sondern um eine Ursache handeln könnte. Studien berichten von einer 2.5-fach erhöhten Wahrscheinlichkeit an PD zu erkranken bei Stuhlfrequenzen von weniger als einmal pro Tag (Savica, Carlin et al. 2009). Durch eine verminderte Aktivität des Gastrointestinaltrakts könnte es zum vermehrten Durchtritt bakterieller Toxine

durch die Darmwand kommen, wodurch eine chronische Entzündungssituation entsteht, die letztendlich zur Aktivierung der Mikroglia führt (Khalif, Quigley et al. 2005, Perry, Nicoll et al. 2010).

#### 1.1.6.2.e) Störungen der Impulskontrolle

14% aller behandelten PD-Patienten weisen Störungen der Impulskontrolle in Form von übermäßigem Kauf-, Glücksspiel- oder Sexualverhalten auf. Hierbei besteht nicht nur eine Assoziation zu dopaminergem Medikation, sondern auch zu Risikofaktoren wie einer positiven Familienanamnese für Suchtverhalten oder jüngerem Alter bei Erkrankungsbeginn (Goldman and Postuma 2014).

#### 1.1.6.2.f) Kognitive Einschränkungen, Demenz

Je nach Studie zeigen 19-36% der untersuchten PD-Patienten milde kognitive Einschränkungen bereits zum Zeitpunkt der Erstdiagnose. Prospektive Studien stellten einen Anstieg der Rate an kognitiv eingeschränkten Patienten im Krankheitsverlauf fest, zusätzlich fand sich bei diesen Patienten eine schwerwiegendere motorische Symptomatik (Goldman and Postuma 2014). Die Demenzrate ist im Vergleich zur Gesamtbevölkerung für PD-Patienten zwei- bis sechsmal höher, wobei die Wahrscheinlichkeit mit der Dauer der Erkrankung ansteigt. Aufgrund variierender diagnostischer Kriterien und Untersuchungsmethoden sind die Angaben über den Gesamtanteil an Demenzkranken unter den PD-Patienten uneinheitlich, *Aarsland et al.* gehen in einem systematischen Review von einem Anteil zwischen 25 bis 30% aus. Als Risiken für die Entwicklung einer Demenz im Rahmen einer PD-Erkrankung gelten verschiedene Faktoren, unter anderem fortgeschrittenes Alter bei Erkrankungsbeginn, das Vorhandensein kognitiver Einschränkungen bei Erstdiagnose und verschiedene psychiatrische Symptome. Demenz stellt bei PD den wichtigsten Faktor in Bezug auf Einschränkung der Lebensqualität und Heimeinweisung dar (Caballol, Marti et al. 2007). Der Demenzentstehung bei PD liegen höchstwahrscheinlich verschiedene Prozesse zugrunde. Unter anderem kann die Amyloid- $\beta$ -Ablagerung, die auch bei AD stattfindet, mit

Demenz bei PD in Verbindung gebracht werden: niedrigere Spiegel des Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ )<sub>1-42</sub>-Peptids im Liquor von PD-Patienten sind mit rascherem kognitiven Abbau assoziiert. Man geht davon aus, dass diese erniedrigte  $A\beta$ -Konzentration eine gleichzeitige Amyloid-Ablagerung im Gewebe widerspiegelt (Siderowf, Xie et al. 2010, Berg, Lang et al. 2013).

## **1.2. Biomarker bei PD: bisherige Erkenntnisse**

Wie an vorheriger Stelle bereits erwähnt, stützt sich die Diagnose von PD auf das Vorhandensein bestimmter klinischer Symptome. Zusätzlich werden bildgebende Verfahren wie transkranielle Ultraschalldiagnostik oder nuklearmedizinische Verfahren eingesetzt, um die Richtigkeit der Diagnose zu bestätigen (Brooks 2010). Zusätzlich wird nach Biomarkern gesucht, die die Krankheit definieren, vorhersagen und deren Ablauf abbilden können. Dies würde sowohl die Möglichkeiten der Frühdiagnostik erweitern, als auch Einfluss auf die Etablierung von Therapien haben, da insbesondere die Abbildung der Progression mit den bisher klinisch vorhandenen Skalen (z. B. *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*, UPDRS) und den üblichen Anamnesemethoden nur ungenau möglich ist (Mielke and Maetzler 2014).

Ein Biomarker sollte dazu geeignet sein, PD zu einem frühen Zeitpunkt zu erkennen, idealerweise vor Auftreten der ersten Symptome, um den Therapiebeginn in einem Stadium mit geringem dopaminergen Neuronenverlust zu ermöglichen und so die Prognose zu verbessern. Ebenso können Biomarker dazu dienen, die Effektivität einer Therapie nachzuweisen (Saracchi, Fermi et al. 2014).

Zahlreiche Studien haben sich mit der Suche nach messbaren Parametern zur Diagnostik von PD in Liquor, Blut und anderen Körperflüssigkeiten befasst. Trotzdem war es noch nicht möglich, geeignete Biomarker im klinischen Alltag zu etablieren (Mielke and Maetzler 2014).

### 1.2.1. Veränderungen im Liquor von PD-Patienten

Bis dato gibt es keine Biomarker im Liquor für die PD-Diagnose, die es in die klinische Anwendung geschafft haben. Trotzdem konnten bemerkenswerte Veränderungen im Liquor von PD-Patienten bzw. PD-Subtypen beobachtet werden, die ebenso interessant sind im Hinblick auf neuroinflammatorische Vorgänge (Garcia-Esparcia, Llorens et al. 2014): erhöhte Konzentrationen an Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, TNF- $\alpha$ ) von PD-Patienten gegenüber gesunden Kontrollprobanden konnten im Liquor nachgewiesen werden (Reale, Greig et al. 2009).

Die Liquorkonzentration von  $\alpha$ -Synuclein war in diesem Zusammenhang ebenso Gegenstand zahlreicher Studien. Die Messungen der Liquorkonzentrationen dieses Proteins bei PD-Patienten zeigen insgesamt eher Hinweise auf erniedrigte Werte im Vergleich zu Kontrollen, allerdings waren die Proteinkonzentrationen auch bei anderen  $\alpha$ -Synucleinopathien (Lewy-Körper Demenz und Multisystematrophie) erniedrigt, so dass sich dieses Protein alleine nicht als geeigneter differentialdiagnostischer Marker für PD erwies (Laske, Fallgatter et al. 2011, Malek, Swallow et al. 2014). In Zusammenschau mit lysosomalen Enzymen sind die  $\alpha$ -Synuclein-Konzentrationen für die PD-Diagnostik eventuell nützlicher: Aufgrund ihrer Studienergebnisse stellten *Parnetti et al.* die Hypothese auf, dass sich zur PD-Diagnostik aus dem Liquor am besten eine Verbindung aus dem Quotienten aus  $\alpha$ -Synuclein-Oligomeren im Verhältnis zum nativem  $\alpha$ -Synuclein, der  $\beta$ -Glukocerebrosidase-Aktivität und dem Alter der Patienten eignet (Parnetti, Chiasserini et al. 2014). Bei einer Studie mit 63 therapienaiven PD-Patienten im frühen Krankheitsstadium und 39 gesunden Kontrollen ließen sich Erkrankte von Gesunden anhand signifikant verminderter Liquorspiegel an A $\beta$ <sub>1-42</sub> und p-Tau<sub>181</sub> (phosphoryliertes Tau an Threonin 181),  $\alpha$ -Synuclein und dem T-Tau/ $\alpha$ -Synuclein-Quotienten unterscheiden (Kang, Irwin et al. 2013). Überdies zeigte sich eine Assoziation zwischen erniedrigten  $\alpha$ -Synuclein-Konzentrationen mit schwererer motorischer Symptomatik (Kang, Irwin et al. 2013).

Weitere Liquorkorrelate von Entzündungsvorgängen könnten konkrete klinische Verläufe abbilden (Thenganatt and Jankovic 2014). Die Liquorkonzentration an

C-reaktivem Protein (CRP) korreliert bei PD-Patienten mit der Schwere von Demenz und *fatigue* (Lindqvist, Hall et al. 2013), ebenso zeigte sich eine positive Korrelation des Liquor-IL-6-Spiegels mit Demenz (Yu, Zuo et al. 2014). Desweiteren fanden *Yu et al.* erhöhte Spiegel an OH-Radikalen und deuteten dieses Ergebnis als Korrelat der Mikroglia-Aktivierung, wodurch es konsekutiv zum Anstieg von oxidativem Stress kommt (Yu, Zuo et al. 2014). Hinzu kommt, dass *in vivo* bereits nachgewiesen werden konnte, dass das wichtigste Puffersystem gegen oxidativen Stress, das Glutathion-System, bei Erkrankungen mit Lewy-Körper-Pathologie in der Substantia nigra kompromittiert ist, was die Neuronen im Rahmen inflammatorischer Vorgänge vulnerabler macht (Maetzler, Schmid et al. 2011). Ob dies ein Resultat der Erkrankung oder ein prädisponierender Faktor für die Entstehung von PD bzw. kognitivem Abbau bei PD ist, ist nicht geklärt.

Weitere Entzündungsmarker – u.a. CRP und IL-6 – waren innerhalb einer Kohorte von PD-Probanden signifikant erhöht und positiv korreliert mit der Schwere von Depressionen, Demenz bzw. kognitivem Abbau, Nervosität und Müdigkeit bei PD (Lindqvist, Hall et al. 2013). Zusätzlich waren bei PD-Patienten, die früh im Krankheitsverlauf an kognitiver Einschränkung und später an Demenz litten, niedrigere Konzentrationen an  $A\beta_{1-42}$  gefunden worden (Siderowf, Xie et al. 2010, Alves, Lange et al. 2014).

Bei einer Untersuchung von *Kang et al.* unterschied sich der akinetisch-rigide Subtyp vom Tremordominanz- und Äquivalenztyp durch signifikant niedrigere  $A\beta_{1-42}$ - und P-tau<sub>181</sub>-Konzentrationen von den Kontrollprobanden (Kang, Irwin et al. 2013). Diese Untersuchungen müssen noch an einer größeren Kohorte untersucht und verifiziert werden (Kang, Irwin et al. 2013), unterstützen jedoch die These, dass verschiedene PD-Subtypen existieren, denen verschiedene pathologische Prozesse zugrunde liegen und die sich anhand von Biomarkern unterscheiden lassen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich im Liquor gemessene Parameter bis dato nicht per se zur PD-Diagnose bzw. Definition von PD-Subtypen eignen, sich aber interessante Assoziationen zwischen einigen Liquor-Markern und klinischen Symptomen abzeichnen.

### 1.2.2. Veränderungen im Blut und in Blutbestandteilen von PD-Patienten

Blutparameter sind im Hinblick auf die wenig invasive Entnahmemethode und die kostengünstige Auswertung als mögliches Diagnostikum besonders attraktiv (Mielke and Maetzler 2014). Es wurden bereits zahlreiche Parameter auf ihre Tauglichkeit als Biomarker für die PD-Diagnose untersucht, wobei diejenigen Biomarker besonders im Fokus der Forschung liegen, welche die an vorheriger Stelle bereits erwähnten pathologischen Prozesse abzubilden vermögen. Die Serumkonzentration von  $\alpha$ -Synuclein beispielsweise ist aufgrund der Bedeutung des Proteins für die Lewy-Körper von besonderem Interesse. *Saracchi et al.* fanden eine Erhöhung des oligomeren  $\alpha$ -Synucleins bei PD-Patienten mit einer Spezifität von 85% gegenüber gesunden Kontrollen (Saracchi, Fermi et al. 2014), wobei dieses Ergebnis noch einer Bestätigung durch andere Studien bedarf.

Das Vorhandensein von oxidativem Stress bei PD lässt sich durch Blutparameter ebenso abbilden: Die mononukleären, peripheren Zellen (*peripheral blood mononuclear cells* [PBMCs]), die zum Immunsystem gehören, erzeugten höhere Spiegel an freien Radikalen, wenn sie von PD-Patienten stammten im Vergleich zu den PBMCs gesunder Kontrollen (Saracchi, Fermi et al. 2014).

Es existiert eine große Zahl weiterer Biomarker, die PD in Verbindung mit inflammatorischen Vorgängen bringen. In einer epidemiologischen Studie von *Ton et al.* bestand bei Männern ein Zusammenhang zwischen PD-Prävalenz und erhöhten weißen Blutkörperchen. In Bezug auf die PD-Inzidenz war bei Männern und Frauen ein niedriger CRP-Spiegel mit einem niedrigeren PD-Risiko assoziiert, bei Frauen zusätzlich eine niedrigere Konzentration an Fibrinogen (Ton, Jain et al. 2012).

Bei nicht therapierten PD-Patienten im frühen Stadium fanden sich signifikant erhöhte Werte an *high-sensitivity CRP* (hs-CRP), dem empfindlichsten Marker für eine systemische Entzündungsreaktion (Song, Chung et al. 2011). *Stypula et al.* haben eine Erhöhung von IL-2 im Plasma von PD-Patienten gemessen (Stypula, Kunert-Radek et al. 1996). *Dobbs et al.* wiesen erhöhte

Konzentrationen an TNF- $\alpha$  und IL-6 nach (Dobbs, Charlett et al. 1999) und *Rentzos et al.* fanden signifikant erhöhtes IL-10 und IL-12 im Serum von PD-Patienten (Rentzos, Nikolaou et al. 2009). In weiteren Studien zeigten sich IL-4 und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) bei PD erhöht (Brodacki, Staszewski et al. 2008).

Bei Durchsicht der Studienlage ist darüber hinaus erkennbar, dass Biomarker nicht nur zur Diagnose von PD dienen könnten, sondern auch Voraussagen zu Symptomschwerpunkt oder Verlauf dieser sehr heterogenen Erkrankung erlauben: raschere Verschlechterung der kognitiven Leistung konnte mit niedrigen Serumspiegeln an *epidermal growth factor* (EGF) (Chahine, Stern et al. 2014) und erhöhten Plasmaspiegeln des löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptors assoziiert werden (Rocha, Teixeira et al. 2014). Signifikant erhöhte Serumspiegel an TNF- $\alpha$  fanden sich bei einem PD-Phänotyp, der hauptsächlich durch posturale und psychomotorische Probleme gekennzeichnet ist (Dobbs, Charlett et al. 1999), und waren in einer anderen Studien positiv korreliert mit kognitiver Beeinträchtigung, Schlafproblemen, Depression und einem höheren Beeinträchtigungsgrad bei Alltagsaktivitäten (Menza, Dobkin et al. 2010).

Eine Erhöhung des proinflammatorischen IL-6 fand sich in Korrelation zu zahlreichen Aspekten der PD wie stark verminderter kognitiver Leistung (Menza, Dobkin et al. 2010) und stärkerer Beeinträchtigung bei Alltagsaktivitäten in Form von geringeren Werten bei der Untersuchung mittels der *activities of daily living*-Skala (Hofmann, Schuh et al. 2009). Außerdem waren erhöhte IL-6-Spiegel bei *Scalzo et al.* mit schlechteren Resultaten bei funktionellen Mobilitätstests, Gleichgewichtstests und einer geringeren Schrittgeschwindigkeit assoziiert. So wurden erhöhte IL-6-Spiegel mit ausgeprägtem Muskelabbau in Verbindung gebracht, was zu der bei PD vorkommenden Erschöpfung und längerfristig zu höherem körperlichem Behinderungsgrad führt (Scalzo, Kummer et al. 2010). Dieses Ergebnis wird durch die Studie von *Koziorowski et al.* untermauert, die eine positive Korrelation zwischen erhöhtem IL-6-Spiegel im Serum und der Hoehn-und-Yahr-Skala – also dem Schweregrad der Erkrankung – fanden (Koziorowski, Tomasiuk et al. 2012), wodurch IL-6 insgesamt als prognostisch ungünstiger Biomarker bei PD zu sehen ist. In epidemiologischen Studien ergaben sich

weitere interessante Ergebnisse bezüglich IL-6 und PD: erhöhte IL-6-Konzentrationen im Plasma konnten mit erhöhtem PD-Inzidenz-Risiko assoziiert werden (Chen, O'Reilly et al. 2008). In der umfangreichen Gesundheitsstudie von *Ton et al.* hatten Frauen mit höheren IL-6-Spiegeln eine erhöhte Wahrscheinlichkeit, an PD zu erkranken (Ton, Jain et al. 2012).

Interessanterweise wiesen PBMCs von PD-Patienten eine veränderte Zytokinproduktion auf, was auf eine unbalancierte bzw. insgesamt veränderte Immunantwort im Rahmen der Erkrankung schließen lässt. Bei *Reale et al.* war die Produktion von TNF- $\alpha$  erniedrigt, die von IL-1 $\beta$  gleichzeitig erhöht (Reale, Iarlori et al. 2009). Die Stimulation von PD-PBMCs mit LPS bei PD ergab eine signifikant verminderte Produktion von IL-2 und IFN- $\gamma$  im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Reale, Greig et al. 2009).

Allgemein gilt, dass aufgrund der hier geschilderten Veränderungen von Zytokinen v.a. im Blut und in Blutbestandteilen von PD-Patienten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Bedeutung dieser Marker unbedingt notwendig sind.

### **1.2.3. Veränderungen in anderen Körperflüssigkeiten von PD-Patienten**

Andere Körperflüssigkeiten wiesen ebenso Veränderungen bei PD-Patienten auf: eine Studie fand erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit von PD-Patienten, allerdings bestand keine Korrelation der TNF- $\alpha$ -Spiegel mit Parametern wie Erkrankungsdauer oder kognitiver Einschränkung (Comoglu, Guven et al. 2013). *Saracchi et al.* fanden u.a. erniedrigte Konzentrationen von  $\alpha$ -Synuclein im Speichel von PD-Patienten (Saracchi, Fermi et al. 2014).

### **1.3. Arbeitshypothesen**

Es ergeben sich damit Hinweise, dass Konzentrationen von immunassoziierten Parametern in Körperflüssigkeiten, möglicherweise auch in Zusammenhang mit genetischen Veränderungen (wie beispielsweise einem genetischen „Inflammations-Risikoscore“), in der Lage sein können, zumindest bei einem

Teil der PD-Patienten relevanten Einfluss auf die Erkrankung auszuüben. Diese Arbeit verfolgt daher folgende Hypothesen:

- (i) Es lassen sich bei PD (Cluster von) klinische(n) Symptome(n)/ demographische(n) Variablen darstellen, die sich von anderen (Clustern von) klinischen Symptomen bzw. klinischen Erscheinungsbildern/ demographischen Variablen von PD abgrenzen lassen.
- (ii) Immunassoziierte Parameter in Körperflüssigkeiten, möglicherweise auch ein genetischer Inflammations-Risikoscore, sind mit den (Clustern von) klinischen Symptomen/demographischen Variablen assoziiert.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1. Die COEN-Studie**

Die COEN-Studie ist ein Kooperationsprojekt des Deutschen Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Tübingen und des *Canadian Institutes of Health Research* in Toronto, Kanada. In beiden Zentren wurden Analysen und Untersuchungen an Patienten bzw. deren Biomaterial vorgenommen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Untersuchungen, die in Tübingen vorgenommen wurden. Ziel der Studie war die Identifikation eines möglichen inflammatorischen PD-Endophänotyps. Hierzu wurden die klinischen Untersuchungsergebnisse und Biomaterial-Analysen von 206 Probanden berücksichtigt.

### **2.2. Anteil der Verfasserin am Projekt**

Die Verfasserin dieser Arbeit war verantwortlich für die telefonische und persönliche Rekrutierung der 218 Probanden im Vorfeld der Studie. Insgesamt evaluierte sie dafür knapp 480 Arztbriefe und Akten, und kontaktierte etwa 200 Probanden, um bei der endgültig eingeschlossenen Probandenanzahl zu enden (etwa weitere 200 wurden durch Medizinisch-technische Angestellte [MTA] der Arbeitsgruppe Neurogeriatrie kontaktiert). Weiter führte sie, abgesehen von der ärztlichen Tätigkeit im Rahmen der Studie, die Untersuchungen an den eingeladenen Probanden wie ab S. 37 beschrieben durch, inklusive Blutentnahme und Einlagerung von Serum- und EDTA-Blutproben im Hertie Institut für Klinische Hirnforschung (HIH) in Tübingen, praktisch vollumfänglich selbstständig. In 83 Fällen führte sie die Untersuchungen alleine durch; bei 68 Probanden handelte es sich um Patienten, die gleichzeitig in eine andere Studie der Arbeitsgruppe eingeschlossen waren, deren Untersuchungen zu Teilen mit denen der COEN-Studie identisch waren, weshalb die Untersuchungen in Zusammenarbeit mit einer anderen Doktorandin der Arbeitsgruppe Neurogeriatrie durchgeführt wurden. Die Untersuchungen an ca.

75 weiteren Probanden wurden von MTA der Arbeitsgruppe Neurogeriatrie durchgeführt.

Die Verfasserin führte nach entsprechender Anleitung selbstständig eine Probenmessung von Zytokinen in – bereits in der Biobank vorliegenden – Blutproben von 150 PD-Patienten und Kontrollen anhand eines kommerziell erhältlichen ELISAs (Bio-Plex Pro Immun Assays®) durch. Hierfür wurden Entzündungsmarker ausgewählt, die bereits in anderen Studien einen Zusammenhang mit PD zeigten: IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Stypula, Kunert-Radek et al. 1996, Brodacki, Staszewski et al. 2008, Hofmann, Schuh et al. 2009, Rentzos, Nikolaou et al. 2009, Scalzo, Kummer et al. 2010). Diese Untersuchungen waren die Grundlage für die Ausrichtung des Projekts an einer rein prospektiven Kohorte wie hier beschrieben. Die endgültigen Messungen, die in diese Arbeit einfließen, wurden aus logistischen Gründen in Kooperation mit anderen Kooperationspartnern erhoben.

Es ist an dieser Stelle zu erwähnen, dass die Verfasserin der Arbeit in die Erhebung einer Vielzahl von Parametern miteingebunden war, die in der aktuellen Auswertung und Doktorarbeit aufgrund der Komplexität der Fragestellung nicht berücksichtigt werden konnten. Diese Daten werden in zukünftigen Publikationen Beachtung finden, in denen die Verfasserin auch als Koautor mitberücksichtigt werden wird. Zwei dieser Arbeiten sind derzeit eingereicht. Das Protokoll der Studie wird daher im Folgenden etwas detaillierter dargestellt werden. Die aktuell vorgelegte Auswertung ist noch nicht zur Publikation eingereicht, weil eine Validierungsstudie mit dem Kooperationspartner innerhalb des COEN-Projekts, *University Health Network, University of Toronto* unter Prof. Connie Marras, Anthony Lang und Antonio Straffela durchgeführt wird und die Ergebnisse kumuliert publiziert werden. Die Verfasserin der Arbeit hat daher auf diesen Prozess keinen direkten Einfluss.

### **2.3. Rekrutierung**

Mögliche Probanden, die als PD-Patienten in der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen und im HIH in Tübingen bekannt waren und die Kriterien für das idiopathische PD erfüllten, wurden telefonisch kontaktiert. Die

Arztbriefe von knapp 480 Patienten, die im HIH und in der Neurologischen Universitätsklinik als PD-Patienten verzeichnet waren, wurden von der Verfasserin der Arbeit durchgearbeitet, um zu überprüfen, ob tatsächlich ein idiopathisches Parkinson-Syndrom vorlag (bei einigen der Patienten wurde im Verlauf ein anderes parkinsonähnliches Syndrom diagnostiziert), ob inzwischen eine Demenz manifest wurde oder der Patient verstorben war. Nach Prüfung der Akten standen rund 400 potentielle Probanden zur Verfügung (und waren unter der im HIH/in der neurologischen Universitätsklinik verzeichneten Telefonnummer noch erreichbar), die telefonisch kontaktiert und über den Ablauf und das Ziel der COEN-Studie informiert wurden. 218 Probanden erklärten sich zur Teilnahme bereit.

Vor der Untersuchung wurden sie noch einmal persönlich und ausführlich über Ziele und Risiken der Studie sowie über die Verwendung und Pseudonymisierung ihrer Daten und Untersuchungsergebnisse aufgeklärt; ihr Einverständnis wurde schriftlich festgehalten.

Die Probanden mussten die klinischen Kriterien des idiopathischen PD erfüllen (siehe Kapitel „1.1.1. Definition“), älter als 50 Jahre alt sein und durften an keiner manifesten Demenz leiden. Probanden wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, wenn das gemessene CRP im Serum über dem allgemein geltenden Normwert von 1.0 mg/dl lag, da davon ausgegangen werden musste, dass eine aktive Entzündung im Körper vor sich ging und Veränderungen anderer Entzündungsparameter nicht auf PD, sondern auf einen akuten Immunprozess im Körper zurückzuführen sein könnten. 12 Probanden wurden aus diesem Grund ausgeschlossen.

## **2.4. Klinische Untersuchung**

### **2.4.1. Allgemeine Angaben zur Person und Anamnese**

Die Probanden mussten allgemeine Angaben zur Person (Geschlecht, Geburtsdatum, Körpergröße und Körpergewicht, Familienstand und berufliche Situation) sowie zur Händigkeit (Rechtshänder, Linkshänder oder Beidhänder und ob auf die rechte Hand umgeschult wurde) und zum Tabakkonsum

(Nichtraucher, Raucher, ehemaliger Raucher, ggf. quantitativer Tabakkonsum) machen. Außerdem wurden sie nach Vorerkrankungen und deren Erstdiagnose, Allergien, Blasenschwäche, Obstipation, bleibenden Verletzungsfolgen und bisherigen Operationen gefragt. Die aktuelle Medikation der Probanden wurde notiert.

#### **2.4.2. PD-Verlauf**

Der bisherige Verlauf der PD wurde detailliert erfasst: Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer, ob die Krankheit medikamentös behandelt wird und ob diese Behandlung die Symptome verbessert hat. Außerdem wurde gefragt, ob und seit wann ein *wearing off* der Medikamentenwirkung und/oder Dyskinesien bestehen, ob Halluzinationen schon einmal in Verbindung oder ohne die Einnahme von PD-Medikation aufgetreten sind, ob und ggf. wann vor Beginn der PD die Diagnose einer Depression und/oder einer Angststörung gestellt wurde und ob nach Beginn der PD eine Depression und/oder Angststörung aufgetreten ist. In Form einer Liste wurde detailliert erfasst, ob der Proband unter einem bestimmten PD-Symptom litt (Tremor, Muskelsteifigkeit, veränderte Handschrift u.a.), wann das Symptom erstmalig auftrat oder ob es über einen begrenzten Zeitraum hinweg bestand. Desweiteren wurde gefragt, welches PD-Symptom zuerst auftrat. Zur Beurteilung der Erkrankungsschwere zum Untersuchungszeitpunkt wurde der *Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS)* im On-Stadium (d.h. nach Einnahme der verschriebenen PD-Medikation) erhoben (Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's 2003).

#### **2.4.3. Körperliche Untersuchung**

Eine allgemeine körperliche Untersuchung mit Hauptaugenmerk auf den neurologischen Status (Hirnnervenstatus, Reflexstatus, Motorik) wurde durchgeführt. Der Blutdruck wurde im Sitzen und drei Minuten nach dem Aufstehen gemessen.

#### **2.4.4. REM-Schlaf-Störung und Tagesmüdigkeit**

Zur Evaluation einer eventuell vorhandenen REM-Schlaf-Störung wurde der *REM Sleep Behaviour Disorder Screening Questionnaire (deutsche Version)* eingesetzt (Stiasny-Kolster, Mayer et al. 2007), zur Beurteilung von Tagesmüdigkeit die *Epworth Sleepiness Scale (Johns 1991)*.

#### **2.4.5. Beurteilung von Kognition/kognitiver Beeinträchtigung**

Zur Beurteilung von Kognition bzw. eventuell vorliegender kognitiver Beeinträchtigung wurde das *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)* verwendet (Dalrymple-Alford, MacAskill et al. 2010).

#### **2.4.6. Beurteilung des Tremors**

Zur Beurteilung eines vorliegenden Tremors wurde die *Tremor Rating Scale* herangezogen, bestehend aus klinischer Untersuchung des Tremors im Seitenvergleich der einzelnen Gliedmaßen in Ruhe und in Bewegung, Fragebögen zur Beeinträchtigung des Tremors bei Alltagsaktivitäten (Essen, Körperpflege, Handschrift u. a.) und einem Archimedes-Spiralzeichentest für beide Hände einzeln.

#### **2.4.7. Prüfung des Riechvermögens**

Das Riechvermögen wurde mithilfe eines Sniffin-Sticks-Tests mit 12 Geruchsstiften überprüft (Daum, Sekinger et al. 2000).

#### **2.4.8. Beurteilung von Stimmung/Gemütslage**

Zur Beurteilung der Stimmung bzw. des möglichen Vorliegens einer Depression wurde das Beck Depressions-Inventar (BDI) angewendet (Levin, Llabre et al. 1988), für eine Einschätzung zu Ängstlichkeit der Patienten das *State-Trait Anxiety Inventory* (Guillen-Riquelme and Buela-Casal 2014).

#### **2.4.9. Beurteilung von autonomen Störungen**

Ein weiterer Fragebogen, der von der Universität Leiden (Niederlande) entwickelte SCOPA-AUT (Visser, Marinus et al. 2004, van Rooden, Colas et al. 2011), wurde zur Quantifizierung von autonomer Dysfunktion verwendet: Fragen nach Schluckstörungen, erhöhtem Speichelfluss, gestörtem Sättigungsgefühl, Obstipation, Kontinenz und Harnproblemen, orthostatischen Problemen und Synkopen, Wärme- oder Kälteintoleranz, Erektions- und Ejakulationsschwierigkeiten (Männer) bzw. Scheidentrockenheit (Frauen) und Medikamenteneinnahme.

#### **2.4.10. Bewegungsanalyse mittels Accelerometer**

Zur Objektivierung der Motorik wurden standardisierte Messungen mit einem tragbaren Sensor (MiniMod Hybrid Sensor der Firma McRoberts®) durchgeführt. Der MiniMod Hybrid-Sensor wurde, eingebettet in einen Gürtel, am Probanden auf Höhe des 5. Lendenwirbelkörpers angebracht.

##### **2.4.10.1. Vorbereitung**

Der stehende Proband wurde aufgefordert, in 7er-Schritten, ausgehend von 172, zu subtrahieren. War das Rechnen in 7er-Schritten nicht möglich, rechneten die Probanden alternativ in 3er-Schritten. Die ersten zehn Rechenschritte und die dafür benötigte Zeit wurden notiert.

Auf einem Klemmbrett mit vorbereiteten Bögen musste der stehende Proband so schnell wie möglich in jedes der darauf gedruckten 32 Kästchen ein Kreuz einzeichnen. Dabei wurde die Zeit gestoppt.

##### **2.4.10.2. Get Up and Sit Down**

Der Proband nahm auf einem Stuhl mit Rückenlehne und ohne Armlehnen Platz, mit dem Rücken an die Lehne angelehnt. Die Füße befanden sich auf Klebestreifenmarkierungen am Boden, die auf der Innenseite 43 cm voneinander entfernt waren. Aus dieser Ausgangsposition wurde der Proband aufgefordert, ohne Aufstützen der Arme aufzustehen und sich wieder zu setzen. Beim Aufstehen wurde darauf geachtet, dass die Knie durchgestreckt waren. Beim Hinsetzen musste der Proband mit dem Rücken die Stuhllehne berühren.

In einem ersten Durchgang sollte der Proband in selbst gewähltem Tempo fünfmal hintereinander aufstehen und sich wieder setzen. Bei einem zweiten Durchgang bekam der Proband die Anweisung, dieselbe Aufgabe so schnell wie möglich auszuführen. Bei jedem der beiden Durchgänge wurde die benötigte Zeit mit einer Stoppuhr gemessen.

#### 2.4.10.3. Timed Up And Go Test

Der Proband nahm in derselben Position wie bei der vorherigen Messung auf dem Stuhl Platz. Die Aufgabe bestand darin, aufzustehen, den ersten Schritt mit dem linken Bein zuerst zu machen, in normaler, sicherer Geschwindigkeit bis zu einem auf dem Boden stehenden Eimer in drei Metern Entfernung zu gehen, um diesen Eimer herum eine Linksdrehung zu vollführen und zurück zum Stuhl zu gehen, um sich wieder – mit dem Rücken an die Lehne und den Füßen auf der Klebestreifen-Markierung – zu setzen. Bei einem zweiten Durchgang bekam der Proband die Anweisung, in schnellerer, aber für ihn immer noch sicherer Geschwindigkeit zu gehen. Die übrigen Rahmenbedingungen blieben unverändert. Bei jedem der beiden Durchgänge wurde die benötigte Zeit mit einer Stoppuhr gemessen.

#### 2.4.10.4. Gleichgewichtstest

Der Proband stand auf festem Boden im Semitandemstand (die linke Großzehenaußenseite berührte die rechte Ferse), so dass der rechte Fuß vor dem linken platziert war. War der Semitandemstand nicht möglich, war – je nach Verfassung des Probanden – alternativ der Semitandemstand mit 5 cm Abstand zwischen beiden Füßen, der geschlossene Stand (Füße parallel zueinander, die Innenseiten der Füße berühren sich) oder der offene Stand (Füße parallel zueinander, Fußaußenseiten schulterbreit auseinander) möglich. In dieser Ausgangsposition sollte der Proband zweimal für 30 Sekunden so ruhig wie möglich stehen – zunächst 30 Sekunden mit offenen Augen, danach 30 Sekunden mit geschlossenen Augen.

#### 2.4.10.5. Gehen geradeaus

Der Proband stand mit den Füßen schulterbreit auseinander an der Startlinie. Während jedes Durchgangs musste ein Klemmbrett vor dem Körper gehalten

werden, während der Proband einen 20 Meter langen Gang zu einer weiteren Markierung entlanggehen und dort – ohne sich umzudrehen – stehen bleiben sollte. Die Aufgabe bestand insgesamt aus vier Durchgängen:

1. Sicheres Gehen in normalem Tempo.
2. Sicheres Gehen in schnellem Tempo.
3. *Dual Tasking*: Sicheres Gehen in schnellem Tempo und gleichzeitig auf einem Bogen mit 32 vorgedruckten Kästchen auf dem Klemmbrett in so viele Kästchen wie möglich je ein Kreuz zeichnen.
4. *Dual Tasking*: Sicheres Gehen in schnellem Tempo und dabei laut in 7er Schritten rückwärts rechnen, ausgehend von 419 oder 392. Die Rechenschritte wurden vom Untersucher simultan notiert.

Bei jedem Durchgang wurde die benötigte Zeit mit einer Stoppuhr gemessen (Kleinhans 2014).

## **2.5. Biomaterial**

Biomaterial in Form von EDTA- und Serumblutproben wurden entnommen und in die lokale Biobank eingespeist (<http://www.hih-tuebingen.de/ueber-uns/core-facilities/biobank/>), wo die Proben direkt nach der Entnahme bei 2000g und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert, anschließend aliquotiert und schließlich bei -80°C eingelagert wurden. Die Probanden wurden über die Einlagerung ihrer Blutproben in der Biobank des HIH nach Vorgabe aufgeklärt, und sie gaben ihr schriftliches Einverständnis. Eine EDTA- und eine Heparin-Probe wurden direkt im Anschluss an die Entnahme ins Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen versandt.

## **2.6. DNA-Analysen**

Anhand der Daten aus Metaanalysen von GWAS (International Parkinson Disease Genomics, Nalls et al. 2011) ermittelte Peter Holmans von der Cardiff University SNPs, die für PD als relevant identifiziert wurden, und führte eine *pathway based analysis* durch. Zehn von zwölf *pathways*, die hierbei gefunden wurden, waren immunrelevant: die Regulation der Leukozytenaktivierung

(GO:2694); erhöhte Anfälligkeit für Infektionen (MGI:2406); Aktivierung von Regulatorzellen (GO:50865); Masern (KEGG:5162); die Zytokin-vermittelte Signalkaskade (GO:19222); die JAK-STAT-Signalkaskade (KEGG:4630); positive Regulation der Leukozytenaktivierung (GO:51251); positive Regulation der Leukozytenaktivierung (GO:2696); zelluläre Antwort auf Zytokin-Stimuli (GO:71345).

114 SNPs standen nach Prüfung auf mögliche Störfaktoren wie Kopplungsungleichgewicht (engl.: *linkage disequilibrium*) und nach einer Qualitätskontrolle zur Genotypisierung zur Verfügung. Die DNA-Proben der Probanden wurden von Peter Lichtner vom Helmholtz Institut in München mittels *in silico assay design evaluation programme* auf diese SNPs untersucht. Ein Score für die Probanden wurde durch Claudia Schulte, HIH Tübingen, erstellt.

In diesen Score fließen Effektgröße und Anzahl der vorhandenen Risiko-SNPs mit ein. Die Effektgröße hing von den Daten aus den Metaanalysen ab und errechnet sich aus dem natürlichen Logarithmus ( $\ln$ ) der *Odds ratio* (OR) des jeweiligen SNP (International Parkinson Disease Genomics, Nalls et al. 2011) – also dem Risiko, im Vergleich zu Gesamtbevölkerung bei Vorhandensein des SNP an PD zu erkranken. Hierbei hat jeder SNP eine spezifische Effektgröße (da die jeweiligen SNPs mit unterschiedlichem PD-Risiko assoziiert sind).

Ist z. B. die Effektgröße für Allel XY 0.3 und der entsprechende Proband homozygot für dieses Risikoallel, entspricht das einem Score von  $2 \times 0.3 = 0.6$ ; ist der Proband jedoch heterozygot für das Risikoallel, wäre das ein Score von  $1 \times 0.3 = 0.3$ .

Zur Berechnung des entgeltigen Scores wurden die Effektgrößen aller SNPs summiert und durch die Anzahl der genotypisierten Allele dividiert, um Fehler aufgrund fehlender Genotypen zu vermeiden.

Liegen bei einem Probanden beispielsweise bei Variante A das Risikoallel mit einer Effektgröße von 0.3 homozygot vor und bei Variante B das Risikoallel mit einer Effektgröße von 0.1 heterozygot, wird der Score wie folgt berechnet:  $0.3 \times 2 + 0.1 \times 1 = 0.7$ . Da in diesem Beispiel zwei genotypisierte Varianten vorliegen,

wird das Ergebnis durch zwei dividert und der Proband erhält auf dem Risikoscore ein errechnetes genetisches PD-Risiko von 0.35.

Da in den Score nur Risiko-, jedoch keine protektiven Allele miteinfließen, hat jeder Proband in diesem Modell ein (mehr oder weniger) erhöhtes PD-Risiko.

## 2.7. Serumanalysen

Im Zentrallabor der Universitätsklinik Tübingen wurde aus einer EDTA-Probe ein Differentialblutbild (Gesamtleukozyten sowie neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) angefertigt und aus einer Heparin-Blutprobe die Konzentration an CRP und IL-6 bestimmt.

Serumblutproben wurden zur Bestimmung der folgenden Parameter an das Naturwissenschaftliche und Medizinische Institut (NMI) in Reutlingen verschickt:

- *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)
- ENA7B
- *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)
- IL-1 $\alpha$
- IL-1 $\beta$
- IL-2
- IL-3
- IL-4
- IL-5
- IL-6
- IL-7
- IL-8
- IL-10
- IL-12
- IL-13
- IL-15
- IL-16
- IL-18
- TNF- $\beta$
- TNF- $\alpha$

- p40
- Insulin
- Leptin
- Lymphotactin
- *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1)
- *macrophage-derived chemokine* (MDC)
- *macrophage inflammatory protein-1 $\beta$*  (MIP-1 $\beta$ )
- *stem cell factor* (SCF)
- Thyreoperoxidase (TPO)
- Alpha-Fetoprotein (AFP)
- *cancer-antigen 125* (CA 125)
- Carcinoembryonales Antigen (CEA)
- Kreatinkinase *muscle-brain*-Typ (CKMB)
- *fatty acid-binding protein* (FABP)
- Faktor VIII
- *growth hormone* (GH)
- *intracellular adhesion molecule-1* (ICAM-1)
- Immunglobulin E (IgE)
- Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3)
- Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9)
- freies Prostata-spezifisches Antigen (PSA-f)
- *tissue factor* (TF)
- Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH)

Die Serumanalysen wurden mittels Mikrosphären-basierten Protein-Mikroarrays durchgeführt. (Für mehr Hintergrundinformationen zur Technik der angewendeten Immunassays: „Entwicklung und Validierung eines 4-plex Immunoassays zur Quantifizierung von löslichen Rezeptorfragmenten in Proben von Parkinson Patienten.“, Bachelor-Thesis von Markus Nuebel, Fakultät für Angewandte Chemie der Hochschule Reutlingen und Naturwissenschaftliches und Medizinisches Institut Reutlingen) (Nuebel 2015).

Zusätzlich wurden in Kooperation mit Mediagnost Reutlingen im Serum folgende Autoantikörper (AAK) untersucht:

- Abeta<sub>1-42</sub> AAK
- Abeta<sub>1-40sc</sub><sup>1</sup> AAK
- S100B AAK
- α-Synuclein AAK
- Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) AAK
- Myelin-basisches Protein (MBP) AAK

Die Messung dieser AAK erfolgte wie vorbeschrieben (Maetzler, Apel et al. 2014) mittels kommerziell erhältlicher ELISA-Kits.

## **2.8. Statistik**

Die Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Nico Weber und Dr. Nicole Schneiderhan vom Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI) Reutlingen, Anja Apel, Claudia Schulte und Prof. Walter Maetzler von der Universitätsklinik für Neurologie Tübingen und dem Hertie Institut für Klinische Hirnforschung (HIH) in Tübingen durchgeführt.

### **2.8.1. Identifikation der demographischen bzw. klinischen Parameter**

Zuerst definierten wir die relevantesten demographischen bzw. klinischen Merkmale von PD, wobei in den nachfolgenden Berechnungen kontinuierliche Werte einfließen.

- Alter bei Erkrankungsbeginn (EK-Beginn)
- Erkrankungsdauer (EK-Dauer)
- UPDRS
- Progression der motorischen Symptome (UPDRS/EK-Dauer)
- Rigidität
- Bradykinese
- *Freezing*
- Tremor

---

<sup>1</sup> sc = scrambled; beschreibt eine zufällige Aminosäuresequenz als Kontroll-AAK.

- kognitive Einschränkung (nach *Montreal Cognitive Assesement*, MoCA)
- Progression der kognitiven Symptome (MoCA/EK-Dauer)
- Depression (nach Becks Depressions Inventar, BDI)
- Hyposmie (nach Wert in der Sniffin-Stick-Untersuchung)
- Autonome Störungen (nach SCOPA-AUT)
- Progression der autonomen Symptome (SCOPA-AUT/EK-Dauer)
- Müdigkeit (nach *Fatigue Severity Scale*, FSS)
- REM-Schlaf-Verhaltensstörung (nach *REM Sleep behaviour disorder*-Fragebogen)
- Levodopa-Äquivalentdosis (LED, berechnet in Levodopa-Äquivalenzeinheiten [*Levodopa equivalent units* = LEU], 100 mg L-Dopa = 100 LEU)

Aufgrund des Querschnittscharakters der Studie war es nicht möglich, PD-Parameter im Verlauf in die Analysen miteinzuschließen. Da die Dynamik der einzelnen Symptome intra- und interindividuell sehr unterschiedlich ist (Berg, Lang et al. 2013) und die Geschwindigkeit der Progression dieser Symptome deshalb ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen einzelnen PD-Subtypen darstellen könnte, wurde die Progression in den zentralen Symptombereichen (motorisch, kognitiv, autonom) durch Ersellung eines Quotienten, in den die Erkrankungsdauer miteinfließt, darzustellen: Hierzu wurden jeweils die absoluten Werte aus UPDRS (für den motorischen Symptombereich), MOCA (für den kognitiven Symptombereich) und SCOPA-AUT (für den autonomen Symptombereich) in Relation gesetzt zur Erkrankungsdauer (EK-Dauer).

Ist der Quotient aus UPDRS und EK-Dauer hoch, bedeutet das einen schnellen Progress der motorischen Symptomatik (Entwicklung eines geringeren UPDRS-Scores als Zeichen gravierender motorischer Defizite innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums). Analog hierzu verhalten sich MOCA- und SCOPA-AUT, bzw. MOCA/EK-Dauer und SCOPA/EK-Dauer.

### **2.8.2. Assoziation der demographischen bzw. klinischen Parameter mit immunologischen Serumparametern**

Zunächst wurden mit einem linearen Modell die demographischen bzw. klinischen Parameter anhand der Werte der vorliegenden Blutparameter abgebildet. In das Modell wurden Werte der Blutparameter hinzugefügt und wieder entfernt, um die Vorhersagekraft dieser Änderung auf das Vorliegen von Symptomen bzw. Symptomkonstellationen zu bewerten. Ebenso wurden alle Komponenten je paarweise korreliert. Da sich aus diesen Berechnungen keine stabilen Modelle erstellen ließen, wurde diese Methode verworfen und, nach dem Vorbild von *Williams et al.* (Williams, de Silva et al. 2005), eine *principal component analysis* (PCA) der gesammelten Daten erstellt.

Damit konnte geprüft werden, welche Daten voneinander unabhängig sind bzw. ob sich Cluster von demographischen/klinischen Parametern abbilden lassen.

Mittels PCA ließen sich schließlich Cluster darstellen (siehe Abb. 1). Unter der Annahme, dass weit voneinander entfernte Parameter weitestgehend unabhängig voneinander sind, wurden unter diesen weit voneinander entfernten demographischen/klinischen Parametern Paare gebildet und die Werte der Blutparameter der dabei entstehenden (demographisch/klinisch definierten) Gruppen mittels nicht-parametrischer Analyse (*Wilcoxon Signed Rank Test*) miteinander verglichen.

Im Detail wurde dabei die Konstellation „[demographischer/klinischer Parameter x deutlich ausgeprägt zu demographischer/klinischer Parameter y wenig/nicht ausgeprägt] versus [demographischer/klinischer Parameter x wenig ausgeprägt zu demographischer/klinischer Parameter y deutlich ausgeprägt]“ gegenübergestellt. Eine Beispielkonstellation ist hier aufgeführt: besteht ein signifikanter Unterschied der Blutparameter der Konstellation „MoCA/EK-Dauer hoch – UPDRS niedrig“ verglichen mit der Konstellation „MoCA/EK-Dauer niedrig – UPDRS hoch“? (Siehe hierzu auch Abb. 2.) Aus dieser Berechnungskonstellation ergaben sich bei 62 Blutparametern und 7 demographischen/klinischen Parametern, die berücksichtigt wurden, 2 646 Ergebnisse. Von diesen wurden alle Konstellationen mit p-Werten  $<0.01$

extrahiert. Insgesamt wiesen 12 Konstellationen einen p-Wert  $<0.01$  auf und waren mit Entzündungsparametern assoziiert.

Die klinischen/demographischen Parameter mit signifikant höheren Werten an bestimmten Blutparametern und die entsprechenden Blutparameter wurden näher betrachtet und zur Definition des „inflammatorischen PD-Endophänotyps“ herangezogen. Der „inflammatorische PD-Endophänotyp“ wurde definiert aus der Häufigkeit des Vorkommens des jeweiligen klinischen/demographischen Parameters. Art und Häufigkeit des Vorkommens bestimmter Blutparameter wurden verwendet, um Rückschlüsse auf spezifische inflammatorische Einflüsse zu ziehen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Demographische und klinische Parameter der untersuchten Kohorte

Nachfolgend dargestellt finden sich Tabellen zu demographischen und klinischen Parametern der untersuchten Probanden. Die Geschlechterverteilung der Studienprobanden entsprach dabei ca. 1:2 (weiblich:männlich).

Bei der Unterteilung der Probanden in die meistverwendete klinische Subtypeneinteilung (Lees, Hardy et al. 2009) fand sich z.B. der akinetisch-rigide Parkinson-Typ annähernd doppelt so häufig wie jeweils der Äquivalenztyp und der tremordominante Subtyp.

<b>Geschlecht</b>	weiblich: 68	männlich: 138
-------------------	--------------	---------------

**Tab. 1: Geschlechterverteilung der Probanden**

<b>PD-Subtypen:</b>		
tremordominanter Typ	akinetisch-rigider Typ	Äquivalenztyp
62	97	47

**Tab. 2: Verteilung der Parkinson-Subtypen unter den Probanden**

<b>Parameter</b>	<b>Mittelwert</b>	<b>Standardabweichung</b>
Probandenalter [Jahre]	66,7	8,8
Alter bei Erkrankungsbeginn [Jahre]	60	9
Erkrankungsdauer [Jahre]	7	4
LED [mg]	675	451
UPDRS I (0-16 Punkte)	9	6
UPDRS II (0-52 Punkte)	13	8

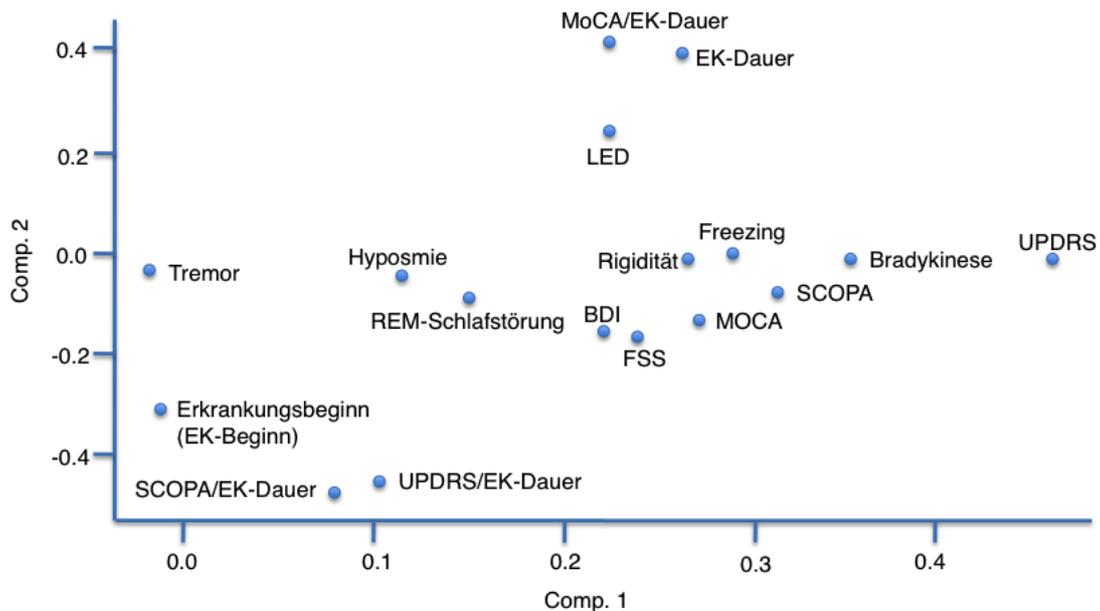
UPDRS III (0-56 Punkte)	28	12
UPDRS IV (0-28 Punkte)	2	3
UPDRS gesamt (0-152 Punkte)	51	18
Hoehn & Yahr (Stadium 1 bis 4)	2,0	-
Schwab & England [%]	87	12
MoCA (0-30 Punkte)	26	3
Becks Depressions Inventar (0-66 Punkte)	8,1	6,2
REM-Schlaf- Verhaltensstörung (0-10 Punkte)	4,6	3,2
SCOPA-AUT	14	8

**Tab. 3: Demographische und klinische Durchschnittswerte der Probanden.**

LED = *Levodopa Equivalent Dose*; REM = *rapid eye movement*; SCOPA-AUT = *Scales for Outcome in Parkinson's Disease Autonomic*; UPDRS = *Unified Parkinson's Disease Rating Scale*

### 3.2. Ergebnisse der *principal component analysis* (PCA)

Eine PCA der klinischen Parameter wurde durchgeführt zur Überprüfung der Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit der Parameter untereinander. Diese erbrachte folgendes Ergebnis (Abb. 1):



**Abb. 1 Principal component analysis (PCA)**

Die x- und die y-Achse stehen jeweils für eine Hauptkomponente, anhand derer die einzelnen Parameter am besten voneinander unterschieden werden können. Die x-Achse besitzt hierbei größeres Diskriminierungspotential als die y-Achse. Konkret bedeutet dies, dass Parameter, die sich sowohl anhand ihrer x- als auch ihrer y-Werte stark unterscheiden, am ehesten unabhängig voneinander sind. Ein Beispiel hierfür stellen SCOPA/EK-Dauer und MoCA/EK-Dauer dar. Im Umkehrschluss sind Parameter, die auf dem Schaubild nahe beieinander liegen, relativ abhängig voneinander und bilden Cluster wie z. B. SCOPA/EK-Dauer und UPDRS/EK-Dauer. (Für genauere Informationen siehe auch den nachfolgenden Haupttext.)

BDI = Becks Depressions Inventar; EK-Beginn = Erkrankungsalter; EK-Dauer = Erkrankungsdauer; FSS = *Fatigue Severity Scale*; LED = Levodopa-Äquivalentdosis

Die beiden Hauptkomponenten sind diejenigen Komponenten, ermittelt aus der Gesamtmenge aller Daten, anhand derer sich die Merkmale tatsächlich voneinander unterscheiden. Am stärksten fließen in die Hauptkomponenten

diejenigen Komponenten mit ein, die Informationen zur Diskriminierung der Merkmale (UPDRS, Tremor, BDI usw.) enthalten, wohingegen Komponenten, die keine neuen Informationen enthalten und deshalb nicht zum Unterscheidungspotential beitragen, nicht ins Gewicht fallen.

Die erste Hauptkomponente (Comp. 1 auf der x-Achse) beinhaltet das größte Unterscheidungspotential; d.h. Merkmale mit stark unterschiedlichen Werten auf der x-Achse können als voneinander unabhängig angesehen werden. Umgekehrt können Merkmale mit ähnlichem x-Wert als relativ abhängig voneinander angesehen werden. Dasselbe gilt für die 2. Hauptkomponente (Comp. 2 auf der y-Achse), wobei die y-Achse weniger Diskriminierungspotential beinhaltet als die x-Achse.

Merkmale, deren x- und y-Wert sich gleichen, sind am wahrscheinlichsten voneinander abhängig, ein Beispiel hierfür sind UPDRS/EK-Dauer und SCOPA/EK-Dauer. Im Umkehrschluss gilt, dass Merkmale, die sowohl unterschiedliche x- als auch y-Werte aufweisen am wahrscheinlichsten voneinander unabhängig sind, ein Beispiel hierfür sind MoCA/EK-Dauer und UPDRS.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich, stellen sich UPDRS/EK-Dauer und SCOPA/EK-Dauer als Cluster dar. Die beiden Merkmale haben sowohl ähnliche x- als auch y-Werte. Dasselbe gilt für MoCA/EK-Dauer und EK-Dauer. Bei der weiteren Untersuchung wurde daher stellvertretend für das Cluster ein Parameter des jeweiligen Clusters (z. B. MoCA/EK-Dauer für das Cluster MoCA/EK-Dauer und EK-Dauer) verwendet.

### **3.3. Extraktion der für den immunologischen PD-Endophänotyp relevanten klinischen/demographischen Parameter aus der PCA in Zusammenschau mit signifikant erhöhten immunologischen Serumparametern**

Folgende klinische/demographische Parameter wurden stellvertretend für Cluster extrahiert (Abb. 1): Progression der motorischen Symptome (UPDRS/EK-Dauer), Progression der autonomen Symptome (SCOPA/EK-Dauer), Erkrankungsalter (EK-Beginn), UPDRS, Progression der kognitiven

Symptomatik (MoCA/EK-Dauer), Tremor, kognitive Einschränkung anhand von MoCA (MoCA). Diese wurden nach dem oben genannten Muster „[demographischer/klinischer Parameter x deutlich ausgeprägt zu demographischer/klinischer Parameter y wenig/nicht ausgeprägt] versus [demographischer/klinischer Parameter x wenig ausgeprägt zu demographischer/klinischer Parameter y deutlich ausgeprägt]“ mit den 62 Blutparametern assoziiert (siehe Methodenteil). Folgende Gegenüberstellungen erreichten p-Werte <0.01 und waren zusätzlich mit einem inflammatorischen Blutparameter assoziiert:

Vergleich der klinischen/demographischen Parameter	Blutparameter	p-Wert
UPDRS/EK-Dauer hoch – MoCA niedrig vs. UPDRS/EK-Dauer niedrig – MoCA hoch	IL-10	0.0084
MoCA/EK-Dauer hoch – UPDRS niedrig vs. MoCA/EK-Dauer niedrig – UPDRS hoch	IL-18	0.0072
UPDRS/EK-Dauer hoch – MoCA/EK-Dauer niedrig vs. UPDRS/EK-Dauer niedrig – MoCA/EK-Dauer hoch	IL-15	0.0072
EK-Beginn hoch – Tremor niedrig vs. EK-Beginn niedrig – Tremor hoch	IL-8	0.0055
MoCA hoch – UPDRS/EK-Dauer niedrig vs. MoCA niedrig – UPDRS/EK-Dauer hoch	IL-10	0.0048
MoCA/EK-Dauer hoch – UPDRS/EK-Dauer niedrig vs. MoCA/EK-Dauer niedrig – UPDRS/EK-Dauer hoch	IL-18	0.0044
SCOPA/EK-Dauer hoch – UPDRS/EK-Dauer niedrig vs. SCOPA/EK-Dauer niedrig – UPDRS/EK-Dauer hoch	IL-15	0.0042
MoCA/EK-Dauer hoch – Tremor niedrig vs. MoCA/EK-Dauer niedrig – Tremor hoch	IL-18	0.0037
Tremor hoch – MoCA/EK-Dauer niedrig vs. Tremor niedrig – MoCA/EK-Dauer hoch	IL-15	0.0025
MoCA/EK-Dauer hoch – EK-Beginn niedrig vs. MoCA/EK-Dauer niedrig – EK-Beginn hoch	IL-18	0.0023
MoCA/EK-Dauer hoch – SCOPA/EK-Dauer niedrig vs. MoCA/EK-Dauer niedrig – SCOPA/EK-Dauer hoch	IL-18	0.0017

**Tab. 4: Vergleich klinischer und demographischer Parameter in Zusammenhang mit immunologischen Serumparametern.**

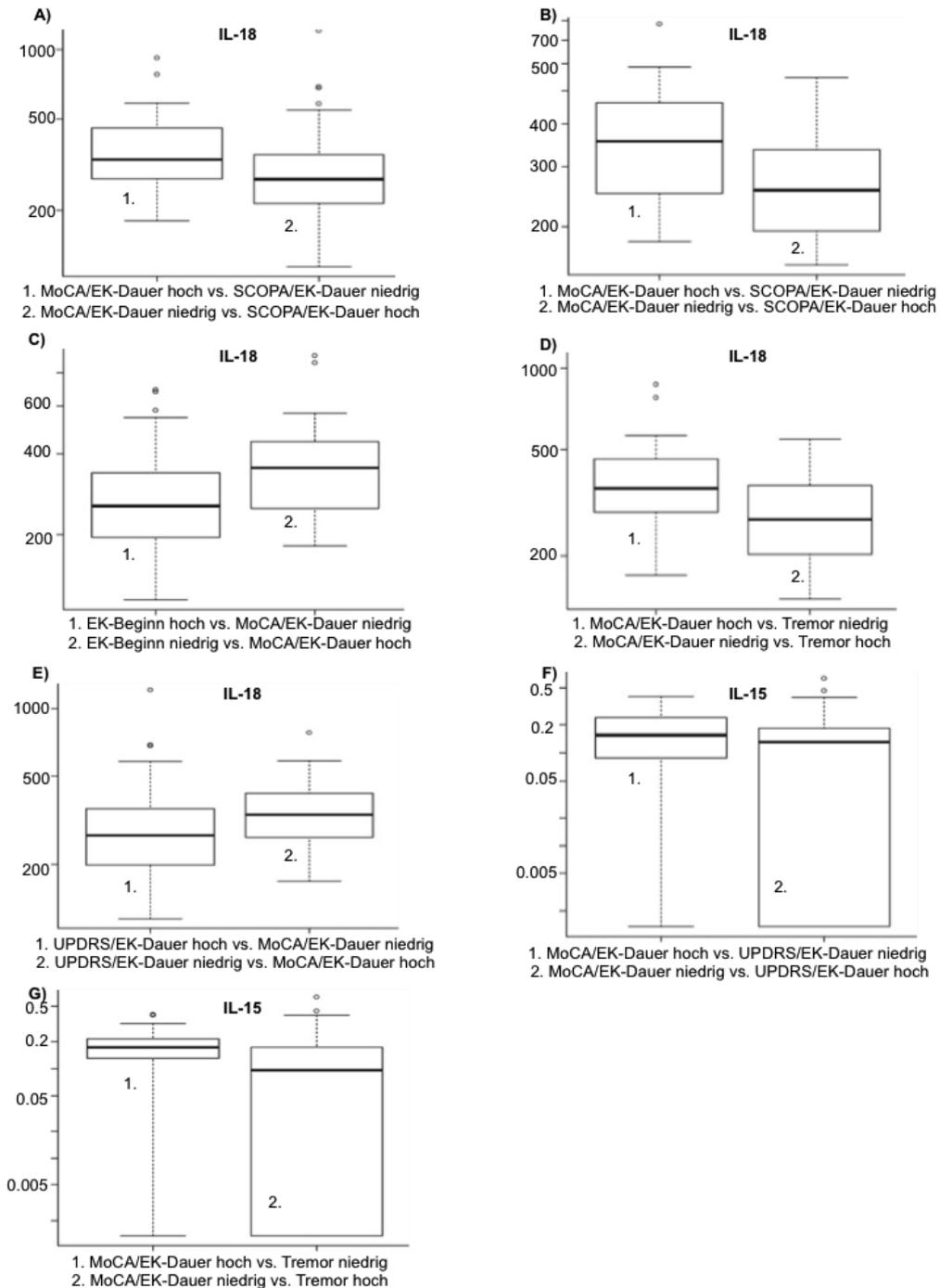
EK-Beginn = Erkrankungsbeginn; EK-Dauer = Erkrankungsdauer; MoCA = *Montreal Cognitive Assessement*; UPDRS = *Unified Parkinson's Disease Rating-Scale*; SCOPA = *Scales for Outcome in Parkinson's Disease Autonomic*

Danach wurde bestimmt, welcher klinische/demographische Parameter gegenüber dem gegenübergestellten klinischen/demographischen Parameter mit dem höheren Zytokinspiegel assoziiert war. Dabei zeigte sich, dass „MoCA/EK-Dauer hoch“ sieben Mal, „EK-Beginn hoch“ zweimal, „SCOPA/EK-Dauer hoch“ und „MoCA hoch“ jeweils einmal den höheren Wert aufzeigte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die drei Progressionsmarker (motorische, autonome [befinden sich in einem Cluster] und kognitive) als für den immunologischen PD-Endophänotyp relevante Parameter aus der Gesamtzahl der klinischen/demographischen Parameter extrahiert werden konnten. Als relevante Blutparameter kristallisierten sich vor allem IL-15 und IL-18 heraus.

Ein erhöhter Wert für „MoCA/EK-Dauer“ bedeutet eine schnellere Progression des kognitiven Abbaus (ein erniedrigter MoCA-Wert in Relation zur Erkrankungsdauer); ebenso verhält es sich mit den Parametern SCOPA/EK-Dauer und UPDRS/EK-Dauer.

Der Parameter MoCA/EK-Dauer, d.h. ein niedrigerer MoCA-Wert in Relation zur Erkrankungsdauer, war fünfmal mit signifikant erhöhten IL-18- und zweimal mit signifikant erhöhten IL-15-Serumspiegeln assoziiert.

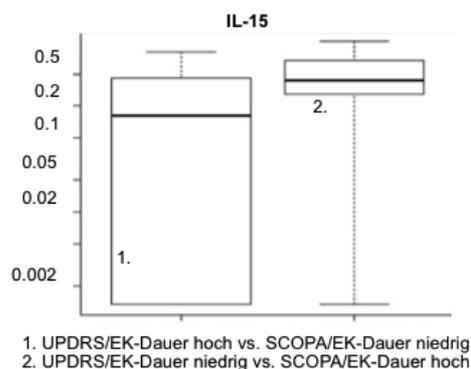


**Abb. 2 A)-G):** Assoziation des MoCA-Wertes in Relation zur Erkrankungsdauer mit den immunologischen Parametern IL-15 und IL-18

Erklärungen zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb.1, S. 50.

Der MoCA-Wert (zur Messung der kognitiven Leistungsfähigkeit bzw. zur Feststellung evtl. vorhandener Defizite) wurde in Relation zur Gesamterkrankungsdauer gesetzt, um einen rascheren Abfall des MoCA-Wertes bzw. der kognitiven Leistungsfähigkeit darzustellen. Diese raschere Progression zeigte sich fünfmal assoziiert mit erhöhten IL-18-Spiegeln und zweimal mit erhöhten IL-15-Spiegeln. Das Symptom bzw. der Testwert, welches bzw. welcher beim jeweils höheren Balken mit „hoch“ bezeichnet ist, ist das ausschlaggebende Symptom bzw. der ausschlaggebende Testwert. Das Symptom bzw. der Testwert, welches bzw. welcher beim jeweils niedrigeren Balken mit „hoch“ bezeichnet ist, kann als Kontrollsymptom bzw. Kontrolltestwert angesehen werden.

Eine raschere Abnahme des SCOPA-AUT-Wertes war einmalig mit signifikant erhöhtem IL-15-Serumspiegel assoziiert.

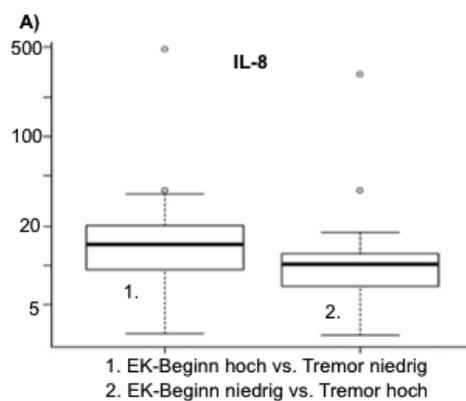


**Abb. 3: Assoziation von SCOPA-AUT-Werten in Relation zur EK-Dauer (SCOPA/EK-Dauer) mit IL-15**

Erklärungen zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 1, S. 50.

Analog zur Darstellung der Progression der MoCA-Werte – MoCA in Relation zur Erkrankungsdauer – wurde der SCOPA-AUT ebenfalls in Relation gesetzt zur Erkrankungsdauer: SCOPA/EK-Dauer. Raschere Verschlechterung des SCOPA-AUT-Wertes fand sich einmal assoziiert mit erhöhten IL-15-Spiegeln. (zur generellen Interpretation der Abbildung siehe Erklärung zu Abb. 2)

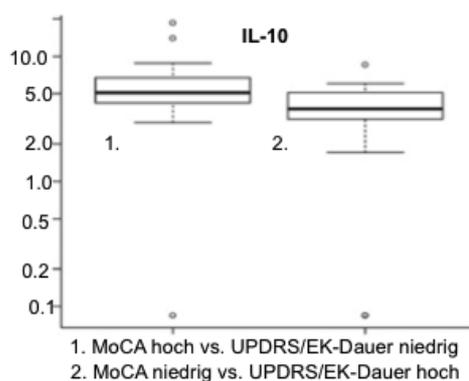
Ein früheres Erkrankungsalter war einmalig mit signifikant erhöhtem IL-8 assoziiert.



**Abb. 4: Assoziation von frühem Erkrankungsalter mit IL-8.**

Erklärungen zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 1, S. 50.

Ein erniedrigter MoCA-Testwert war einmalig mit signifikant erhöhtem IL-10 assoziiert.

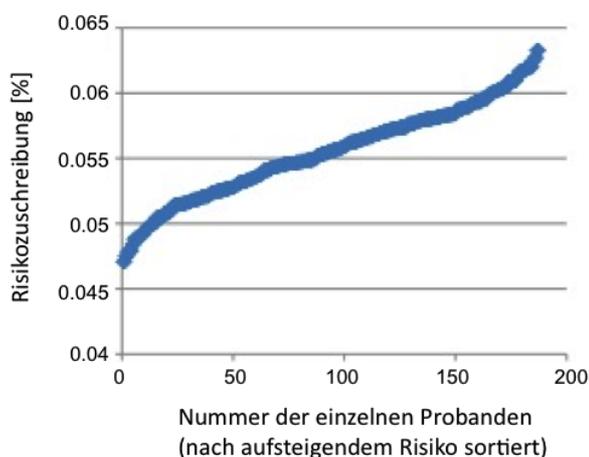


**Abb. 5: Assoziation von erniedrigten MoCa-Werten mit IL-10**

Erklärungen zu den verwendeten Abkürzungen siehe Abb. 1, S. 50.

### 3.4. Der genetische Risikoscore

Der genetische Risikoscore zeigte in sich folgendes Ergebnis:



**Abb. 6: Risikoscore für „immunogene SNPs“ (siehe Kapitel „II.6. DNA-Analyse“ [Methodenteil] für Details); x-Achse: Nummer der einzelnen Probanden nach aufsteigendem Risiko sortiert, y-Achse: genetisch errechnetes Risiko**

97.3 % der Studienkohorte befinden sich im Intervall zwischen dem Mittelwert (MW) von 0.055 und  $\pm 2$  Standardabweichungen (SD).

Dem Schaubild ist zu entnehmen, dass die meisten Probanden im mittleren Bereich des Risikoscores lagen. Der Mittelwert des genetischen Risikos lag bei 0.055, die Standardabweichung bei 0.0036. Das bedeutet, dass 182 Probanden (entspricht 97.3% der Kohorte) im Intervall von Mittelwert (MW)  $\pm 2$  Standardabweichungen (SD) lagen.

Es ist zu beachten, dass der Score tatsächlich nur das Risiko für PD berechnet, dabei aber nicht mögliche protektive Faktoren berücksichtigt. Daher geht die Kurve der entsprechenden Werte der eingeschlossenen Personen nicht durch die Null-Linie, sondern weist für alle Probanden ein mehr oder weniger (zwischen 6.3 und 4.7%) erhöhtes Risiko auf.

Bei der paarweisen Korrelation der demographischen/klinischen Parameter nach obigem Schema (siehe Kapitel „III.3. Extraktion der Blutparameter aus der PCA und Definition der für den immunologischen PD-Endophänotyp relevanten klinischen/demographischen Parameter“) wurden die demographischen/klinischen Parameter nicht nur auf Assoziationen mit den

oben genannten Blutparametern hin untersucht, sondern auch auf Assoziationen mit dem genetischen Risikoscore. Dabei ergab sich keine signifikante Assoziation des genetischen Risikoscores mit demographischen/klinischen Parametern (niedrigster p-Wert = 0.23).

## **4. DISKUSSION**

### **4.1. Die COEN-Kohorte**

In die COEN-Studie wurden 206 Probanden eingeschlossen, von denen 138 männlich und 68 weiblich waren. Dies deckt sich mit der Tatsache, dass etwa doppelt so viele Männer von PD betroffen sind wie Frauen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter von 60 Jahren bei COEN-Probanden ähnelt dem durchschnittlichen Erkrankungsalter von ca. 64 Jahren für PD allgemein (Van Den Eeden, Tanner et al. 2003), so dass die untersuchte Kohorte bezogen auf Geschlechterverteilung und Erkrankungsdauer repräsentativ ist. Der Durchschnittswert der Schwab-und-England-Skala, auf der die Einschränkung bei Alltagsaktivitäten bewertet wird – unter der Voraussetzung, dass 100% bedeutet, dass keinerlei Einschränkung vorhanden ist –, betrug durchschnittlich 87%. Das bedeutet: durchschnittlich nahmen die Probanden Verlangsamung und geringe krankheitsassoziierte Schwierigkeiten wahr, waren jedoch unabhängig von fremder Hilfe bei der Verrichtung ihrer Alltagsaktivitäten (Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's 2003). Dies erklärt sich durch das Studien-Setting: schwerkranke oder gar bettlägerige Patienten konnten aus logistischen Gründen nicht eingeschlossen werden.

Der MoCA-Wert zur Beurteilung der Kognition betrug durchschnittlich 26 von 30 möglichen Punkten. Die Entwickler des MoCA haben 26 als Cut-off ermittelt (mehr Informationen hierzu unter: [www.mocatest.org/normative-data](http://www.mocatest.org/normative-data), aufgerufen am 22.09.15). Bei einem Wert von weniger als 26 Punkten kann man von einer kognitiven Beeinträchtigung ausgehen. Die Probanden der COEN-Studie befanden sich so durchschnittlich am unteren Ende des als „normal“ bewerteten Bereichs. 33% (70 Probanden) wiesen einen MoCA-Wert von unter 26 auf.

Der BDI-Durchschnittswert zur Evaluation einer Depression bzw. depressiver Symptome lag bei ca. 8 – von 63 möglichen – Punkten. Der Cut-off für das Vorliegen einer milden Depression liegt bei 9, Werte zwischen 0 und 8 Punkten gelten als normal. Mehr als ein Drittel der Probanden – 77 Probanden bzw.

37% - wiesen Werte von 9 oder mehr auf und erfüllten damit formal die Kriterien von mindestens einer leichten depressiven Episode. Dieses Studienergebnis deckt sich in etwa mit den variierenden epidemiologischen Angaben, denen zufolge 20 bis 50% der PD-Patienten an Depression leiden (Baquero and Martin 2015). Aufgrund der großen Spannweite dieser epidemiologischen Angabe muss die Bedeutung des COEN-Ergebnisses mit Vorsicht betrachtet werden.

Mittels *REM Sleep Behaviour Disorder Screening Questionnaire* (deutsche Version) wurden die Probanden auf das Vorliegen einer REM-Schlaf-Verhaltensstörung untersucht. Bei dem hier verwendeten Fragebogen liegt der Cut-off-Wert bei 5 (von 13 möglichen) Punkten. Bei 5 Punkten oder mehr besteht der dringende Verdacht auf eine REM-Schlaf-Störung. 42% der COEN-Probanden (d.h. 87 Probanden) erreichten einen Wert von 5 Punkten oder mehr. Dies deckt sich mit epidemiologischen Allgemeindaten über PD und REM-Schlaf-Störungen, denen zufolge ca. 40% der PD-Patienten an einer REM-Schlaf-Störung leiden (Bjornara, Dietrichs et al. 2014). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kohorte der COEN-Studie ein relativ repräsentatives Kollektiv für mild bis moderat betroffene Parkinsonpatienten darstellt.

#### **4.2. IL-15 und IL-18 bei PD**

Unsere Ergebnisse zeigen eine Assoziation von IL-15 mit rascher kognitiver, motorischer und autonomer Progression bei PD, IL-18 war assoziiert mit raschem kognitivem Abbau.

Das Auftreten von immunologischen Prozessen, die zum Zelluntergang im Rahmen von PD führen, wurde bereits mehrfach nachgewiesen. Ebenso gilt die Beteiligung von Zytokinen als Mediatoren des Immunsystems bei neurodegenerativen Prozessen im Rahmen von PD als gesichert. Allerdings liegen bis dato unseres Wissens keine Studien vor, die sich mit der Abgrenzung eines – aufgrund der Ergebnisse in epidemiologischen Studien, und der multiplen pathogenetischen und pathologischen Aspekte, die bei PD vorliegen, nicht unwahrscheinlichen – inflammatorischen Subtyps beschäftigen. Die Ergebnisse der COEN-Studien liefern erste Hinweise, dass spezifische

Interleukine mit einem abgrenzbaren Phänotyp assoziiert sind. Dabei handelt es sich bei dem Aspekt „raschere motorische, kognitive und autonome Progression innerhalb der PD-Erkrankung“ um einen allgemeinen „Schweregrad“-Parameter, und nicht, wie initial erhofft, um einen klinisch klar abgrenzbaren Phänotyp. Trotzdem sind die Ergebnisse ermutigend und können die Basis für spezifische Nachfolgeprojekte darstellen. Die Befunde werden nun im Detail in Bezug auf die bestehende Literatur diskutiert.

#### **4.2.1. Interleukin-15 (IL-15)**

IL-15 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen und aktivierten Gliazellen (Rentzos and Rombos 2012), aber auch von nicht-immunologischen Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten und Nervenzellen sezerniert wird (Grabstein, Eisenman et al. 1994). Es induziert die Proliferation von zytotoxischen und zytolytischen Zellen wie NK-Zellen, darüber hinaus auch die Proliferation von T- und B-Zellen und die Immunglobulinsekretion von Plasmazellen. Das Zytokin entfaltet seine Wirkung über einen Rezeptorkomplex, der sich zusammensetzt aus drei Untereinheiten:  $\gamma_c$ , IL-2R $\beta$  und IL-15R $\alpha$ . Dieser Komplex kann sich sowohl an der Zellmembran als auch im Zellkern befinden und ist Teil eines komplexen Signalnetzwerks für dieses Zytokin (Rentzos and Rombos 2012). Die  $\gamma_c$ -Untereinheit wird von einer Gruppe weiterer Zytokine genutzt: IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21. IL-15 besitzt große strukturelle Ähnlichkeit mit IL-2. Beide Zytokine binden an die Untereinheit von IL-2R $\beta$  und unterscheiden sich lediglich in ihrer  $\alpha$ -Kette. Der IL-15R $\alpha$  zeichnet sich durch die höchste Affinität zu IL-15 aus. IL-15 und IL-15R $\alpha$  werden gemeinsam von den gleichen Zellen sezerniert. Der Komplex aus IL-15/IL-15R $\alpha$  wird an der Zellmembran aufgenommen und nach Transport durch das endoplasmatische Retikulum an der Membran wieder präsentiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Nachbarzellen, die IL-2/IL-15R $\beta$ / $\gamma_c$  exprimieren. Dieser Prozess wird auch als Transpräsentation bezeichnet und erlaubt eine sehr genaue Kontrolle der Stimuli, die durch IL-15 gesetzt werden. Dass diese akribische Regulation für das Zytokin notwendig ist, spiegelt sich

beispielsweise in der Tatsache wider, dass die (pathologische) systemische Verfügbarkeit von IL-15 eine Leukämie verursachen kann (Marçais, Viel et al. 2013).

Die Bedeutung von IL-15 bei der Aktivierung der Mikroglia wurde von *Gomez-Nicola et al. in vitro* nachgewiesen: Bei einer mittels LPS und IFN- $\gamma$  induzierten Entzündungsreaktion in Zellkulturen bei gleichzeitiger Hemmung von IL-15 – durch Zugabe von Antikörpern oder Neurostatin – zeigte sich eine verminderte Aktivität von zahlreichen inflammatorischen Folgereaktionen wie verminderte Produktion und Aktivität von NO oder Hemmung von *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF $\kappa$ B). Besonders interessant ist, dass es zur Abnahme von Wachstumsfaktoren wie Chemo- und Zytokinen (CCL17, IL-12 etc.) kam, die für die phänotypische Umwandlung der Mikroglia in die aktivierte Form verantwortlich sind (Gomez-Nicola, Valle-Argos et al. 2008), denn wie an vorheriger Stelle bereits erwähnt, spielt die Mikroglia eine Schlüsselrolle bei der Neuroinflammation. (Details siehe Kapitel „1.1.4.1.b Neuroinflammation“)

Bisherige Studien bezüglich der Rolle von IL-15 bei PD erbrachten kontroverse Ergebnisse: *Gangemi et al.* stellten signifikant erhöhte Serumspiegel an IL-15 bei PD-Patienten mit Levodopa-Medikation fest im Vergleich zu gesunden Probanden. Verglichen mit PD-Patienten ohne Levodopa-Medikation waren die IL-15-Serumspiegel allerdings nicht signifikant erhöht. Die Autoren schlossen daraus, dass immunologische Veränderungen bei PD mit dem Fortschreiten der Erkrankung, möglicherweise aber auch mit der Levodopa-Behandlung assoziiert sind (Gangemi, Basile et al. 2003). Eine 2007 veröffentlichte Studie von *Rentzos et al.* erbrachte keinen Unterschied der IL-15 Serumspiegel zwischen PD-Patienten und gesunden Kontrollen (Rentzos, Nikolaou et al. 2007). Beiden Studien gemeinsam ist jedoch die signifikante Erhöhung des Chemokins RANTES (*Regulated And Normal T cell Expressed and Secreted*) (Gangemi, Basile et al. 2003, Rentzos, Nikolaou et al. 2007, Rentzos and Rombos 2012). RANTES, auch bekannt als CCL5, ist ein Zytokin, das eine chemotaktische Wirkung auf verschiedene Entzündungszellen (B-Zellen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten) aufweist. Eine Verbindung

zwischen IL-15 und RANTES/CCL5 konnte tierexperimentell nachgewiesen werden: Mäuse ohne die  $\alpha$ -Kette des IL-15-Rezeptors wiesen eine geringere Produktion von RANTES/CCL5 auf (Chen, Liao et al. 2005). *Tang et al.* konnten für RANTES bereits eine Assoziation nicht nur mit PD an sich, sondern auch eine positive Korrelation der RANTES-Serumspiegel mit der Schwere der Erkrankung (anhand des Hoehn&Yahr-Stadiums) feststellen (Tang, Chong et al. 2014). Vor diesem Hintergrund wäre RANTES/CCL5 sicherlich ein Metabolit-Kandidat für Folgestudien, der in dieser Konstellation erfasst werden könnte.

#### **4.2.2. Interleukin-18**

Auch bei IL-18 handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, das sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem verstärkt (Sugama, Wirz et al. 2004). Es stellt eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem dar und fungiert als Regulator sowohl des humoralen als auch des zellulären Immunsystems (Alboni, Cervia et al. 2010). Peripher kann das Zytokin von zahlreichen immunologischen und nicht-immunologischen Zellen sezerniert werden wie von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, Kupffer-Zellen, Osteoblasten, Keratinozyten und intestinalen Epithelzellen, im ZNS von der Mikroglia, Astrozyten, Ependymzellen und interessanterweise von Neuronen (Zhou, Ping et al. 2014). Bei seiner Entdeckung war dieses Zytokin aufgrund seiner Funktion zunächst bekannt als IFN- $\gamma$ -Induktionsfaktor (Sugama, Wirz et al. 2004). IL-18 vermag eine starke IFN- $\gamma$ -Ausschüttung von TH-1-Zellen und Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) hervorzurufen (Sugawara, Uehara et al. 2001). Bei Mäusen mit fehlendem IL-18-Rezeptor kommt es zu verringerter Produktion von IFN- $\gamma$  und zu abgeschwächter zytotoxischer Aktivität (Marcais, Viel et al. 2013).

Durch inflammatorische Stimuli erfolgt intrazellulär zunächst die Expression einer inaktiven Vorstufe, pro-IL-18. Die enzymatische Spaltung und damit die Aktivierung erfolgt entweder bereits intrazellulär durch Caspase-1 und andere Caspase-1-ähnliche Enzyme oder extrazellulär durch leukozytäre Enzyme wie Proteinase-3 (Felderhoff-Mueser, Schmidt et al. 2005). Effekte übt IL-18 durch

Bindung an den heterodimeren IL-18-Rezeptor (IL-18R) aus, der sich auf einer Vielzahl immunologischer Zellen wie Makrophagen, NK-Zellen und neutrophilen Granulozyten und nicht-immunologischen Zellen wie glatten Muskelzellen und Endothelzellen befindet (Gracie, Robertson et al. 2003). IL-18R besteht aus zwei Untereinheiten: die  $\alpha$ -Untereinheit vermittelt die extrazelluläre Bindung, die  $\beta$ -Untereinheit dient der Signaltransduktion (Gracie, Robertson et al. 2003). Sowohl die  $\alpha$ - als auch die  $\beta$ -Untereinheit des IL-18-Rezeptors konnte im ZNS nachgewiesen werden. Die Aktivierung des IL-18R führt zu Hypertrophie von Astrozyten (Alboni, Cervia et al. 2010). Außer der oben genannten Induktion der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung bewirkt die IL-18-Bindung an den IL-18-Rezeptor zahlreiche weitere Effekte: das Zytokin fördert die Reifung von T-Zellen und NK-Zellen und stimuliert deren Zytokinproduktion. Durch gesteigerten Einbau des Fas-Liganden an die Oberfläche von NK-Zellen fördert IL-18 konsekutiv die Zytotoxizität dieser Zellen. In Bezug auf B-Zellen fördert IL-18 die Sekretion von Immunglobulin E (IgE) (Gracie, Robertson et al. 2003).

Als inflammatorischer Botenstoff steht IL-18 im Zentrum neuroinflammatorischer Vorgänge: IL-18 lässt sich im Rahmen entzündlicher Geschehen im ZNS nachweisen. IL-18-Null-Mäuse zeigen eine beeinträchtigte Aktivierung der Mikroglia (Alboni, Cervia et al. 2010) und verglichen mit Wildtyp-Mäusen wiesen sie nach induziertem Schlaganfall ein signifikant kleineres Infarktareal auf (Hedtjarn, Leverin et al. 2002).

Auch beim Untergang von dopaminergen Neuronen scheint IL-18 eine wichtige Rolle zu spielen: im Tierversuch wurde dopaminerges Neuronenverlust durch das Neurotoxin 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) induziert. Es kam zum Untergang dopaminerges Neuronen und zur Aktivierung der Mikroglia sowohl bei Wildtyp- als auch bei IL-18-Null-Mäusen. Allerdings kam es bei den IL-18-Null-Mäusen früher zu einem Rückgang der Mikroglia-Aktivierung, und der dopaminerge Neuronenverlust war im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen weniger ausgeprägt (Sugama, Wirz et al. 2004). Die Autoren schließen daraus, dass das Ausmaß des dopaminerges Neuronenverlusts in direkter Korrelation zur Mikroglia-Aktivität steht und IL-18 in diesem Prozess

eine wichtige Rolle als Mediator bei der Aufrechterhaltung – aber nicht bei der Initiation - der Mikroglia-Aktivität zukommt (Sugama, Wirz et al. 2004).

Im Rahmen von *in vitro*-Studien mit PBMCs von Patienten mit AD zeigte sich bei *Bossu et al.* ein interessanter Zusammenhang mit IL-18: Die stimulierten PBMCs der AD-Probanden zeichneten sich durch eine gesteigerte Produktion von IL-18 im Gegensatz zu den PBMCs der Kontrollgruppe aus. Darüber hinaus fand sich, ähnlich wie bei unseren Untersuchungen an PD-Patienten, eine Korrelation zwischen den IL-18-Serumspiegeln und der kognitiven Einschränkung innerhalb der AD-Gruppe (Bossu, Ciaramella et al. 2008).

#### **4.2.3. Synergistische Wirkungen von IL-15 und IL-18**

Sowohl bei IL-15 als auch bei IL-18 handelt es sich um wichtige Mediatoren des Immunsystems, die im Rahmen von Entzündungsgeschehen zahlreiche Auswirkungen entfalten. Bei Überlegungen bezüglich der besonderen Rolle dieser beiden Zytokine – auch im Hinblick auf unsere Ergebnisse – sollten synergistische Wirkungen der beiden Zytokine betrachtet werden. Ein hervorstechendes gemeinsames Merkmal von IL-15 und IL-18 ist der Einfluss auf Entwicklung und Funktion von NK-Zellen (Marcais, Viel et al. 2013).

Als Subgruppe der Lymphozyten entwickeln sich die NK-Zellen aus lymphatischen Vorläuferzellen und sind Teil der angeborenen Immunabwehr. Sie besitzen zytolytische und Zytokin-produzierende Eigenschaften sowohl zur Zerstörung von Tumorzellen als auch zur Abwehr von Infektionen (Vivier, Tomasello et al. 2008). Die Zellaktivität wird durch Oberflächenrezeptoren gesteuert, die bei Ligandenbindung entweder inhibitorische (durch den inhibitorischen Rezeptor *natural killer group 2 member A* [NKG2A]) oder exzitatorische (durch den exzitatorischen Rezeptor *natural killer group 2 member D* [NKG2D]) Signalkaskaden einleiten. Die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen erfolgt anhand verschiedener Liganden an der Oberfläche der Zielzellen wie MHC-I-Molekülen. NK-Zellen exprimieren MHC-I-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, und bei Fehlen der MHC-I-Moleküle auf potentiellen Zielzellen kommt es zu einer Aufhebung der inhibitorischen Signale der NK-Zellen und zur Einleitung von

Abwehrmechanismen (Mihara, Nakashima et al. 2008). Die Zerstörung von Zellen durch NK-Zellen findet Antikörper-unabhängig statt, also ohne vorherige Immunisierung (Bokor, Farago et al. 1993).

Zwar nehmen zahlreiche Zytokine (z. B. IL-2, IL-4, IL-7) Einfluss auf die NK-Zellen, tierexperimentell kristallisierte sich jedoch – im Gegensatz zu anderen Zytokinen – eine unentbehrliche Rolle für IL-15 in Bezug auf NK-Zellen heraus: das Fehlen von IL-15 oder IL-15R $\alpha$  im Tierexperiment führte dazu, dass so gut wie keine reifen NK-Zellen vorhanden waren. Dies legt nahe, dass IL-15 einen ausgesprochen wichtigen Einfluss auf die Reifung der NK-Zellen ausübt. IL-15 kontrolliert Reifung und Priming der NK-Zellen sowie das Überleben reifer NK-Zellen in der Peripherie und die Produktion von IFN- $\gamma$ . IL-15 ist dabei sowohl verantwortlich für die NK-Zell-Homöostase als auch für die NK-Zell-Funktion unter inflammatorischen Bedingungen – also für die NK-Zell-Reaktion auf Infektionen mit Bakterien, Viren und Pilzen. Manche Autoren erklären sich diese breitgefächerten Auswirkungen auf die NK-Zellen durch Konzentrationsunterschiede von IL-15. Das Zytokin liegt unter homöostatischen und unter inflammatorischen Bedingungen in verschiedenen Konzentrationen vor (Marcais, Viel et al. 2013).

Auch die Bedeutung von IL-18 für NK-Zellen scheint groß zu sein: unter homöostatischen Bedingungen sind NK-Zellen die einzigen hämatopoetischen Zellen, bei denen man eine kontinuierliche Transkription der IL-18-Rezeptoren IL-18R1 und IL-18R2 fand, wodurch eine außerordentliche Sensitivität für dieses Zytokin vorliegt. IL-18 – teilweise zusammen mit IL-12 – stimuliert hauptsächlich die IFN- $\gamma$ -Produktion der NK-Zellen (Marcais, Viel et al. 2013).

In Bezug auf PD wurden für NK-Zellen bereits nennenswerte Entdeckungen gemacht. *Mihara et al.* untersuchten den Anteil der NK-Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation bei PD-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden. Dabei entdeckten sie in den Serumspiegeln zwar keine Unterschiede an NK-Zellen zwischen den beiden Gruppen, bei den PD-Probanden fanden sich allerdings signifikant mehr NK-Zellen, die eine geringere Anzahl an inhibitorischen Rezeptoren aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Studie lassen darauf schließen, dass die NK-Zell-Aktivität bei den PD-Probanden erhöht ist –

unter der Voraussetzung, dass die Signaltransduktionswege der Rezeptoren NGK2A und NGK2D intakt sind. Außerdem korrelierte die NK-Zell-Aktivität positiv mit der PD-Dauer. Im Vorfeld der Studie gingen die Autoren davon aus, dass die Immunantwort bei PD-Patienten hauptsächlich auf das angeborene Immunsystem verlagert ist. Da NK-Zellen nicht nur Teil der angeborenen Immunabwehr sind, sondern auch eine Rolle als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem innehaben, gehen *Mihara et al.* von einem Überwiegen der angeborenen Immunabwehr aus, da bei PD möglicherweise eine gestörte Vermittlung zwischen diesen beiden Immunantworten vorliegt. Die übersteigerte NK-Zell-Aktivierung sehen die Autoren als Resultat dieses Zustandes (Mihara, Nakashima et al. 2008).

Vor allem IL-15 mit seinem unentbehrlichen Einfluss auf die NK-Zell-Reifung (Marcais, Viel et al. 2013) könnte in diesem Modell eine Schlüsselrolle spielen. Zahlreiche Studien wiesen nach, dass inflammatorische Prozesse entscheidend beteiligt sind beim Untergang von dopaminergen Zellen (Mihara, Nakashima et al. 2008). Auf solche Individuen, die beispielsweise aufgrund genetischer Risikomutationen (International Parkinson Disease Genomics, Nalls et al. 2011, International Parkinson's Disease Genomics and Wellcome Trust Case Control 2011, Keller, Saad et al. 2012, Holmans, Moskva et al. 2013, Mielke, Maetzler et al. 2013, Goldman, Kamel et al. 2014, Nalls, Pankratz et al. 2014) anfällig sind für PD, wirken gewisse Auslöser ein, die sich Mechanismen des Immunsystems zunutze machen, um dopaminerge Zellen zu schädigen (Mihara, Nakashima et al. 2008). Es ist anzunehmen, dass zu diesen Mechanismen die Aktivität der NK-Zellen gehört, die, wie auch *Bokor et al.* nachweisen konnten, bei PD erhöht ist. Des Weiteren zeigte sich bei diesen Autoren eine positive Korrelation der NK-Zell-Aktivität mit motorischen Einschränkungen und dem Hoehn&Yahr-Stadium, also mit dem Fortschreiten der Erkrankung (Bokor, Farago et al. 1993). Hinweise zur Klärung der Frage, ob die NK-Zell-Aktivität eine Folge der fortgeschrittenen Erkrankung oder für das Fortschreiten verantwortlich ist, finden sich jedoch nicht (Mihara, Nakashima et al. 2008).

Unsere Ergebnisse fügen sich insofern in die bisherigen Erkenntnisse, als die beiden Zytokine IL-15 und IL-18 supportiv auf die NK-Zellen und deren Aktivität einwirken. Unter der Annahme, dass die NK-Zellen bei PD durch die fehlenden inhibitorischen Rezeptoren leichter aktivierbar sind (Mihara, Nakashima et al. 2008) und die Zellen auch unter physiologischen Bedingungen eine spezielle Sensitivität für IL-18 aufweisen (Marçais, Viel et al. 2013), wäre eine erhöhte NK-Zell-Aktivität aufgrund der erhöhten Zytokinspiegel durchaus denkbar. Interessanterweise wurde bereits eine Korrelation von erhöhten NK-Zell-Serumspiegeln mit *fatigue* bei PD-Probanden festgestellt (Katsarou, Bostantjopoulou et al. 2007). Prinzipiell sind unsere Ergebnisse – erhöhte Zytokinspiegel assoziiert mit rascherem Voranschreiten von motorischen, autonomen und kognitiven Defiziten – damit vereinbar. Die Erhöhung dieser Zytokine generell kann als Hinweis auf aktiveres Immungeschehen, vermutlich im angeborenen Bereich, im Vergleich zu den Probanden mit langsamerem Progress interpretiert werden.

#### **4.3. Assoziation von IL-8 mit frühem Erkrankungsbeginn**

In den elf extrahierten Verknüpfungen zwischen klinischen/demographischen Parametern und entzündlichen Blutparametern mit p-Wert <0.01 fand sich einmalig eine Assoziation von IL-8 mit frühem Erkrankungsbeginn. Das Resultat muss daher sicherlich mit Vorsicht interpretiert werden. Bei IL-8 handelt es sich um einen proinflammatorischen Botenstoff, der u.a. von Makrophagen sezerniert wird (Hedges, Singer et al. 2000) und der aufgrund seiner chemotaktischen Wirkung auf Immunzellen wie neutrophile Granulozyten (Bittleman and Casale 1995) und – im Zusammenhang dieser Arbeit interessant – NK-Zellen (Liu, Guo et al. 2010) zu den Chemokinen gerechnet werden kann (Andersson, Perry et al. 1992).

In der Literatur finden sich dazu Daten von *Chahine et al.*, die IL-8 mit PD bei Mutationen im GBA-Gen in Verbindung bringen (Chahine, Qiang et al. 2013). Die heterozygote Mutation des GBA-Gens ist die häufigste Mutation bei sporadischer PD. Das Risiko, an PD zu erkranken, ist bei einer GBA-Mutation verglichen mit der Bevölkerung ohne GBA-Mutation um den Faktor 5 erhöht

(Sidransky, Nalls et al. 2009, Chahine, Qiang et al. 2013). Das GBA-Gen codiert für die Glucocerebrosidase, ein lysosomales Enzym, das Glucosylceramide in Glucose und Ceramide spaltet. Diese Mutation scheint über den Monohexosylceramid-Metabolismus eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie von PD und bei der Entstehung von kognitivem Abbau bzw. Demenz zu spielen, da beispielsweise erhöhter Anfall von aggregiertem  $\alpha$ -Synuclein im Parenchym Folge dieser Mutation ist. PD-Patienten mit GBA-Mutation zeigen einen frühen Erkrankungsbeginn und einen frühen kognitiven Abbau bzw. größere Neigung zu Demenz im Vergleich zu PD-Patienten ohne GBA-Mutation (Mielke, Maetzler et al. 2013).

Homozygote Mutationen im GBA-Gen führen zu Morbus Gaucher, einer lysosomalen Speicherkrankheit, die durch Ablagerung von Glykolipiden zu Hepatomegalie, Splenomegalie und Osteopenie (Typ 1) oder bei Ablagerung im ZNS zu neurologischen Beschwerden führt, die entweder innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zum Tod führen (Typ 2) oder später einsetzen und subakut verlaufen (Typ 3) (Wheeler and Sillence 2015). Bei Morbus Gaucher laufen nachweislich entzündliche Prozesse ab, die für die Zell- und Organschäden verantwortlich sind. *Chahine et al.* fanden nun bei PD mit GBA-Mutation erhöhte IL-8-Serumspiegel (Chahine, Qiang et al. 2013).

Für unsere Studie könnte dieses Ergebnis ebenfalls einen Erklärungsansatz bieten: die erhöhten IL-8 Spiegel könnten auf das Vorliegen einer GBA-Mutation bei den entsprechenden Probanden hinweisen, was konsistent wäre mit dem Ergebnis, dass – wie bei GBA-Mutation – IL-8 eine Assoziation mit frühem PD-Erkrankungsalter aufweist. Bei der genetischen Analyse unserer Kohorte wiesen zwei Probanden eine GBA-Mutation auf. Allerdings waren die IL-8-Serumspiegel bei diesen Probanden unter dem Mittelwert von 19.07 pg/ml (17.8 pg/ml bzw. 9.72 pg/ml). Es ist daher anzunehmen, dass dieser Effekt in unserer Kohorte keine relevante Rolle gespielt hat.

Andere humane Daten zu dieser Hypothese gibt es derzeit nicht. Jedoch bestehen Hinweise, dass IL-8 bei klinisch evidenter PD eine Rolle spielen dürfte: *Chahine et al.* fanden – unabhängig von einer GBA-Mutation – eine positive Korrelation von IL-8 mit kognitivem Abbau (Chahine, Qiang et al. 2013).

*Reale et al.* fanden signifikant erhöhte IL-8-Serumspiegel bei PD im Vergleich zu gesunden Kontrollen, jedoch ohne Korrelation mit kognitiven Defiziten (Reale, Iarlori et al. 2009); auch *Scalzo et al.* konnten keine Korrelation von IL-8 mit PD-Symptomen finden (Scalzo, de Miranda et al. 2011). Zukünftige Studien sollten sich daher auf den möglichen Zusammenhang zwischen kognitivem Abbau bei PD und IL-8 fokussieren.

In Zusammenhang mit AD beispielsweise wurde nachgewiesen, dass die chemotaktische Funktion von IL-8 eine tragende Rolle spielt: von den Endothelien der Blut-Hirn-Schranke stammendes IL-8 bindet an seinen Chemokinrezeptor CXCR2, der auf T-Zellen exprimiert wird. Dadurch wird die Migration von T-Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke vermittelt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten die T-Zellen von AD-Probanden eine Überexpression von CXCR2. Wie sich im Tierexperiment zeigte, werden diese Vorgänge dadurch getriggert, dass Amyloid- $\beta$  ( $A\beta$ ) die Mikroglia zur TNF- $\alpha$ -Produktion stimuliert (Liu, Guo et al. 2010). Analog zu den Lewy-Körpern und  $\alpha$ -Synuclein bei PD (siehe S. 21) findet sich das neurotoxische  $A\beta$  als Ablagerungen in Gehirnen von AD-Patienten (Fassbender, Simons et al. 2001), so dass die Vermutung aufkommt, ähnliche Migration von peripheren Zellen durch die Blut-Hirn-Schranke könnte bei PD in Zusammenhang mit  $\alpha$ -Synuclein und IL-8 vonstatten gehen, was eine mögliche Fragestellung für zukünftige Untersuchungen darstellen könnte. In der Literatur finden sich bereits erste Hinweise auf einen ähnlichen Mechanismus bei PD: es zeigte sich, dass die Mikroglia durch den Kontakt mit  $\alpha$ -Synuclein zur TNF- $\alpha$ -Produktion angeregt wird (Surendranathan, Rowe et al. 2015). Ob dies bei PD zur endothelialen IL-8-Sezernierung an der Blut-Hirn-Schranke und über CXCR2 konsekutiv zur Migration peripherer Immunzellen führt, wurde unseres Wissens noch nicht explizit erforscht.

#### **4.4. Korrelation von IL-10 mit dem MoCA-Score**

In den elf extrahierten Verknüpfungen zwischen klinischen/demographischen Variablen und entzündlichen Blutparametern mit p-Werten  $<0.01$  fand sich einmalig eine positive Korrelation von Serum-IL-10 mit dem (absoluten) MoCA-

Score. Ähnlich wie bei der vorherigen, auch einmalig beobachteten Verknüpfung von IL-8 mit früherem Erkrankungsbeginn auf dem geforderten Signifikanzniveau, müssen auch diese Verknüpfungen mit Vorsicht interpretiert werden.

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 war in den vergangenen Jahren Gegenstand zahlreicher Studien, die auf eine neuroprotektive Rolle dieses Immunmediators hinweisen: im PD-Tiermodell – LPS-Injektion in die Substantia nigra – konnte nachgewiesen werden, dass IL-10 durch Verminderung der Mikroglia-Aktivierung mit konsekutiver Verminderung der Freisetzung freier Radikale und anderer zytolytischer bzw. zytotoxischer Immunmechanismen zu geringerem dopaminergem Zelltod führt. Hinweise auf den Erfolg einer IL-10-Therapie bei PD-Patienten gibt es bis dato jedoch nicht (Kwilasz, Grace et al. 2014). Mehrere Studien fanden erhöhte IL-10-Serumspiegel bei PD, die aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse ebenfalls von einer protektiven Funktion von IL-10 ausgehen (Brodacki, Staszewski et al. 2008, Rentzos, Nikolaou et al. 2009).

Die Ergebnisse hinsichtlich einer Assoziation von IL-10 mit bestimmten klinischen PD-Parametern sind uneinheitlich: *Brodacki et al.* und *Menza et al.* konnten keine solche Assoziation finden (Brodacki, Staszewski et al. 2008, Menza, Dobkin et al. 2010), *Rentzos et al.* stellten fest, dass erhöhte IL-10-Serumspiegel eher beim tremordominanten als beim akinetischen PD-Typ zu finden waren (Rentzos, Nikolaou et al. 2009). Eine russische Studiengruppe fand erhöhte IL-10-Spiegel im Blut, die assoziiert waren mit Unruhe und Depression (Milyukhina, Karpenko et al. 2015).

Eine Assoziation mit kognitiven Defiziten bei PD wurde unseres Wissens bisher in keiner anderen Studie nachgewiesen. In Zusammenhang mit den bisherigen Studienergebnissen ist das hier vorliegende Ergebnis wohl am ehesten wie folgt zu interpretieren: der verminderte MoCA-Score weist auf kognitive Defizite und eine eher fortgeschrittene PD hin. Bei dieser fortgeschrittenen PD liefen bereits Entzündungsvorgänge ab, und gegenregulatorisch sind die IL-10-Serumspiegel erhöht. Dies würde bedeuten, dass IL-10 eher als Korrelat einer fortgeschrittenen PD zu sehen ist. Folglich scheint es eher unwahrscheinlich,

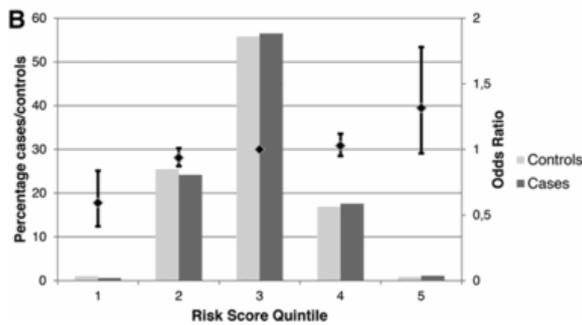
dass IL-10 als biochemischer Parameter eines möglichen inflammatorischen PD-Endophänotyps herangezogen werden kann.

#### **4.5. Der genetische Risikoscore**

Zur Identifikation eines inflammatorischen PD-Endophänotyps war es das Ziel der COEN-Studie, eine Korrelation zwischen einem genetischen Risikoprofil, biochemischen Markern und einem Endophänotyp zu finden, der als inflammatorischer PD-Endophänotyp interpretiert werden kann. Um ein genetisches Risikoprofil zu finden, wurden 114 SNPs mit PD-supportiver Wirkung in einem Risikoscore dargestellt. Interessanterweise spielte der genetische Risikoscore bei der Bestimmung des inflammatorischen PD-Endophänotyps keine relevante Rolle. Woran das liegen könnte, wird nachfolgend diskutiert.

Andere Studien haben bereits ähnliche Ansätze zur Evaluierung des Einflusses von (großen Mengen von Risiko- und protektiven) SNPs auf eine bestimmte Erkrankung gewählt, beispielsweise für das Schlaganfallrisiko (Malik, Bevan et al. 2014) oder Brustkrebs (Wacholder, Hartge et al. 2010).

*Malik et al.* untersuchten über 3 500 Schlaganfall-Patienten und eine Kontrollgruppe auf das Vorhandensein von Risiko-SNPs zur Erstellung eines *genetic risk prediction*-Scores (GRS) bezüglich des genetischen Schlaganfallrisikos. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass der Score keine klinisch relevante Vorhersagekraft hat, was sich gut anhand der Resultate innerhalb der Studie erklären ließ. Das aus der Studie von *Malik et al.* entnommene Schaubild (Abb. 7) ähnelt dem genetischen Risikoscore, der für die COEN-Kohorte erstellt wurde. Abb. 7. zeigt, dass die Mehrheit der untersuchten Probanden (rund 98%) keine signifikante Veränderung der Odds ratio in Bezug auf einen ischämischen Schlaganfall aufweist. Das 95%-Konfidenzintervall in Abb. 7 erstreckt sich stets über das Niveau von OR=1. Nur ein Anteil von ca 1-2% der Kohorte, der sich in der Quintile mit dem niedrigsten errechneten Risiko befindet, zeichnet sich durch eine signifikant erniedrigte OR aus (Malik, Bevan et al. 2014).



**Abb. 7: Odds ratio, einen Apoplex zu erleiden, für fünf verschiedene Risikogruppe, die von *Malik et al.* anhand eines genetischen Risikoscores eingeteilt wurden**

Nur ein Anteil von 1-2% wies eine signifikante Veränderung der Odds ratio bezüglich des Schlaganfallrisikos auf, errechnet anhand eines genetischen Risikovorhersage-Scores.

Entnommen aus: Malik R, Bevan S, Nalls MA, Holliday EG, Devan WJ, Cheng YC, et al. Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies. *Stroke; a journal of cerebral circulation.* 2014;45(2):394-402.

Die Lizenz zur Nutzung der Abbildung wurde freundlicherweise von „Wolters Kluwer Health, Inc.“ erteilt und ist im Anhang beigefügt.

Ähnlich wie die Verteilung der Risikoallele bei *Malik et al.* verhält es sich mit der Verteilung des genetischen Risikos bei den Probanden der COEN-Studie: der Großteil der Probanden hatte (nach dem in Kapitel „II.6. DNA-Analysen“ errechneten Vorgehen) ein genetisches PD-Risiko, das nahe am Mittelwert von 0.055 lag. Nur ca. 2.5% lagen außerhalb des Bereichs von  $MW \pm 2 SD$ . Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen des genetischen Risikoscores mit klinischen/demographischen Parametern.

#### **4.6. Der inflammatorische PD-Endophänotyp: Pro und Kontra für die Definition dieses Subtyps**

Anhand der zwei Arbeitshypothesen dieser Arbeit (siehe Kapitel „I.3. Arbeitshypothesen“) wird nachfolgend die Evidenz für das Vorliegen eines inflammatorischen PD-Endophänotyps im Detail diskutiert.

Bei PD handelt es sich um ein sehr heterogenes Krankheitsbild, das nicht nur motorische Defizite, sondern auch ein breites Spektrum an Symptomen in kognitiven, autonomen und anderen Bereichen aufweist. Denkbar ist deshalb

die Existenz spezifischer PD-Subtypen, die sich durch ein spezifisches klinisches Erscheinungsbild auszeichnen und denen eine spezifische Ätiopathologie bzw. Pathogenese zugrunde liegt (Thenganatt and Jankovic 2014). Die Identifikation von Subtypen mit spezifischer Pathogenese und Klinik würde auf lange Sicht speziell auf den Subtyp abgestimmte, und damit potentiell effektivere und ursächlich orientierte Therapien ermöglichen (van Rooden, Colas et al. 2011).

Ein Beispiel hierfür ist die bei PD vorkommende GBA-Mutation: PD in Zusammenhang mit einer Mutation im Gen für Glucocerebrosidase zeichnet sich durch frühes Erkrankungsalter und schnelleren Progress des kognitiven Abbaus und durch spezifische Veränderungen von Plasmaproteinspiegeln im Vergleich zu PD ohne GBA-Mutation aus (Chahine, Qiang et al. 2013, Mielke, Maetzler et al. 2013).

Bezüglich der Hypothese (i) ergaben sich zwei voneinander unabhängige Cluster an Symptomen, die sich im Vergleich zu anderen Symptomen durch Zytokinerhöhungen auszeichneten: ein Cluster, das gekennzeichnet ist durch rasche Progression der motorischen und autonomen Symptomatik (UPDRS/EK-Dauer und SCOPA/EK-Dauer) und ein Cluster, das rasche Progression des kognitiven Abbaus und längere Krankheitsdauer beinhaltet (MoCA/EK-Dauer und EK-Dauer).

Hypothese (i) ließ sich somit validieren.

Ein klarer inflammatorischer PD-Endophänotyp – s. Hypothese (ii) – kristallisierte sich allerdings nicht heraus. Was nachgewiesen werden konnte, war die beschleunigte Progression von motorischen, kognitiven und autonomen Symptomen, die mit Hochregulation von bestimmten Zytokinen assoziiert war. Es ist allerdings sicherlich möglich, Endophänotypen durch Progressionsmaße zu definieren. Dazu wäre es z. B. naheliegend, in einer Folgeuntersuchung das gesamte Spektrum der Lewy-Körper-Erkrankungen inklusive dementen PD-Patienten und Patienten mit Lewy-Körper-Demenz abzubilden.

Das Cluster MoCA/EK-Dauer zeichnet sich durch Erhöhung des Zytokins IL-18 im Vergleich zu anderen Clustern/Symptomen aus. Die Erhöhung dieses proinflammatorischen Zytokins kann als Hinweis auf aktiveres

Immungeschehen gewertet werden. Dasselbe Cluster zeigte auch erhöhte IL-15-Serumspiegel. Erhöhtes IL-15 war auch bei dem Cluster UPDRS/EK-Dauer und SCOPA/EK-Dauer zu finden. Die beiden Cluster beinhalten die Progression der drei wichtigsten Domänen der PD-Symptomatik: motorische Symptome, autonome Dysregulation und kognitiver Abbau.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Ergebnisse der COEN-Studie nahelegen, dass Entzündungsvorgänge keine spezifische Kombination an klinischer Symptomatik bei PD per se verursachen. Die Ergebnisse dieser Studie können jedoch dahingehend gedeutet werden, dass Entzündungsvorgänge zu dopaminergem Zelltod führen und dieser Zelltod umso ausgeprägter ist – der Progress der Symptome also umso schneller voranschreitet – je aktiver der inflammatorische Prozess abläuft. Dies deutet ebenso darauf hin, dass spezifische Immunreaktionen, z. B. NK-Zell-vermittelte Prozesse, in diese beschleunigte Progression involviert sein können.

#### **4.7. Limitationen**

Bestimmte Faktoren bzw. Gegebenheiten sind zu bedenken, welche einen möglichen Einfluss auf die Aussagekraft der COEN-Studie genommen haben.

Besonders in Betracht gezogen werden müssen die Eigenschaften der Zytokine, welche die Aussagekraft gemessener Zytokinspiegel in Körperflüssigkeiten wie Blutserum einschränken. Zytokine werden in der Regel autokrin und parakrin sezerniert, sodass die Zytokinspiegel am Ort des Entzündungsgeschehens deutlich höhere Spiegel erreichen können als in Körperflüssigkeiten wie Serum, wo sie zusätzlich an Proteine gebunden werden können, und mit der angewandten Messmethode unter Umständen nicht mehr detektierbar sind. Zu bedenken ist des Weiteren, dass kurze Halbwertszeiten von vielen Zytokinen die Ergebnisse ebenfalls relevant beeinflussen können.

Eine weitere Einschränkung stellt der Querschnittscharakter der Studie dar und das Fehlen einer Validierungskohorte in dieser Arbeit. Im Rahmen des Gesamtprojektes wird derzeit allerdings eine Validierungskohorte bei unseren Kooperationspartnern in Toronto rekrutiert. Es ist mit Spannung auf die Ergebnisse zu warten.

## 5. Zusammenfassung

*Parkinson's disease* (PD) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die nach aktueller Datenlage multifaktoriell verursacht wird (Olanow and Tatton 1999, de Lau and Breteler 2006). Auf klinischer Ebene zeichnet sich PD durch ein heterogenes Erscheinungsbild aus. Die Symptome umfassen u.a. Dysfunktionen im motorischen, autonomen und kognitiven Bereich. Auch Ausmaß und Voranschreiten der Symptomatik können sehr unterschiedlich ausfallen (Berg, Lang et al. 2013, Goldman and Postuma 2014, Thenganatt and Jankovic 2014).

Ziel der COEN-Studie war es, voneinander unabhängige Cluster an PD-Symptomen zu identifizieren und herauszufinden, ob sich eines dieser Cluster von anderen Clustern durch signifikante Veränderungen von immunassoziierten Parametern im Serum und anhand eines genetischen Risikoscores unterscheidet. Ein solches Symptom-Cluster kann als inflammatorischer PD-Endophänotyp interpretiert werden, und die erhöhten Blutparameter könnten als Marker diagnostische Bedeutung bezüglich der Abgrenzung dieses Endophänotyps von anderen Formen der PD erlangen. Die Identifizierung eines inflammatorischen PD-Endophänotyps hätte möglicherweise auch im Hinblick auf die Therapie Konsequenzen für die klinische Praxis.

Durch *principal component* Analyse (PCA) konnten voneinander unabhängige Cluster an klinischen PD-Symptomen identifiziert werden: ein Cluster beinhaltete rascheres Voranschreiten von motorischer und autonomer Symptomatik, ein anderes rascheres Voranschreiten des kognitiven Abbaus.

Beim Vergleich der Blutparameter zwischen verschiedenen demographischen/klinischen Parametern zeigte sich rascheres Voranschreiten des kognitiven Abbaus mit erhöhten IL-18-Serumspiegeln assoziiert. Signifikant erhöhte IL-15-Serumspiegel zeigten sich assoziiert mit rascherem kognitivem Abbau und mit rascherem Voranschreiten von motorischer und autonomer Symptomatik. Die Ergebnisse der COEN-Studie geben deshalb Hinweise darauf, dass aktiveres Immungeschehen im Rahmen der PD – im Spezifischen assoziiert mit erhöhten IL-15- und IL-18-Serumspiegeln und damit

möglicherweise mit spezifischen Immunaktivitäten – mit einer rascheren Progression der Erkrankung in den zentralen Symptombereichen (motorisch, autonom, kognitiv) assoziiert ist.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, I., R. Tamouza, M. Delord, R. Krishnamoorthy, C. Tzourio, C. Mulot, M. Nacfer, J. C. Lambert, P. Beaune, P. Laurent-Puig, M. A. Lorient, D. Charron and A. Elbaz (2012). "Association between Parkinson's disease and the HLA-DRB1 locus." Mov Disord **27**(9): 1104-1110.
- Alboni, S., D. Cervia, S. Sugama and B. Conti (2010). "Interleukin 18 in the CNS." J Neuroinflammation **7**: 9.
- Alvarez-Erviti, L., Y. Seow, A. H. Schapira, C. Gardiner, I. L. Sargent, M. J. Wood and J. M. Cooper (2011). "Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission." Neurobiol Dis **42**(3): 360-367.
- Alves, G., J. Lange, K. Blennow, H. Zetterberg, U. Andreasson, M. G. Forland, O. B. Tysnes, J. P. Larsen and K. F. Pedersen (2014). "CSF Abeta42 predicts early-onset dementia in Parkinson disease." Neurology **82**(20): 1784-1790.
- Andalib, S., M. S. Vafaei and A. Gjedde (2014). "Parkinson's disease and mitochondrial gene variations: A review." J Neurol Sci.
- Andersson, P. B., V. H. Perry and S. Gordon (1992). "Intracerebral injection of proinflammatory cytokines or leukocyte chemotaxins induces minimal myelomonocytic cell recruitment to the parenchyma of the central nervous system." J Exp Med **176**(1): 255-259.
- Baba, M., S. Nakajo, P. H. Tu, T. Tomita, K. Nakaya, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski and T. Iwatsubo (1998). "Aggregation of alpha-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Am J Pathol **152**(4): 879-884.
- Baquero, M. and N. Martin (2015). "Depressive symptoms in neurodegenerative diseases." World J Clin Cases **3**(8): 682-693.
- Beck, G. and G. S. Habicht (1996). "Immunity and the invertebrates." Sci Am **275**(5): 60-63, 66.
- Benzinger, P., K. Rapp, W. Maetzler, H. H. König, A. Jaensch, J. Klenk and G. Buchele (2014). "Risk for femoral fractures in Parkinson's disease patients with and without severe functional impairment." PLoS One **9**(5): e97073.
- Berg, D., A. E. Lang, R. B. Postuma, W. Maetzler, G. Deuschl, T. Gasser, A. Siderowf, A. H. Schapira, W. Oertel, J. A. Obeso, C. W. Olanow, W. Poewe and M. Stern (2013). "Changing the research criteria for the diagnosis of Parkinson's disease: obstacles and opportunities." Lancet Neurol **12**(5): 514-524.
- Berg, D., K. Marek, G. W. Ross and W. Poewe (2012). "Defining at-risk populations for Parkinson's disease: lessons from ongoing studies." Mov Disord **27**(5): 656-665.
- Bittleman, D. B. and T. B. Casale (1995). "Interleukin-8 mediates interleukin-1 alpha-induced neutrophil transcellular migration." Am J Respir Cell Mol Biol **13**(3): 323-329.
- Bjornara, K. A., E. Dietrichs and M. Toft (2014). "Clinical features associated with sleep disturbances in Parkinson's disease." Clin Neurol Neurosurg **124C**: 37-43.
- Bokor, M., A. Farago, T. Garam, G. Malatinszky and R. Schnabel (1993). "Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) in Parkinson's disease." J Neurol Sci **115**(1): 47-50.
- Bossu, P., A. Caramella, F. Salani, F. Bizzoni, E. Varsi, F. Di Iulio, F. Giubilei, W. Gianni, A. Trequattrini, M. L. Moro, S. Bernardini, C. Caltagirone and G. Spalletta (2008). "Interleukin-18 produced by peripheral blood cells is increased in Alzheimer's disease and correlates with cognitive impairment." Brain Behav Immun **22**(4): 487-492.
- Bourdenx, M., E. Bezard and B. Dehay (2014). "Lysosomes and alpha-synuclein form a dangerous duet leading to neuronal cell death." Front Neuroanat **8**: 83.

Brockmann, K. and D. Berg (2014). "The significance of GBA for Parkinson's disease." J Inherit Metab Dis **37**(4): 643-648.

Brodacki, B., J. Staszewski, B. Toczyłowska, E. Kozłowska, N. Drela, M. Chalimoniuk and A. Stepien (2008). "Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism." Neurosci Lett **441**(2): 158-162.

Brooks, D. J. (2010). "Imaging approaches to Parkinson disease." J Nucl Med **51**(4): 596-609.

Caballol, N., M. J. Marti and E. Tolosa (2007). "Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson disease." Mov Disord **22 Suppl 17**: S358-366.

Chahine, L. M., J. Qiang, E. Ashbridge, J. Minger, D. Yearout, S. Horn, A. Colcher, H. I. Hurtig, V. M. Lee, V. M. Van Deerlin, J. B. Leverenz, A. D. Siderowf, J. Q. Trojanowski, C. P. Zabetian and A. Chen-Plotkin (2013). "Clinical and biochemical differences in patients having Parkinson disease with vs without GBA mutations." JAMA Neurol **70**(7): 852-858.

Chahine, L. M., M. B. Stern and A. Chen-Plotkin (2014). "Blood-based biomarkers for Parkinson's disease." Parkinsonism Relat Disord **20 Suppl 1**: S99-103.

Chen, H., E. J. O'Reilly, M. A. Schwarzschild and A. Ascherio (2008). "Peripheral inflammatory biomarkers and risk of Parkinson's disease." Am J Epidemiol **167**(1): 90-95.

Chen, J. P., N. S. Liao, S. L. Lai, L. Hsu, W. Y. Mao, M. C. Ku and F. Liao (2005). "Reduced 2,4-dinitro-1-fluorobenzene-induced contact hypersensitivity response in IL-15 receptor alpha-deficient mice correlates with diminished CCL5/RANTES and CXCL10/IP-10 expression." Eur J Immunol **35**(3): 690-698.

Chu, Y., H. Dodiya, P. Aebischer, C. W. Olanow and J. H. Kordower (2009). "Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: relationship to alpha-synuclein inclusions." Neurobiol Dis **35**(3): 385-398.

Comoglu, S. S., H. Guven, M. Acar, G. Ozturk and B. Kocer (2013). "Tear levels of tumor necrosis factor-alpha in patients with Parkinson's disease." Neurosci Lett **553**: 63-67.

Cui, W. and S. M. Kaech (2010). "Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells." Immunol Rev **236**: 151-166.

Dalrymple-Alford, J. C., M. R. MacAskill, C. T. Nakas, L. Livingston, C. Graham, G. P. Crucian, T. R. Melzer, J. Kirwan, R. Keenan, S. Wells, R. J. Porter, R. Watts and T. J. Anderson (2010). "The MoCA: well-suited screen for cognitive impairment in Parkinson disease." Neurology **75**(19): 1717-1725.

Daum, R. F., B. Sekinger, G. Kobal and C. J. Lang (2000). "[Olfactory testing with 'sniffin' sticks' for clinical diagnosis of Parkinson disease]." Nervenarzt **71**(8): 643-650.

de Lau, L. M. and M. M. Breteler (2006). "Epidemiology of Parkinson's disease." Lancet Neurol **5**(6): 525-535.

Dehay, B., J. Bove, N. Rodriguez-Muela, C. Perier, A. Recasens, P. Boya and M. Vila (2010). "Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease." J Neurosci **30**(37): 12535-12544.

Dobbs, R. J., A. Charlett, A. G. Purkiss, S. M. Dobbs, C. Weller and D. W. Peterson (1999). "Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism." Acta Neurol Scand **100**(1): 34-41.

Fassbender, K., M. Simons, C. Bergmann, M. Stroick, D. Lutjohann, P. Keller, H. Runz, S. Kuhl, T. Bertsch, K. von Bergmann, M. Hennerici, K. Beyreuther and T. Hartmann (2001). "Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5856-5861.

Felderhoff-Mueser, U., O. I. Schmidt, A. Oberholzer, C. Buhner and P. F. Stahel (2005). "IL-18: a key player in neuroinflammation and neurodegeneration?" Trends Neurosci **28**(9): 487-493.

Fling, B. W., R. G. Cohen, M. Mancini, S. D. Carpenter, D. A. Fair, J. G. Nutt and F. B. Horak (2014). "Functional reorganization of the locomotor network in Parkinson patients with freezing of gait." PLoS One **9**(6): e100291.

Fukae, J., S. Sato, K. Shiba, K. Sato, H. Mori, P. A. Sharp, Y. Mizuno and N. Hattori (2009). "Programmed cell death-2 isoform1 is ubiquitinated by parkin and increased in the substantia nigra of patients with autosomal recessive Parkinson's disease." FEBS Lett **583**(3): 521-525.

Gangemi, S., G. Basile, R. A. Merendino, A. Epifanio, G. Di Pasquale, B. Ferlazzo, V. Nicita-Mauro and L. Morgante (2003). "Effect of levodopa on interleukin-15 and RANTES circulating levels in patients affected by Parkinson's disease." Mediators Inflamm **12**(4): 251-253.

Gao, X., H. Chen, M. A. Schwarzschild and A. Ascherio (2011). "Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease." Neurology **76**(10): 863-869.

Garcia Ruiz, P. J. (2004). "[Prehistory of Parkinson's disease]." Neurologia **19**(10): 735-737.

Garcia-Esparcia, P., F. Llorens, M. Carmona and I. Ferrer (2014). "Complex Deregulation and Expression of Cytokines and Mediators of the Immune Response in Parkinson's Disease Brain is Region Dependent." Brain Pathol.

Gimsa, U., N. A. Mitchison and M. C. Brunner-Weinzierl (2013). "Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation." Mediators Inflamm **2013**: 320519.

Goldman, J. G. and R. Postuma (2014). "Premotor and nonmotor features of Parkinson's disease." Curr Opin Neurol **27**(4): 434-441.

Goldman, S. M., F. Kamel, G. W. Ross, S. A. Jewell, C. Marras, J. A. Hoppin, D. M. Umbach, G. S. Bhudhikanok, C. Meng, M. Korell, K. Comyns, R. A. Hauser, J. Jankovic, S. A. Factor, S. Bressman, K. E. Lyons, D. P. Sandler, J. W. Langston and C. M. Tanner (2014). "Peptidoglycan recognition protein genes and risk of Parkinson's disease." Mov Disord.

Gomez-Nicola, D., B. Valle-Argos, D. W. Pita-Thomas and M. Nieto-Sampedro (2008). "Interleukin 15 expression in the CNS: blockade of its activity prevents glial activation after an inflammatory injury." Glia **56**(5): 494-505.

Grabstein, K. H., J. Eisenman, K. Shanebeck, C. Rauch, S. Srinivasan, V. Fung, C. Beers, J. Richardson, M. A. Schoenborn, M. Ahdieh and et al. (1994). "Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor." Science **264**(5161): 965-968.

Gracie, J. A., S. E. Robertson and I. B. McInnes (2003). "Interleukin-18." J Leukoc Biol **73**(2): 213-224.

Guillen-Riquelme, A. and G. Buena-Casal (2014). "[Meta-analysis of group comparison and meta-analysis of reliability generalization of the State-Trait Anxiety Inventory Questionnaire (STAI)]." Rev Esp Salud Publica **88**(1): 101-112.

Gutcher, I. and B. Becher (2007). "APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation." J Clin Invest **117**(5): 1119-1127.

Hall, B. M. (2015). "T Cells: Soldiers and Spies-The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells." Clin J Am Soc Nephrol.

Hamza, T. H., C. P. Zabetian, A. Tenesa, A. Laederach, J. Montimurro, D. Yearout, D. M. Kay, K. F. Doheny, J. Paschall, E. Pugh, V. I. Kusel, R. Collura, J. Roberts, A. Griffith, A. Samii, W. K. Scott, J. Nutt, S. A. Factor and H. Payami (2010). "Common genetic variation in the HLA region is associated with late-onset sporadic Parkinson's disease." Nat Genet **42**(9): 781-785.

Han, W., Y. Lou, J. Tang, Y. Zhang, Y. Chen, Y. Li, W. Gu, J. Huang, L. Gui, Y. Tang, F. Li, Q. Song, C. Di, L. Wang, Q. Shi, R. Sun, D. Xia, M. Rui, J. Tang and D. Ma (2001). "Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity." Biochem J **357**(Pt 1): 127-135.

Hedges, J. C., C. A. Singer and W. T. Gerthoffer (2000). "Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(1): 86-94.

Hedtjarn, M., A. L. Leverin, K. Eriksson, K. Blomgren, C. Mallard and H. Hagberg (2002). "Interleukin-18 involvement in hypoxic-ischemic brain injury." J Neurosci **22**(14): 5910-5919.

Hickey, W. F., B. L. Hsu and H. Kimura (1991). "T-lymphocyte entry into the central nervous system." J Neurosci Res **28**(2): 254-260.

Hill-Burns, E. M., S. A. Factor, C. P. Zabetian, G. Thomson and H. Payami (2011). "Evidence for more than one Parkinson's disease-associated variant within the HLA region." PLoS One **6**(11): e27109.

Hirsch, E. C. and S. Hunot (2009). "Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?" Lancet Neurol **8**(4): 382-397.

Hofmann, K. W., A. F. Schuh, J. Saute, R. Townsend, D. Fricke, R. Leke, D. O. Souza, L. V. Portela, M. L. Chaves and C. R. Rieder (2009). "Interleukin-6 serum levels in patients with Parkinson's disease." Neurochem Res **34**(8): 1401-1404.

Holmans, P., V. Moskvina, L. Jones, M. Sharma, C. International Parkinson's Disease Genomics, A. Vedernikov, F. Buchel, M. Sadd, J. M. Bras, F. Bettella, N. Nicolaou, J. Simon-Sanchez, F. Mittag, J. R. Gibbs, C. Schulte, A. Durr, R. Guerreiro, D. Hernandez, A. Brice, H. Stefansson, K. Majamaa, T. Gasser, P. Heutink, N. W. Wood, M. Martinez, A. B. Singleton, M. A. Nalls, J. Hardy, H. R. Morris and N. M. Williams (2013). "A pathway-based analysis provides additional support for an immune-related genetic susceptibility to Parkinson's disease." Hum Mol Genet **22**(5): 1039-1049.

Hughes, A. J., S. E. Daniel, L. Kilford and A. J. Lees (1992). "Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases." J Neurol Neurosurg Psychiatry **55**(3): 181-184.

Hughes, A. J., S. E. Daniel and A. J. Lees (2001). "Improved accuracy of clinical diagnosis of Lewy body Parkinson's disease." Neurology **57**(8): 1497-1499.

Hyman, C., M. Hofer, Y. A. Barde, M. Juhasz, G. D. Yancopoulos, S. P. Squinto and R. M. Lindsay (1991). "BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra." Nature **350**(6315): 230-232.

Iijima, M., T. Kobayakawa, S. Saito, M. Osawa, Y. Tsutsumi, S. Hashimoto and S. Uchiyama (2011). "Differences in odor identification among clinical subtypes of Parkinson's disease." Eur J Neurol **18**(3): 425-429.

International Parkinson Disease Genomics, C., M. A. Nalls, V. Plagnol, D. G. Hernandez, M. Sharma, U. M. Sheerin, M. Saad, J. Simon-Sanchez, C. Schulte, S. Lesage, S. Sveinbjornsdottir, K. Stefansson, M. Martinez, J. Hardy, P. Heutink, A. Brice, T. Gasser, A. B. Singleton and N. W. Wood (2011). "Imputation of sequence variants for identification of genetic risks for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies." Lancet **377**(9766): 641-649.

International Parkinson's Disease Genomics, C. and C. Wellcome Trust Case Control (2011). "A two-stage meta-analysis identifies several new loci for Parkinson's disease." PLoS Genet **7**(6): e1002142.

Irvine, G. B., O. M. El-Agnaf, G. M. Shankar and D. M. Walsh (2008). "Protein aggregation in the brain: the molecular basis for Alzheimer's and Parkinson's diseases." Mol Med **14**(7-8): 451-464.

Jankovic, J. (2008). "Parkinson's disease: clinical features and diagnosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(4): 368-376.

Johns, M. W. (1991). "A new method for measuring daytime sleepiness: the Epworth sleepiness scale." Sleep **14**(6): 540-545.

Kang, J. H., D. J. Irwin, A. S. Chen-Plotkin, A. Siderowf, C. Caspell, C. S. Coffey, T. Waligorska, P. Taylor, S. Pan, M. Frasier, K. Marek, K. Kiebertz, D. Jennings, T. Simuni, C. M. Tanner, A. Singleton, A. W. Toga, S. Chowdhury, B. Mollenhauer, J. Q. Trojanowski, L. M. Shaw and I. Parkinson's Progression Markers (2013). "Association of cerebrospinal fluid beta-amyloid 1-42, T-tau, P-tau181, and alpha-synuclein levels with clinical features of drug-naive patients with early Parkinson disease." JAMA Neurol **70**(10): 1277-1287.

Katsarou, Z., S. Bostantjopoulou, O. Hatzizisi, E. Giza, A. Soler-Cardona and G. Kyriazis (2007). "[Immune factors or depression? Fatigue correlates in Parkinson's disease]." Rev Neurol **45**(12): 725-728.

Kaushik, D. K. and A. Basu (2013). "A Friend in Need may not be a Friend Indeed: Role of Microglia in Neurodegenerative Diseases." CNS Neurol Disord Drug Targets.

Keller, M. F., M. Saad, J. Bras, F. Bettella, N. Nicolaou, J. Simon-Sanchez, F. Mittag, F. Buchel, M. Sharma, J. R. Gibbs, C. Schulte, V. Moskvina, A. Durr, P. Holmans, L. L. Kilarski, R. Guerreiro, D. G. Hernandez, A. Brice, P. Ylikotila, H. Stefansson, K. Majamaa, H. R. Morris, N. Williams, T. Gasser, P. Heutink, N. W. Wood, J. Hardy, M. Martinez, A. B. Singleton, M. A. Nalls, C. International Parkinson's Disease Genomics and C. Wellcome Trust Case Control (2012). "Using genome-wide complex trait analysis to quantify 'missing heritability' in Parkinson's disease." Hum Mol Genet **21**(22): 4996-5009.

Khalif, I. L., E. M. Quigley, E. A. Konovitch and I. D. Maximova (2005). "Alterations in the colonic flora and intestinal permeability and evidence of immune activation in chronic constipation." Dig Liver Dis **37**(11): 838-849.

Khan, N. L., S. Jain, J. M. Lynch, N. Pavese, P. Abou-Sleiman, J. L. Holton, D. G. Healy, W. P. Gilks, M. G. Sweeney, M. Ganguly, V. Gibbons, S. Gandhi, J. Vaughan, L. H. Eunson, R. Katzenschlager, J. Gayton, G. Lennox, T. Revesz, D. Nicholl, K. P. Bhatia, N. Quinn, D. Brooks, A. J. Lees, M. B. Davis, P. Piccini, A. B. Singleton and N. W. Wood (2005). "Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data." Brain **128**(Pt 12): 2786-2796.

Kleinhans, S. (2014). Dual Tasking-Aspekte bei Hochrisiko-Personen für das Parkinsonsyndrom.

Koziorowski, D., R. Tomasiuk, S. Szlufik and A. Friedman (2012). "Inflammatory cytokines and NT-proCNP in Parkinson's disease patients." Cytokine **60**(3): 762-766.

Kubo, M., Y. Kamiya, R. Nagashima, T. Maekawa, K. Eshima, S. Azuma, E. Ohta and F. Obata (2010). "LRRK2 is expressed in B-2 but not in B-1 B cells, and downregulated by cellular activation." J Neuroimmunol **229**(1-2): 123-128.

Kwilasz, A. J., P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier and L. R. Watkins (2014). "The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases." Neuropharmacology.

Lanciego, J. L., N. Luquin and J. A. Obeso (2012). "Functional neuroanatomy of the basal ganglia." Cold Spring Harb Perspect Med **2**(12): a009621.

Laske, C., A. J. Fallgatter, E. Stransky, K. Hagen, D. Berg and W. Maetzler (2011). "Decreased alpha-synuclein serum levels in patients with Lewy body dementia compared to Alzheimer's disease patients and control subjects." Dement Geriatr Cogn Disord **31**(6): 413-416.

Lees, A. J., J. Hardy and T. Revesz (2009). "Parkinson's disease." Lancet **373**(9680): 2055-2066.

Levin, B. E., M. M. Llabre and W. J. Weiner (1988). "Parkinson's disease and depression: psychometric properties of the Beck Depression Inventory." J Neurol Neurosurg Psychiatry **51**(11): 1401-1404.

Lindqvist, D., S. Hall, Y. Surova, H. M. Nielsen, S. Janelidze, L. Brundin and O. Hansson (2013). "Cerebrospinal fluid inflammatory markers in Parkinson's disease--associations with depression, fatigue, and cognitive impairment." Brain Behav Immun **33**: 183-189.

Lingor, P., K. Unsicker and K. Krieglstein (2000). "GDNF and NT-4 protect midbrain dopaminergic neurons from toxic damage by iron and nitric oxide." Exp Neurol **163**(1): 55-62.

Liu, Y. J., D. W. Guo, L. Tian, D. S. Shang, W. D. Zhao, B. Li, W. G. Fang, L. Zhu and Y. H. Chen (2010). "Peripheral T cells derived from Alzheimer's disease patients overexpress CXCR2 contributing to its transendothelial migration, which is microglial TNF-alpha-dependent." Neurobiol Aging **31**(2): 175-188.

Maetzler, W., A. Apel, M. Langkamp, C. Deuschle, S. S. Dilger, J. G. Stirnkorb, C. Schulte, E. Schleicher, T. Gasser and D. Berg (2014). "Comparable autoantibody serum levels against amyloid- and inflammation-associated proteins in Parkinson's disease patients and controls." PLoS One **9**(2): e88604.

Maetzler, W., S. P. Schmid, I. Wurster, I. Liepelt, A. Gaenslen, T. Gasser and D. Berg (2011). "Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases." Mov Disord **26**(1): 176-181.

Malek, N., D. Swallow, K. A. Grosset, O. Anichtchik, M. Spillantini and D. G. Grosset (2014). "Alpha-synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review." Acta Neurol Scand **130**(2): 59-72.

Malik, R., S. Bevan, M. A. Nalls, E. G. Holliday, W. J. Devan, Y. C. Cheng, C. A. Ibrahim-Verbaas, B. F. Verhaaren, J. C. Bis, A. Y. Joon, A. L. de Stefano, M. Fornage, B. M. Psaty, M. A. Ikram, L. J. Launer, C. M. van Duijn, P. Sharma, B. D. Mitchell, J. Rosand, J. F. Meschia, C. Levi, P. M. Rothwell, C. Sudlow, H. S. Markus, S. Seshadri, M. Dichgans and C. Wellcome Trust Case Control (2014). "Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies." Stroke **45**(2): 394-402.

Marcais, A., S. Viel, M. Grau, T. Henry, J. Marvel and T. Walzer (2013). "Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines." Front Immunol **4**: 450.

Mauri, C. and A. Bosma (2012). "Immune regulatory function of B cells." Annu Rev Immunol **30**: 221-241.

McGeer, P. L., S. Itagaki, B. E. Boyes and E. G. McGeer (1988). "Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains." Neurology **38**(8): 1285-1291.

Menza, M., R. D. Dobkin, H. Marin, M. H. Mark, M. Gara, K. Bienfait, A. Dicke and A. Kusnekov (2010). "The role of inflammatory cytokines in cognition and other non-motor symptoms of Parkinson's disease." Psychosomatics **51**(6): 474-479.

Mielke, M. M. and W. Maetzler (2014). "A 'bird's eye' view on the current status and potential benefits of blood biomarkers for Parkinson's disease." Biomark Med **8**(2): 225-227.

Mielke, M. M., W. Maetzler, N. J. Haughey, V. V. Bandaru, R. Savica, C. Deuschle, T. Gasser, A. K. Hauser, S. Graber-Sultan, E. Schleicher, D. Berg and I. Liepelt-Scarfone (2013). "Plasma ceramide and glucosylceramide metabolism is altered in sporadic Parkinson's disease and associated with cognitive impairment: a pilot study." PLoS One **8**(9): e73094.

Mihara, T., M. Nakashima, A. Kuroiwa, Y. Akitake, K. Ono, M. Hosokawa, T. Yamada and M. Takahashi (2008). "Natural killer cells of Parkinson's disease patients are set up for activation: a possible role for innate immunity in the pathogenesis of this disease." Parkinsonism Relat Disord **14**(1): 46-51.

Milyukhina, I. V., M. N. Karpenko and V. M. Klimenko (2015). "[Clinical parameters and the level of certain cytokines in blood and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease]." Klin Med (Mosk) **93**(1): 51-55.

Moran, A. P., M. M. Prendergast and B. J. Appelmelk (1996). "Molecular mimicry of host structures by bacterial lipopolysaccharides and its contribution to disease." FEMS Immunol Med Microbiol **16**(2): 105-115.

Movement Disorder Society Task Force on Rating Scales for Parkinson's, D. (2003). "The Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS): status and recommendations." Mov Disord **18**(7): 738-750.

Nalls, M. A., N. Pankratz, C. M. Lill, C. B. Do, D. G. Hernandez, M. Saad, A. L. DeStefano, E. Kara, J. Bras, M. Sharma, C. Schulte, M. F. Keller, S. Arepalli, C. Letson, C. Edsall, H. Stefansson, X. Liu, H. Pliner, J. H. Lee, R. Cheng, C. International Parkinson's Disease Genomics, G. I. Parkinson's Study Group Parkinson's Research: The Organized, andMe, GenePd, C. NeuroGenetics Research, G. Hussman Institute of Human, I. Ashkenazi Jewish Dataset, H. Cohorts for, E. Aging Research in Genetic, C. North American Brain Expression, C. United Kingdom Brain Expression, C. Greek Parkinson's Disease, G. Alzheimer Genetic Analysis, M. A. Ikram, J. P. Ioannidis, G. M. Hadjigeorgiou, J. C. Bis, M. Martinez, J. S. Perlmutter, A. Goate, K. Marder, B. Fiske, M. Sutherland, G. Xiomerisiou, R. H. Myers, L. N. Clark, K. Stefansson, J. A. Hardy, P. Heutink, H. Chen, N. W. Wood, H. Houlden, H. Payami, A. Brice, W. K. Scott, T. Gasser, L. Bertram, N. Eriksson, T. Foroud and A. B. Singleton (2014). "Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease." Nat Genet **46**(9): 989-993.

Nguyen, M. D., J. P. Julien and S. Rivest (2002). "Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration?" Nat Rev Neurosci **3**(3): 216-227.

Nuebel, M. (2015). "Entwicklung und Validierung eines 4-plex Immunoassays zur Quantifizierung von löslichen Rezeptorfragmenten in Proben von Parkinson Patienten."

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, B. Benitez-Temino, F. J. Blesa, J. Guridi, C. Marin and M. Rodriguez (2008). "Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease." Mov Disord **23 Suppl 3**: S548-559.

Obeso, J. A., M. C. Rodriguez-Oroz, C. G. Goetz, C. Marin, J. H. Kordower, M. Rodriguez, E. C. Hirsch, M. Farrer, A. H. Schapira and G. Halliday (2010). "Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle." Nat Med **16**(6): 653-661.

Olanow, C. W. and W. G. Tatton (1999). "Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease." Annu Rev Neurosci **22**: 123-144.

Olson, N. C., R. Sallam, M. F. Doyle, R. P. Tracy and S. A. Huber (2013). "T helper cell polarization in healthy people: implications for cardiovascular disease." J Cardiovasc Transl Res **6**(5): 772-786.

Pan-Montojo, F., M. Schwarz, C. Winkler, M. Arnhold, G. A. O'Sullivan, A. Pal, J. Said, G. Marsico, J. M. Verbavatz, M. Rodrigo-Angulo, G. Gille, R. H. Funk and H. Reichmann (2012). "Environmental toxins trigger PD-like progression via increased alpha-synuclein release from enteric neurons in mice." Sci Rep **2**: 898.

Pankratz, N., G. W. Beecham, A. L. DeStefano, T. M. Dawson, K. F. Doherty, S. A. Factor, T. H. Hamza, A. Y. Hung, B. T. Hyman, A. J. Iverson, D. Krainc, J. C. Latourelle, L. N. Clark, K. Marder, E. R. Martin, R. Mayeux, O. A. Ross, C. R. Scherzer, D. K. Simon, C. Tanner, J. M. Vance, Z. K. Wszolek, C. P. Zabetian, R. H. Myers, H. Payami, W. K. Scott, T. Foroud and P. G. Consortium (2012). "Meta-analysis of Parkinson's disease: identification of a novel locus, RIT2." Ann Neurol **71**(3): 370-384.

Parkinson, J. (2002). "An essay on the shaking palsy. 1817." J Neuropsychiatry Clin Neurosci **14**(2): 223-236; discussion 222.

Parnetti, L., D. Chiasserini, E. Persichetti, P. Eusebi, S. Varghese, M. M. Qureshi, A. Dardis, M. Deganuto, C. De Carlo, A. Castrioto, C. Balducci, S. Paciotti, N. Tambasco, B. Bembi, L. Bonanni, M. Onofri, A. Rossi, T. Beccari, O. El-Agnaf and P. Calabresi (2014). "Cerebrospinal fluid lysosomal enzymes and alpha-synuclein in Parkinson's disease." Mov Disord **29**(8): 1019-1027.

Perry, V. H., J. A. Nicoll and C. Holmes (2010). "Microglia in neurodegenerative disease." Nat Rev Neurol **6**(4): 193-201.

Poewe, W. (2006). "The natural history of Parkinson's disease." J Neurol **253** Suppl 7: VII2-6.

Postuma, R. B., A. E. Lang, J. F. Gagnon, A. Pelletier and J. Y. Montplaisir (2012). "How does parkinsonism start? Prodromal parkinsonism motor changes in idiopathic REM sleep behaviour disorder." Brain **135**(Pt 6): 1860-1870.

Proukakis, C., H. Houlden and A. H. Schapira (2013). "Somatic alpha-synuclein mutations in Parkinson's disease: hypothesis and preliminary data." Mov Disord **28**(6): 705-712.

Ran, C., T. Willows, O. Sydow, A. Johansson, P. Soderkvist, N. Dizdar, A. Ahmadi, L. Olson and A. C. Belin (2013). "The HLA-DRA variation rs3129882 is not associated with Parkinson's disease in Sweden." Parkinsonism Relat Disord **19**(7): 701-702.

Raudino, F. (2012). "The Parkinson disease before James Parkinson." Neurol Sci **33**(4): 945-948.

Reale, M., N. H. Greig and M. A. Kamal (2009). "Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases." Mini Rev Med Chem **9**(10): 1229-1241.

Reale, M., C. Iarlori, A. Thomas, D. Gambi, B. Perfetti, M. Di Nicola and M. Onofri (2009). "Peripheral cytokines profile in Parkinson's disease." Brain Behav Immun **23**(1): 55-63.

Rentzos, M., C. Nikolaou, E. Andreadou, G. P. Paraskevas, A. Rombos, M. Zoga, A. Tsoutsou, F. Boufidou, E. Kapaki and D. Vassilopoulos (2007). "Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **116**(6): 374-379.

Rentzos, M., C. Nikolaou, E. Andreadou, G. P. Paraskevas, A. Rombos, M. Zoga, A. Tsoutsou, F. Boufidou, E. Kapaki and D. Vassilopoulos (2009). "Circulating interleukin-10 and interleukin-12 in Parkinson's disease." Acta Neurol Scand **119**(5): 332-337.

Rentzos, M. and A. Rombos (2012). "The role of IL-15 in central nervous system disorders." Acta Neurol Scand **125**(2): 77-82.

Rocha, N. P., A. L. Teixeira, P. L. Scalzo, I. G. Barbosa, M. S. de Sousa, I. B. Morato, E. L. Vieira, P. P. Christo, A. Palotas and H. J. Reis (2014). "Plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptors are associated with cognitive performance in Parkinson's disease." Mov Disord **29**(4): 527-531.

Santos, D., A. R. Esteves, D. F. Silva, C. Januario and S. M. Cardoso (2014). "The Impact of Mitochondrial Fusion and Fission Modulation in Sporadic Parkinson's Disease." Mol Neurobiol.

Saracchi, E., S. Fermi and L. Brighina (2014). "Emerging candidate biomarkers for Parkinson's disease: a review." Aging Dis **5**(1): 27-34.

Savica, R., J. M. Carlin, B. R. Grossardt, J. H. Bower, J. E. Ahlskog, D. M. Maraganore, A. E. Bharucha and W. A. Rocca (2009). "Medical records documentation of constipation preceding Parkinson disease: A case-control study." Neurology **73**(21): 1752-1758.

Scalzo, P., A. S. de Miranda, D. C. Guerra Amaral, M. de Carvalho Vilela, F. Cardoso and A. L. Teixeira (2011). "Serum levels of chemokines in Parkinson's disease." Neuroimmunomodulation **18**(4): 240-244.

Scalzo, P., A. Kummer, F. Cardoso and A. L. Teixeira (2010). "Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance." Neurosci Lett **468**(1): 56-58.

Schulz-Schaeffer, W. J. (2010). "The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia." Acta Neuropathol **120**(2): 131-143.

Siderowf, A., S. X. Xie, H. Hurtig, D. Weintraub, J. Duda, A. Chen-Plotkin, L. M. Shaw, V. Van Deerlin, J. Q. Trojanowski and C. Clark (2010). "CSF amyloid {beta} 1-42 predicts cognitive decline in Parkinson disease." Neurology **75**(12): 1055-1061.

Sidransky, E., M. A. Nalls, J. O. Aasly, J. Aharon-Peretz, G. Annesi, E. R. Barbosa, A. Bar-Shira, D. Berg, J. Bras, A. Brice, C. M. Chen, L. N. Clark, C. Condroyer, E. V. De Marco, A. Durr, M. J. Eblan, S. Fahn, M. J. Farrer, H. C. Fung, Z. Gan-Or, T. Gasser, R. Gershoni-Baruch, N. Giladi, A. Griffith, T. Gurevich, C. Januario, P. Kropp, A. E. Lang, G. J. Lee-Chen, S. Lesage, K. Marder, I. F. Mata, A. Mirelman, J. Mitsui, I. Mizuta, G. Nicoletti, C. Oliveira, R. Ottman, A. Orr-Urtreger, L. V. Pereira, A. Quattrone, E. Rogaeva, A. Rolfs, H. Rosenbaum, R. Rozenberg, A. Samii, T. Samaddar, C. Schulte, M. Sharma, A. Singleton, M. Spitz, E. K. Tan, N. Tayebi, T. Toda, A. R. Troiano, S. Tsuji, M. Wittstock, T. G. Wolfsberg, Y. R. Wu, C. P. Zabetian, Y. Zhao and S. G. Ziegler (2009). "Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease." N Engl J Med **361**(17): 1651-1661.

Simon-Sanchez, J., J. J. van Hilten, B. van de Warrenburg, B. Post, H. W. Berendse, S. Arepalli, D. G. Hernandez, R. M. de Bie, D. Velseboer, H. Scheffer, B. Bloem, K. D. van Dijk, F. Rivadeneira, A. Hofman, A. G. Uitterlinden, P. Rizzu, Z. Bochdanovits, A. B. Singleton and P. Heutink (2011). "Genome-wide association study confirms extant PD risk loci among the Dutch." Eur J Hum Genet **19**(6): 655-661.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan (2009). "T cell activation." Annu Rev Immunol **27**: 591-619.

Song, I. U., S. W. Chung, J. S. Kim and K. S. Lee (2011). "Association between high-sensitivity C-reactive protein and risk of early idiopathic Parkinson's disease." Neurol Sci **32**(1): 31-34.

Spillantini, M. G., M. L. Schmidt, V. M. Lee, J. Q. Trojanowski, R. Jakes and M. Goedert (1997). "Alpha-synuclein in Lewy bodies." Nature **388**(6645): 839-840.

Stiasny-Kolster, K., G. Mayer, S. Schafer, J. C. Moller, M. Heinzel-Gutenbrunner and W. H. Oertel (2007). "The REM sleep behavior disorder screening questionnaire--a new diagnostic instrument." Mov Disord **22**(16): 2386-2393.

Stone, D. K., A. D. Reynolds, R. L. Mosley and H. E. Gendelman (2009). "Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease." Antioxid Redox Signal **11**(9): 2151-2166.

Stypula, G., J. Kunert-Radek, H. Stepien, K. Zylinska and M. Pawlikowski (1996). "Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease." Neuroimmunomodulation **3**(2-3): 131-134.

Subramaniam, S. R., L. Vergnes, N. R. Franich, K. Reue and M. F. Chesselet (2014). "Region specific mitochondrial impairment in mice with widespread overexpression of alpha-synuclein." Neurobiol Dis **70**: 204-213.

Sugama, S., S. A. Wirz, A. M. Barr, B. Conti, T. Bartfai and T. Shibasaki (2004). "Interleukin-18 null mice show diminished microglial activation and reduced dopaminergic neuron loss following acute 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine treatment." Neuroscience **128**(2): 451-458.

Sugawara, S., A. Uehara, T. Nochi, T. Yamaguchi, H. Ueda, A. Sugiyama, K. Hanzawa, K. Kumagai, H. Okamura and H. Takada (2001). "Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells." J Immunol **167**(11): 6568-6575.

Surendranathan, A., J. B. Rowe and J. T. O'Brien (2015). "Neuroinflammation in Lewy body dementia." Parkinsonism Relat Disord.

Tanaka, S., A. Ishii, H. Ohtaki, S. Shioda, T. Yoshida and S. Numazawa (2013). "Activation of microglia induces symptoms of Parkinson's disease in wild-type, but not in IL-1 knockout mice." J Neuroinflammation **10**: 143.

Tang, P., L. Chong, X. Li, Y. Liu, P. Liu, C. Hou and R. Li (2014). "Correlation between serum RANTES levels and the severity of Parkinson's disease." *Oxid Med Cell Longev* **2014**: 208408.

Thenganatt, M. A. and J. Jankovic (2014). "Parkinson disease subtypes." *JAMA Neurol* **71**(4): 499-504.

Tompkins, M. M. and W. D. Hill (1997). "Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death." *Brain Res* **775**(1-2): 24-29.

Ton, T. G., S. Jain, M. L. Biggs, E. L. Thacker, E. S. Strotmeyer, R. Boudreau, A. B. Newman, W. T. Longstreth, Jr. and H. Checkoway (2012). "Markers of inflammation in prevalent and incident Parkinson's disease in the Cardiovascular Health Study." *Parkinsonism Relat Disord* **18**(3): 274-278.

Ubeda-Banon, I., D. Saiz-Sanchez, C. de la Rosa-Prieto, L. Argandona-Palacios, S. Garcia-Munozguren and A. Martinez-Marcos (2010). "alpha-Synucleinopathy in the human olfactory system in Parkinson's disease: involvement of calcium-binding protein- and substance P-positive cells." *Acta Neuropathol* **119**(6): 723-735.

Valente, E. M., S. Salvi, T. Ialongo, R. Marongiu, A. E. Elia, V. Caputo, L. Romito, A. Albanese, B. Dallapiccola and A. R. Bentivoglio (2004). "PINK1 mutations are associated with sporadic early-onset parkinsonism." *Ann Neurol* **56**(3): 336-341.

Van Den Eeden, S. K., C. M. Tanner, A. L. Bernstein, R. D. Fross, A. Leimpeter, D. A. Bloch and L. M. Nelson (2003). "Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity." *Am J Epidemiol* **157**(11): 1015-1022.

van Rooden, S. M., F. Colas, P. Martinez-Martin, M. Visser, D. Verbaan, J. Marinus, R. K. Chaudhuri, J. N. Kok and J. J. van Hilten (2011). "Clinical subtypes of Parkinson's disease." *Mov Disord* **26**(1): 51-58.

Visser, M., J. Marinus, A. M. Stiggelbout and J. J. Van Hilten (2004). "Assessment of autonomic dysfunction in Parkinson's disease: the SCOPA-AUT." *Mov Disord* **19**(11): 1306-1312.

Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer and S. Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* **9**(5): 503-510.

Wacholder, S., P. Hartge, R. Prentice, M. Garcia-Closas, H. S. Feigelson, W. R. Diver, M. J. Thun, D. G. Cox, S. E. Hankinson, P. Kraft, B. Rosner, C. D. Berg, L. A. Brinton, J. Lissowska, M. E. Sherman, R. Chlebowski, C. Kooperberg, R. D. Jackson, D. W. Buckman, P. Hui, R. Pfeiffer, K. B. Jacobs, G. D. Thomas, R. N. Hoover, M. H. Gail, S. J. Chanock and D. J. Hunter (2010). "Performance of common genetic variants in breast-cancer risk models." *N Engl J Med* **362**(11): 986-993.

Wang, Q., Y. Liu and J. Zhou (2015). "Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target." *Transl Neurodegener* **4**: 19.

Wheeler, S. and D. J. Sillence (2015). "Mechanisms of Gaucher disease pathogenesis." *Ann Transl Med* **3**(Suppl 1): S1.

Williams, D. R., R. de Silva, D. C. Paviour, A. Pittman, H. C. Watt, L. Kilford, J. L. Holton, T. Revesz and A. J. Lees (2005). "Characteristics of two distinct clinical phenotypes in pathologically proven progressive supranuclear palsy: Richardson's syndrome and PSP-parkinsonism." *Brain* **128**(Pt 6): 1247-1258.

Yu, S. Y., L. J. Zuo, F. Wang, Z. J. Chen, Y. Hu, Y. J. Wang, X. M. Wang and W. Zhang (2014). "Potential biomarkers relating pathological proteins, neuroinflammatory factors and free radicals in PD patients with cognitive impairment: a cross-sectional study." *BMC Neurol* **14**: 113.

Zheng, H. F., Y. P. Yang, L. F. Hu, M. X. Wang, F. Wang, L. D. Cao, D. Li, C. J. Mao, K. P. Xiong, J. D. Wang and C. F. Liu (2013). "Autophagic impairment contributes to systemic inflammation-induced dopaminergic neuron loss in the midbrain." *PLoS One* **8**(8): e70472.

Zhou, J., F. F. Ping, W. T. Lv, J. Y. Feng and J. Shang (2014). "Interleukin-18 directly protects cortical neurons by activating PI3K/AKT/NF-kappaB/CREB pathways." Cytokine **69**(1): 29-38.

## 7. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Walter Maetzler durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) in Tübingen und dem *Canadian Institutes of Health Research* in Toronto, Kanada. Es handelt sich dabei um eine Zwei-Center-Studie, wobei Tübingen keinen Einfluss auf die Studienanteile von Toronto hat. Der Toronto-Anteil (nur Validierungsaspekte) werden daher in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Die Rekrutierung der Tübinger Probanden erfolgte ausschließlich durch mich, v.a. durch Studium von bestehenden Arztbriefen und darauffolgende Anrufe der potentiellen Studienteilnehmer. Ich habe dabei etwa 480 Akten studiert und davon 200 potentielle Probanden telefonisch kontaktiert; weitere 200 Probanden wurden von Susanne Nussbaum, Studienassistentin der Arbeitsgruppe Neurogeriatrie, kontaktiert. Die Untersuchungen an den Tübinger Probanden wurden von mir eigenständig durchgeführt. Eine Ausnahme stellten Studienprobanden dar, die gleichzeitig in die Studie einer anderen Doktorandin (Kathrin Maier) eingebunden waren; aufgrund von Überschneidungen der Studienprotokolle wurden 67 Probanden gemeinschaftlich mit Kathrin Maier untersucht. Ca. 75 Probanden der COEN-Studie konnten aufgrund terminlicher Kollidierungen, Krankheitsausfällen u.a. nicht von mir persönlich untersucht werden; die Untersuchung wurde in diesen Fällen von Studienassistentinnen der Arbeitsgruppe Neurogeriatrie (Tanja Heger und Susanne Nussbaum) durchgeführt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit habe ich auch eine Multiplex-ELISA-Messung von Biobank-Proben von 150 Probanden nach kurzer Anleitungszeit eigenständig durchgeführt. Diese Werte fließen aus logistischen Gründen nicht in diese Arbeit ein (die letztendlich verwendeten Messungen wurden in Kooperation mit dem Naturwissenschaftlichen und Medizinischen Institut (NMI)

Reutlingen und Mediagnost Reutlingen durchgeführt). Die genetischen Analysen wurden von Peter Lichtner vom Helmholtz Institut in München durchgeführt, die Erstellung des genetischen Risikoscores erfolgte durch Claudia Schule vom Hertie Institut für Klinische Hirnforschung (HIH) in Tübingen.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Dr. Nicole Schneiderhan und Nico Weber vom NMI Reutlingen sowie Anja Apel, Claudia Schulte und Prof. Walter Maetzler vom HIH Tübingen. Diesen Prozess habe ich aktiv begleitet, beispielsweise durch regelmässige Teilnahme an den Auswertesitzungen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch meinen Betreuer, Prof. Dr. Walter Maetzler, verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 29.03.2016

## 8. VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile der vorliegenden Arbeit finden in der folgenden Publikation Erwähnung:

*Maetzler W., Deleersnijder W., Hanssens V., Bernard A., Brockmann K., Marquetand J., Wurster I., Rattay T. W, Roncoroni L., Schaeffer E., Lerche S., Apel A., Deuschle C., Berg D.* (2016) GDF15/MIC1 and MMP9 Cerebrospinal Fluid Levels in Parkinson's Disease and Lewy Body Dementia. PLoS ONE 11(3): e0149349. doi:10.1371/journal.pone.0149349

## ANHANG

### Lizenz zur Verwendung der Abbildung 2B aus „Multilocus genetic risk score associates with ischemic stroke in case-control and prospective cohort studies“, Malik et al. 2014 (in der vorliegenden Arbeit: Abb. 7)

#### WOLTERS KLUWER HEALTH, INC. LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jul 12, 2015

---

This Agreement between Alice Bernard ("You") and Wolters Kluwer Health, Inc. ("Wolters Kluwer Health, Inc.") consists of your license details and the terms and conditions provided by Wolters Kluwer Health, Inc. and Copyright Clearance Center.

License Number	3666531268417
License date	Jul 12, 2015
Licensed Content Publisher	Wolters Kluwer Health, Inc.
Licensed Content Publication	Stroke
Licensed Content Title	Multilocus Genetic Risk Score Associates With Ischemic Stroke in Case-Control and Prospective Cohort Studies
Licensed Content Author	Rainer Malik, Steve Bevan, Michael A. Nalls, Elizabeth G. Holliday, William J. Devan, Yu-Ching Cheng, Carla A. Ibrahim-Verbaas, Benjamin F.J. Verhaaren, Joshua C. Bis, Aron Y. Joon, Anita L. de Stefano, Myriam Fornage, Bruce M. Psaty, M. Arfan Ikram, Lenore J. Launer, Cornelia M. van Duijn, Pankaj Sharma, Braxton D. Mitchell, Jonathan Rosand, James F. Meschia, Christopher Levi, Peter M. Rothwell, Cathie Sudlow, Hugh S. Markus, Sudha Seshadri, Martin Dichgans, Wellcome Trust Case Control Consortium 2
Licensed Content Date	Dec 31, 1969
Licensed Content Volume Number	45
Licensed Content Issue Number	2
Type of Use	Dissertation/Thesis
Requestor type	Individual
Portion	Figures/table/illustration
Number of figures/tables /illustrations	1
Figures/tables/illustrations used	Figure 2B
Author of this Wolters Kluwer article	No
Title of your thesis / dissertation	Is there an inflammatory endophenotype for Parkinson's disease? - The link between genotype, inflammatory blood biomarkers, and clinical phenotype of Parkinson's disease
Expected completion date	Sep 2015
Estimated size(pages)	60
Requestor Location	Alice Bernard Philosophenweg 79

## **DANKSAGUNG**

Zahlreiche Menschen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, die ich auf keinen Fall unerwähnt lassen möchte. Allen voran danke ich meinem Betreuer und Doktorvater, Prof. Dr. med. Walter Maetzler, für die freundliche Überlassung des Themas und seine kompetente, engagierte und warmherzige Unterstützung. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm aktiv unterstützt, und er hatte für mich immer ein offenes Ohr.

Des Weiteren wäre das Gelingen der COEN-Studie nicht möglich gewesen ohne die Arbeitsgruppe von Prof. Maetzler. Mein besonderer Dank gilt Susanne Nussbaum, die sich engagiert und zuverlässig um jeden Bereich der Studie kümmerte und mir darüber hinaus bei allen Fragen und organisatorischen Problemen zur Seite stand. Ebenso herzlich danke ich Tanja Heger und Corina Maetzler, die keine Mühen scheuten und die mir stets vorbehaltlos weiterhalfen. Claudia Schulte vom Hertie-Institut für Klinische Hirnforschung danke ich nicht nur für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen der Studie, sondern auch dafür, dass sie zu jeder Zeit bereit war, mir offene Fragen zu beantworten und Sachverhalte näher zu erläutern.

Ebenso bin ich den Mitarbeitern der Parkinson-Ambulanz der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen – insbesondere Ina Posner – zu Dank verpflichtet, die die Rekrutierung der Studienprobanden und das Sammeln von Biomaterial aktiv unterstützt haben.

Für die Einführung in den Umgang mit den Bioplex-Immunassays und die tatkräftigen Unterstützung bei der Analyse von Serumproben gilt mein Dank Dr. Constantin Adams.

Die Studie hätte nicht stattfinden können ohne die Bereitschaft und das Engagement der 218 Probanden, denen von ganzen Herzen gedankt sei. Ihrem Einsatz für das Voranbringen der Forschung gilt meine größte Hochachtung.