

Aus der Abteilung Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Tränenflüssigkeit als mögliche Quelle für  
Biomarker bei Patienten mit einem  
idiopathischem Parkinson-Syndrom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Matthias Wilhelm Börger**

aus Recklinghausen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in: Prof. Dr. med. P. Lingor

Ko-Referent/in: .....

Drittreferent/in: .....

Datum der mündlichen Prüfung: .....

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Tränenflüssigkeit als mögliche Quelle für Biomarker bei Patienten mit einem idiopathischem Parkinson-Syndrom“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

Die Daten, auf denen die vorliegende Promotionsarbeit basiert, wurden auszugsweise in folgenden Fachzeitschriften und auf folgenden wissenschaftlichen Kongressen veröffentlicht:

**Boerger M\***, Funke S\*, Leha A, Roser AE, Wuestemann AK, Maass F, Bähr M, Grus F, Lingor P (2019): Proteomic analysis of tear fluid reveals disease-specific patterns in patients with Parkinson's disease - A pilot study. *Parkinsonism Relat Disord* 63, 3-9

(\* geteilte Erstautorenschaft)

### **Weitere Veröffentlichungen im Rahmen dieser Doktorarbeit:**

#### 1. Internationale und nationale (Fach-)Zeitschriften:

**Börger M** (2019): Das Trockene Auge beim idiopathischen Parkinson-Syndrom. *Der Augenspiegel* 65, 24-26

**Börger M** (2019): Tränenflüssigkeit als neue Quelle für Biomarker. *Connexi* 3, 57-60

**Börger M**, Lingor P (2017): Tränenflüssigkeit als Quelle für Biomarker beim M. Parkinson. *Der Augenspiegel* 63, 38-40

**Börger M**, Lingor P (2016): Eine Quelle für Biomarker beim M. Parkinson? Göttinger Studie untersucht Tränenflüssigkeit auf Entitäten-spezifische Veränderungen im Proteom. *Ophthalmologische Nachrichten* 12, 10

**Börger M**, Funke S, Bähr M, Grus F, Lingor P (2015): Biomarker sources for Parkinson's disease: Time to shed tears? *Basal Ganglia* 5, 63-69

## 2. Posterpräsentationen:

**Boerger M**, Funke S, Maass F, Leha A, Roser AE, Wuestemann AK, Dambeck V, Bähr M, Grus F, Lingor P: Validation von Proteinen in der Tränenflüssigkeit von Parkinson-Patienten als diagnostische Biomarker. *Abstract*-Nummer 978, Posterpräsentation auf der Neurowoche 2018 der Deutschen Gesellschaft für Neurologie am 01.11.2018 in Berlin, Deutschland

**Boerger M**, Funke S, Maass F, Leha A, Roser AE, Wuestemann AK, Bähr M, Grus F, Lingor P: Proteomic analysis of tear fluid reveals disease-specific patterns in patients with Parkinson's disease. Poster-Nummer 1580, Posterpräsentation auf dem 21<sup>st</sup> International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders der International Parkinson and Movement Disorder Society am 08.10.2018 in Hong Kong, China

**Börger M**, Funke S, Maass F, Fischbach A, Bähr M, Grus F, Lingor P: Tear fluid as potential biomarker source for the diagnosis of Parkinson's disease. *Abstract*-Nummer 1862, Posterpräsentation auf dem 20<sup>th</sup> International Congress of Parkinson's disease and Movement Disorders der International Parkinson and Movement Disorder Society am 23.06.2016 in Berlin, Deutschland

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Epidemiologie.....	1
1.2 Ätiologie und Klassifikation.....	1
1.3 Histopathologie und Pathogenese.....	3
1.4 Herausforderungen bei der Diagnose eines IPS.....	6
1.5 Aktueller Stand von Biomarkern in Blut und Liquor bei IPS-Patienten.....	7
1.6 Der Tränenapparat.....	10
1.7 Die Tränenflüssigkeit.....	11
1.8 Die Innervation der Tränendrüse.....	14
1.9 Erkrankungen der Tränendrüsen.....	15
1.10 Ophthalmologische Störungen im IPS.....	16
1.10.1 Prävalenz von ophthalmologischen Störungen im IPS.....	16
1.10.2 Pathophysiologie von ophthalmologischen Störungen in IPS.....	17
1.10.3 Auftreten einer Keratokonjunktivitis sicca bei Patienten mit IPS.....	18
1.11 Biochemische Verfahren in der Proteomik.....	21
1.12 Hintergrund dieser Studie.....	26
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
2.1 Studienkohorte.....	31
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	34
2.3 Sammlung der Tränenflüssigkeitsproben.....	35
2.4 Anamnese, klinisch-neurologische Untersuchung und Fragebögen.....	37
2.5 Ablauf der <i>Bottom-up</i> -LC-ESI-MS/MS-Proteomanalyse.....	38
2.6 Bioinformatische und statistische Analysen.....	42

<b>3. Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1 Bewertung der Tränenvolumina und Tränenproteinkonzentrationen.....	43
3.2 <i>Bottom-up</i> -LC-MS/MS-Analyse.....	48
3.3 Funktionelle Annotationsanalysen in <i>gene ontology</i> und Protein-Protein- Interaktionsanalysen in STRING.....	49
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>56</b>
<b>5. Zusammenfassung und Ausblick</b> .....	<b>61</b>
<b>6. Anhang</b> .....	<b>62</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>67</b>

## Tabellenverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1:</b>	Referenzbereiche für Elektrolyte und Albumin in Plasma, Tränenflüssigkeit und Liquor <span style="float: right;"><b>12</b></span>
<b>Tabelle 2:</b>	Darstellung der demographischen Daten, der ophthalmologischen Komorbiditäten und der Medikamentenanamnese <span style="float: right;"><b>33</b></span>
<b>Ergänzende Tabellen A1 und A2:</b>	Liste von Tränenproteinen, die ausschließlich in der IPS-Kohorte nachgewiesen oder spezifisch in dieser Gruppe nicht nachgewiesen wurden <span style="float: right;"><b>62</b></span>
<b>Ergänzende Tabellen A3 und A4:</b>	Liste von Proteinen, welche zwischen der IPS- und KTR-Studienkohorte entweder hoch- oder herunterreguliert nachgewiesen werden konnten <span style="float: right;"><b>64</b></span>



---

**Abbildungsverzeichnis**

	<b>Seite</b>
<b>Abbildung 1:</b> Aufbau des Tränenfilms	<b>11</b>
<b>Abbildung 2:</b> Innervation der Tränen- und Speicheldrüsen	<b>15</b>
<b>Abbildung 3:</b> Arbeitsablauf der Proteomanalyse mittels <i>Bottom-up</i> -LC-ESI-MS/MS	<b>26</b>
<b>Abbildung 4:</b> Aufbau der „LiX-Studie“	<b>31</b>
<b>Abbildung 5:</b> Schema der Entnahme von Tränenflüssigkeit in dieser Dissertation	<b>37</b>
<b>Abbildung 6:</b> Statistische Analysen von Tränenvolumina und Tränenproteinkonzentrationen	<b>44</b>
<b>Abbildung 7:</b> Korrelationsanalysen von Alter, mHY <i>scale</i> , UPDRS Teil III (motorischer Teil), Krankheitsdauer, PD-NMS <i>questionnaire</i> sowie BST- und TPC-Werten in der IPS-Studienkohorte	<b>46</b>
<b>Abbildung 8:</b> Korrelationsanalysen von Alter sowie BST- und TPC-Werten in KTR-Kohorte	<b>47</b>
<b>Abbildung 9:</b> Beispielhaftes Massenmigrationsmuster von gepoolten Tränenproben der IPS- und KTR-Patienten mittels modifizierter 1-D-SDS-PAGE	<b>48</b>
<b>Abbildung 10:</b> Darstellung der funktionellen Zuordnung der differentiell exprimierten Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten zu verschiedenen GO-Begriffen	<b>51</b>

<b>Abbildung 11:</b>	Annotation der differentiell regulierten Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten zu biologischen Prozessen	<b>53</b>
<b>Abbildung 12:</b>	Darstellung der Netzwerkanalyse der dysregulierten Tränenproteine mittels STRING©	<b>55</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1-D-SDS-PAGE</b>	<i>One-dimensional sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Eindimensionale Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
<b>1-DE</b>	<i>One-dimensional gel electrophoresis</i> (Eindimensionale Gelelektrophorese)
<b>2-DE</b>	<i>Two-dimensional gel electrophoresis</i> (Zweidimensionale Gelelektrophorese)
<b>2D-DIGE</b>	<i>Two-dimensional difference gel electrophoresis</i> (Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese)
<b>ACN</b>	<i>Acetonitrile</i> (Acetonitril)
<b>AD</b>	<i>Alzheimer's disease</i> (Alzheimer-Demenz)
<b><math>\alpha</math>-Syn</b>	<i>Alpha (<math>\alpha</math>)-synuclein</i> ( $\alpha$ -Synuklein)
<b>ANOVA</b>	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
<b>AUC</b>	<i>Area under the curve</i> ("Fläche unter der Kurve")
<b>BCA</b>	<i>Bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
<b>BST</b>	<i>Basic secretion test</i> (Basis-Sekretionstest)
<b>BULCMS</b>	<i>Bottom-up-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i> (Umgekehrte Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie)
<b>DES</b>	<i>Dry Eye syndrome</i> („Syndrom des trockenen Auges“ bzw. Keratokonjunktivitis sicca)
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzymgebundenes und antikörperbasiertes Nachweisverfahren)

<b>ESI</b>	<i>Electrospray ionization</i> (Elektrospray-Ionisation)
<b>FDR</b>	<i>False discovery rate</i> ("Falscherkennungsrate")
<b>Ggl.</b>	Ganglion
<b>Gl.</b>	Glandula
<b>GO</b>	<i>Gene ontology</i> (Genontologie)
<b>IPS</b>	Idiopathisches Parkinson-Syndrom
<b>KTR</b>	Kontrollen
<b>LC</b>	<i>Liquid chromatography</i> (Flüssigchromatographie)
<b>LC-ESI-MS</b>	<i>Liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandem-Massenspektrometrie)
<b>LDS</b>	<i>Lithium dodecyl sulfate</i> (Lithiumdodecylsulfat)
<b>LFQ</b>	<i>Label-free quantification</i> (Markierungsfreie Quantifizierung)
<b>LTQ Orbitrap</b>	<i>Linear trap quadrupole Orbitrap (mass spectrometry)</i>
<b>mHY</b>	<i>Modified Hoehn and Yahr (scale)</i>
<b>MoCA</b>	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
<b>MS</b>	<i>Mass spectrometry</i> (Massenspektrometrie)
<b>MSA</b>	Multisystematrophie
<b>N.</b>	Nervus
<b>Ncl.</b>	Nucleus
<b>NF-L</b>	<i>Neurofilament light chain</i>
<b>PD</b>	<i>Parkinson's disease</i> (Morbus Parkinson bzw. Parkinson-Krankheit)
<b>PD-NMS</b>	<i>Parkinson's disease-Non-motor symptoms (questionnaire)</i>

<b>PDQ-8</b>	<i>Parkinson's disease questionnaire-8</i>
<b>PDSS</b>	<i>Parkinson's disease sleep scale</i>
<b>PPI network</b>	<i>Protein-protein interaction network</i> (Protein-Protein-Interaktions-Netzwerk)
<b>PSP</b>	<i>Progressive supranuclear palsy</i> (Progressive supranukleäre Blickparese)
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
<b>RP column system</b>	<i>Reversed phase column system</i> (Umkehrphasen-Säulensystem)
<b>SDS-PAGE</b>	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
<b>TFA</b>	<i>Trifluoroacetic acid</i> (Trifluoressigsäure)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ )
<b>TPC</b>	<i>Total protein concentration</i> (Gesamtproteinkonzentration)
<b>UPDRS</b>	<i>Unified Parkinson's disease rating scale</i>
<b>UKPDBB</b>	<i>United Kingdom Parkinson's disease Society Brain Bank (criteria)</i>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Epidemiologie**

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) ist nach der Alzheimer-Demenz (AD) weltweit die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung und die häufigste neurodegenerative Bewegungsstörung. Als neurodegenerative Erkrankung weist das IPS eine Zunahme der Prävalenz bzw. der Krankheitsfälle pro 100.000 Einwohner mit dem Lebensalter auf: von 41 Betroffenen im Alter von 40 bis 49 Jahren bis hin zu 1.903 Patienten über 80 Lebensjahren (Pringsheim et al. 2014). Die Inzidenz bzw. Neuerkrankungsrate steigt fortwährend bis zum 80. Lebensjahr (Hirsch et al. 2016). In Deutschland sind nach aktuellen Schätzungen ca. 180.000 (Enders et al. 2017) bis 300.000 (Nerius et al. 2017) Menschen von einem IPS betroffen. Aufgrund der ungenauen diagnostischen Trennschärfe kann jedoch eine hohe Dunkelziffer vermutet werden. Es zeigt sich eine leicht erhöhte Inzidenz (Hirsch et al. 2016) und Prävalenz (Pringsheim et al. 2014) bei Männern in nahezu allen Altersgruppen. In einer Studie mit einem Beobachtungszeitraum von über 38 Jahren zeigte sich bei Patienten mit einem IPS eine doppelt so hohe Mortalität im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung. Die höchste Sterblichkeit zeigten hierbei Patienten unter 60 Lebensjahren mit männlichem Geschlecht, Nachweis einer Gangstörung, fehlendem Ruhetremor, symmetrischer Symptomausprägung und längerer Krankheitsdauer. Als häufigste Todesursache wurden Pneumonien angegeben (Pinter et al. 2015). Das IPS besitzt somit weltweit eine hohe gesellschaftspolitische Relevanz.

### **1.2 Ätiologie und Klassifikation**

Parkinson-Syndrome werden zu den Bewegungsstörungen gezählt, einer Gruppe von neurologischen Erkrankungen, welche man auch weniger umfassend als Basalganglienerkrankungen oder extrapyramidalmotorische Störungen bezeichnet. Man unterscheidet zwischen dem Parkinson-Syndrom als syndromatischem Oberbegriff und vier verschiedenen Ätiologien: Zum einen das IPS, welches auch als Morbus Parkinson bezeichnet wird und mit ca. 75 % aller Fälle die häufigste Unterform darstellt. Die Bezeichnung IPS erklärt sich durch

die (noch) unbekannt(e)n Ursache(n) (sogenannte idiopathische Genese). Hinsichtlich des dominierenden klinischen Erscheinungsbildes erfolgt eine weitere Einteilung in folgende Unterformen: Akinetisch-rigider Typ, Äquivalenz-Typ, Tremordominanz-Typ und monosymptomatischer Ruhetremor (seltene Variante). Darüber hinaus werden die symptomatischen bzw. sekundären Parkinson-Syndrome unterschieden, welche durch spezifische Ursachen, wie z. B. Medikamente (u. a. Valproinsäure oder atypische Neuroleptika), vaskuläre Schädigungen des Hirngewebes (z. B. subkortikale arteriosklerotische Enzephalopathie), Schädel-Hirn-Traumata, Toxine (u. a. Schwermetalle, wie z. B. Mangan), Tumore, Entzündungen (u. a. Humanes Immundefizienz-Virus) oder Störungen des Stoffwechsels (u. a. Kupferstoffwechselerkrankungen, wie z. B. Morbus Wilson) hervorgerufen werden. Parkinson-Syndrome, welche im Rahmen anderer neurodegenerativer Erkrankungen vorkommen und zusätzliche, nicht „typische“ Symptome aufweisen, werden somit auch als „atypische“ Parkinson-Syndrome oder „Parkinson-Plus-Syndrome“ bezeichnet: Man unterscheidet hier die Multisystematrophie (MSA), die Demenz vom Lewy-Körper-Typ, die progressive supranukleäre Blickparese (PSP) und die kortikobasale Degeneration. Darüber hinaus werden Parkinson-Syndrome, welche durch monogenetische Mutationen, z. B. in den Genen für  $\alpha$ -Synuklein ( $\alpha$ -Syn) und Protein-Deglycase DJ-1 (DJ-1) ausgelöst werden, als familiäre bzw. hereditäre Parkinson-Syndrome bezeichnet. Parkinson-Syndrome, welche vor dem 40. Lebensjahr auftreten werden als „früh beginnend“ und solche, die vor dem 21. Lebensjahr beginnen als „juvenil“ bezeichnet.

Parkinson-Syndrome sind im Allgemeinen definiert durch das Vorliegen einer Brady- bzw. Hypokinese (Verlangsamung der Bewegungen bzw. Bewegungsarmut) und eines der folgenden drei Kardinalsymptome: Rigor (erhöhter Muskeltonus), Tremor (Muskelzittern) im Bereich der Extremitäten und/oder posturale Instabilität (Haltungsinstabilität). Neben diesen motorischen Symptomen können zudem weitere fakultative, sogenannte nicht motorische Begleitsymptome vorliegen: Man unterteilt hierbei in sensorische (z. B. Hyposmie (vermindertes Riechvermögen), Empfindungsstörungen oder Schmerzen), vegetative (z. B. Störungen von Blutdruck, Temperaturregulation, Blasen- und Darmfunktion oder sexuellen Funktionen), psychische (z. B. Depression oder

Schlafstörungen) sowie kognitive Symptome (z. B. Störungen der Exekutivfunktionen und in fortgeschrittenen Stadien Demenz) (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S3-Leitlinie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016).

### 1.3 Histopathologie und Pathogenese

Die charakteristischen Veränderungen beim IPS sind die intrazelluläre Akkumulation von  $\alpha$ -Syn in Kombination mit einem Verlust von melaninhaltigen Nervenzellen in der Substantia nigra. Obwohl die Suche nach einer Ursache für das IPS im Fokus zahlreicher Studien steht, konnte bislang kein endgültiges ätiologisches Modell entwickelt werden. Somit ist das auslösende Agens bzw. das neurotrope Pathogen der Parkinson-Krankheit bis heute (noch) unbekannt. Ursächlich wird eine multifaktorielle Genese mit gestörten lysosomalen und proteasomalen Abbauprozessen, mitochondrialer Dysfunktion, prionenartiger Mechanismen, oxidativem Stress und Neuroinflammation vermutet (Poewe et al. 2017). Aktuelle Studien legen zudem nahe, dass es sich beim IPS nicht um ein homogenes Krankheitsbild handelt, sondern um eine uneinheitliche Gruppe von Erkrankungen mit variablem klinischen Erscheinungsbild.

Histopathologisch finden sich in den Nervenzellen von IPS-Erkrankten intrazytoplasmatische Proteinaggregate, die sogenannten „Lewy-Körper“, deren Hauptbestandteil oligomeres bzw. fibrilläres, d. h. „fehlgefaltetes“,  $\alpha$ -Syn ist (Dickson 2012). Das IPS wird aus diesem Grund den Proteinopathien bzw. genauer den Synukleinopathien zugeordnet. In Patienten mit einer MSA, welche ebenfalls zu den Synukleinopathien gezählt wird, wurde  $\alpha$ -Syn hingegen im Zytoplasma von Oligodendrozyten nachgewiesen (Dickson 2012). Im Gehirn von Gesunden ist ungefaltetes (endogenes)  $\alpha$ -Syn ein häufig und physiologisch vorkommendes Protein, das erhöhte Konzentrationen v. a. in der Präsynapse von Nervenzellen aufweist. Außerhalb des Gehirns kann  $\alpha$ -Syn auch im Liquor und Blut nachgewiesen werden (El-Agnaf et al. 2003). Es finden sich physiologisch erhöhte Konzentrationen von  $\alpha$ -Syn im höheren Lebensalter (Chu und Kordower 2007). Es wird vermutet, dass  $\alpha$ -Syn eine bedeutende Rolle im Vesikeltransport und der Freisetzung von Neurotransmittern einnimmt. Die genaue Funktion von  $\alpha$ -Syn ist jedoch bis heute unbekannt (Spillantini et al. 1997). Laut histopathologischen Studien finden sich in den



frühen Krankheitsstadien von IPS-Patienten  $\alpha$ -Syn-Aggregate nahezu ausschließlich im Bulbus olfactorius, enterischen Nervensystem und im Bereich des unteren Hirnstamms, v. a. im Bereich der Kerngebiete der Hirnnerven IX und X (Braak et al. 2003). Hierzu passend weisen Patienten in diesen Stadien v. a. nicht motorische Symptome, wie z. B. Riech-, Schlaf-, Verdauungs- und Erektionsstörungen auf. Daher nennt man diesen Zeitraum auch „prämotorisches Krankheitsstadium“ und die vorliegenden Beschwerden „Frühsymptome“. Im weiteren Krankheitsverlauf können Lewy-Körper auch im Mittelhirn, v. a. in der Pars compacta der Substantia nigra, nachgewiesen werden (Braak et al. 2003). In diesen Stadien weisen Erkrankte erstmals motorische Symptome, wie z. B. eine Brady- bzw. Hypokinese und einen Rigor, auf. In den späten Krankheitsstadien finden sich Lewy-Körper dann auch im Neokortex. Dieses Stadium ist durch das gehäufte Auftreten von kognitiven Defiziten und psychiatrischen Auffälligkeiten gekennzeichnet (Braak et al. 2003). Im Hinblick auf die Ausbreitung von  $\alpha$ -Syn im Gehirn von Erkrankten wird heutzutage ein „prionenähnlicher Mechanismus“ diskutiert: Diese Hypothese besagt, dass aggregiertes  $\alpha$ -Syn durch Exozytose und über die Axone in den Extrazellulärraum einer verbundenen Nervenzelle transportiert wird. Dort erfolgt die Aufnahme des fehlgefalteten  $\alpha$ -Syn durch Endozytose aus den Exosomen. In Anwesenheit der pathologischen  $\alpha$ -Syn-Oligomere kann das endogene  $\alpha$ -Syn zur Fehlfaltung angeregt werden (sogenanntes „*seeding*“) (Angot et al. 2010) (Brundin et al. 2010).

Auf neuroanatomischer und neurobiologischer Ebene entsteht das typische Erscheinungsbild von IPS-Patienten primär durch degenerative Veränderungen der Basalganglien (Trepel 2017): Die Basalganglien sind im Gesunden in der Planung und Durchführung von Bewegungen von entscheidender Bedeutung. Bei IPS-Erkrankten kommt es aufgrund eines progredienten Untergangs von Nervenzellen in der Pars compacta der Substantia nigra, welche den Neurotransmitter Dopamin synthetisieren, zu einem Dopamin-Mangel im Striatum. Die normalerweise vorhandene Stimulation des Striatums durch die Substantia nigra über  $D_1$ -Rezeptoren ist hierdurch vermindert. Hieraus resultiert wiederum eine vermehrte Aktivität im Globus pallidus, da dieser durch das Striatum im Gesunden gehemmt wird. Die erhöhte Aktivität des Globus pallidus

führt dann zu einer Inhibition des motorischen Teils des Thalamus, der wiederum den Motorkortex nicht mehr ausreichend stimulieren kann. Hieraus resultieren dann die typischen Symptome, wie Bewegungsarmut und -verlangsamung sowie erhöhter Muskeltonus. Erst nach dem Absterben von 60 - 70 % der dopaminergen Neurone im ventrolateralen Teil der Pars compacta der Substantia nigra kommt es zum Auftreten von motorischen Symptomen (Riederer und Wuketich 1976), sodass es sich bei diesem „motorischen Krankheitsstadium“ bereits um einen fortgeschrittenen Krankheitsverlauf handelt. Der Dopamin-Mangel in den Basalganglien verursacht zudem einen relativen Acetylcholinüberschuss und verändert auch die Konzentrationen anderer Botenstoffe, wie z. B. Serotonin und Noradrenalin. Das Ungleichgewicht im zerebralen Transmitterhaushalt verursacht vielseitige neurologische Störungen, welche v. a. die Motorik, aber auch psychische, sensorische und vegetative Funktionen betreffen. Das IPS ist somit als eine Multisystemerkrankung zu bezeichnen.

Für das Verständnis des Auftretens von nicht motorischen Symptomen beim IPS ist von entscheidender Bedeutung, dass die Lewy-Pathologie nicht nur wie allgemein bekannt in der Substantia nigra, sondern auch in weiteren Teilen des zentralen und des peripheren Nervensystems nachgewiesen werden konnte: So fanden sich Akkumulationen von  $\alpha$ -Syn auch im enterischen Nervensystem sowie in Herzmuskel und Haut, wodurch eine Vielzahl von vegetativen Symptomen, wie z. B. Obstipation, Orthostase und Hyperhidrosis, begründet sein können (Schapira et al. 2017). Nicht motorische bzw. autonome Symptome finden sich bereits in sehr frühen Krankheitsstadien und können den motorischen Symptomen sogar vorausgehen. In späten Krankheitsstadien weisen IPS-Erkrankte eine höhere Anzahl und eine stärkere Ausprägung von autonomen Störungen auf (Chaudhuri et al. 2006). Nicht motorische Symptome wirken sich signifikant negativ auf die Lebensqualität der Patienten aus (Chaudhuri et al. 2006). Laut einer Studie werden zudem in ca. 50 % der IPS-Patienten nicht motorische Symptome, insbesondere Depression und Angst, im Rahmen einer routinemäßigen Vorstellung bei einem Facharzt für Neurologie nicht erkannt, da diese in einer körperlichen Untersuchung nicht erfasst werden

können und geeignete Screening-Instrumente, wie z. B. Fragebögen, nicht immer vorhanden sind bzw. eingesetzt werden (Shulman et al. 2002).

#### **1.4 Herausforderungen bei der Diagnose eines IPS**

Trotz einer beträchtlichen individuellen, gesellschaftspolitischen und volkswirtschaftlichen Bedeutung ist die Diagnose und differentialdiagnostische Abgrenzung des IPS zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen auch in der heutigen Medizin weiterhin eine Herausforderung. Eine frühe und korrekte Diagnose ist jedoch v. a. für die weitere Therapie und Prognoseabschätzung von entscheidender Bedeutung. Aber auch im Hinblick auf Wissenschaft und Forschung, z. B. im Bereich Epidemiologie, Genetik, Bildgebung, Biomarker sowie symptomatischer und krankheitsmodifizierender Therapieoptionen, ist eine korrekte Diagnose zur sicheren Charakterisierung bzw. Gruppenzuordnung von Patienten wichtig.

Insbesondere in frühen Krankheitsstadien, wenn die Symptome nur milde ausgeprägt sind, können Schwierigkeiten in der Diagnose auftreten, da eine sichere Differenzierung aufgrund eines unzureichenden „typischen Erscheinungsbildes“ und aufgrund von Überschneidungen zu anderen neurodegenerativen Erkrankungen deutlich erschwert wird. Die Diagnose eines IPS sollte somit erst nach einer Verlaufsuntersuchung im Intervall von einem Jahr zur Erstuntersuchung gestellt werden, um auch neu aufgetretene Symptome einordnen zu können, welche für oder gegen ein IPS sprechen (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, S3-Leitlinie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016). Darüber hinaus spielen neben dem klinischen Erscheinungsbild und der Krankheitsdauer auch die Erfahrung des Untersuchers und der aktuelle Stand der Forschung bzw. die Verfügbarkeit von diagnostischen Hilfsmitteln, wie z. B. Biomarker, eine bedeutende Rolle.

Aktuell basiert die Diagnose eines IPS im Wesentlichen auf der Erfassung aller Symptome im Rahmen einer ausführlichen Anamnese und klinisch-neurologischen Untersuchung sowie anschließenden syndromatischen Einordnung. In unklaren Fällen erfolgt die Durchführung von Zusatzdiagnostik (Postuma et al. 2015). Trotz Diagnose in spezialisierten Zentren sowie anhand international etablierter und neuropathologisch validierter Diagnosekriterien zeigte sich in einer aktuellen Studie mit post-mortem durchgeführten

histopathologischen Untersuchungen, dass in nur 26 % aller klinisch diagnostizierten IPS-Patienten, welche unbehandelt oder „nicht sicher“ auf dopaminerge Medikation angesprochen haben, in 53 % aller Patienten mit frühem Beginn, welche jedoch auf die Medikamenteneinnahme angesprochen haben (Krankheitsdauer < 5 Jahre), und nur in ca. 85 % aller Patienten mit längerem Krankheitsverlauf und gutem Ansprechen auf die Medikation, die klinische Diagnose eines IPS zu Lebzeiten korrekt gestellt wurde (Adler et al. 2014). Auch eine Vielzahl älterer Studien zeigt dieses Problem auf (Litvan et al. 2003) (Hughes et al. 2002) (Hughes et al. 1992) (Rajput et al. 1991). Eine Biopsie des Hirngewebes zur sicheren histopathologischen Einordnung ist aufgrund der Invasivität und etwaiger Nebenwirkungen in der Routinediagnostik nicht zu empfehlen.

### **1.5 Aktueller Stand von Biomarkern in Blut und Liquor bei IPS-Patienten**

Biomarker sind messbare Indikatoren für das Vorhandensein oder die Schwere eines Krankheitszustands. Ein Biomarker kann z. B. eine Veränderung in der Expression oder im Zustand eines Proteins anzeigen, welches mit dem Risiko oder dem Fortschreiten einer Krankheit, oder auch mit dem Ansprechen der Krankheit auf eine Behandlung korreliert ist. Biomarker können hierbei spezifische Moleküle oder Gene, Genprodukte, Enzyme oder Hormone sein, die in Teilen des Körpers, wie z. B. Blut oder Gewebe, durch biochemische Methoden nachgewiesen und gemessen werden können (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Unter dem erweiterten Begriff eines Biomarkers können jedoch z. B. auch bildgebende Verfahren miteinbezogen werden.

In neurologischen Erkrankungen ist die Zerebrospinalflüssigkeit die Hauptquelle für Biomarker, da sie pathologische Stoffwechselprozesse des zentralen Nervensystem widerspiegeln kann. Die Entnahme von Liquor ist jedoch ein invasiver Eingriff. Andere, „periphere“ Körperflüssigkeiten, welche mit risikoärmeren Verfahren zugänglich sind, wie z. B. Speichel, Blut oder Urin, können jedoch Kontaminationen, wie z. B. Blutbestandteile, aufweisen, welche Störfaktoren in der weiteren Analyse darstellen können (Chahine und Stern 2017). Darüber hinaus besitzen diese Körperflüssigkeiten

keine direkte Verbindung zum Hirngewebe und den dort ablaufenden pathophysiologischen Prozessen.

Der wohl bekannteste und am häufigsten analysierte Biomarker im IPS ist  $\alpha$ -Syn, da diesem Protein eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie zugeordnet wird. In den bisherigen Untersuchungen von Liquor und Plasma ergaben sich jedoch widersprüchliche Ergebnisse, insbesondere, da  $\alpha$ -Syn auch ein physiologischer Bestandteil von roten Blutkörperchen ist (Malek et al. 2014). In einer Meta-Analyse von 9 Studien mit insgesamt 843 IPS- und 130 MSA-Patienten sowie 98 Patienten mit PSP, zeigten sich signifikant niedrigere Werte für  $\alpha$ -Syn im Liquor von IPS- und MSA-Patienten, welche z. B. durch eine Akkumulation von  $\alpha$ -Syn in den Lewy-Körpern (Eller und Williams 2009) bzw. durch eine erhöhte Aufnahme von  $\alpha$ -Syn in die Neurone (Mollenhauer et al. 2011) erklärt werden können. Es ergab sich eine standardisierte Mittelwertdifferenz von -0,67 im Vergleich von IPS zur Kontrollgruppe und -0,75 im Vergleich von MSA zur Kontrollgruppe. Die Werte von  $\alpha$ -Syn konnten jedoch nicht zwischen IPS und MSA differenzieren (Sako et al. 2014). Eine weitere Meta-Analyse ergab für  $\alpha$ -Syn alleine eine hohe Sensitivität (0,87) für das Vorliegen einer Synukleinopathie, jedoch gleichzeitig eine sehr niedrige Spezifität (0,42) bei vergleichbaren Werten in Patienten mit Lewy-Körper-Demenz und MSA. Die *Area under the curve* (AUC) ergab einen Wert von 0,73 in der Diskrimination von IPS zur Kontrollgruppe (Gao et al. 2015). Es ergaben sich weiterhin Schwierigkeiten in der Vergleichbarkeit der jeweiligen Studienergebnisse aufgrund einer klinischen Heterogenität der Patientenkohorten, einer Hämolyse mit Freisetzung von  $\alpha$ -Syn aus den Erythrozyten durch akzidentielle Blutbeimengung während der Lumbalpunktion, Komorbiditäten, Einnahme von bestimmten Medikamenten und verschiedenen Analysetechniken (Gao et al. 2015) (Mollenhauer et al. 2010). Darüber hinaus ist eine leichtgradige Abnahme der Werte von  $\alpha$ -Syn im Liquor auch als physiologische Alterungserscheinung bekannt. Die Bestimmung der Konzentration von  $\alpha$ -Syn erscheint vor diesem Hintergrund als alleiniger Biomarker somit nicht zielführend.

Die Bestimmung der Neurofilamente, wie *Neurofilament light chain* (NF-L) ist ein weiteres Beispiel für einen potentiellen Biomarker-Kandidaten in IPS, welcher in

Blut und Liquor nachgewiesen werden kann. NF-L sind Marker für eine axonale Schädigung. Es finden sich somit erhöhte Werte bei neuronalem Zelltod. In einer Meta-Analyse von vier Studien mit 166 IPS-, 116 MSA- und 73 PSP-Patienten ergaben sich höhere Werte von NF-L in MSA- und PSP-Patienten mit einer standardisierten Mittelwertdifferenz von 1,60 im Vergleich von IPS- zu MSA-Patienten und 2,04 im Vergleich von IPS- zu PSP-Patienten (Sako et al. 2015). NF-L sind jedoch nicht spezifisch für IPS und finden sich auch mit erhöhten Werten in vielen anderen neurologischen Erkrankungen (Scherling et al. 2014).

Aufgrund der großen Bedeutung von Neuroinflammation und einer fehlgeleiteten Immunantwort im pathologischen Stoffwechsel von IPS (Tufekci et al. 2012) (McGeer und McGeer 2004) wurden Analysen mit sogenannten „Entzündungsparametern“ durchgeführt: Eine Meta-Analyse von 14 Studien mit 597 IPS-Patienten ergab signifikant erhöhte Werte von Transformierender Wachstumsfaktor, Interleukin-1 $\beta$  und Interleukin-6 sowie einen Trend für erhöhte Werte von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) im Liquor von IPS-Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Chen et al. 2018). Es ergab sich jedoch eine eingeschränkte Aussagekraft aufgrund der geringen Patientenzahlen in den aufgeführten Analysen (weniger als 100 Patienten pro Studie). Inflammatorische Biomarker, wie z. B. Zytokine, sind zudem unspezifische Parameter und finden sich auch in vielen anderen, nicht neurodegenerativen Erkrankungen (Magliozzi et al. 2018).

Neben den o. g. Proteinen wurden z. B. auch chemische Elemente (Metalle), welche in der Pathophysiologie von IPS involviert sind, wie z. B. Eisen oder Selen, untersucht. Auch hier ergaben sich jedoch inkonklusive Ergebnisse (Jiménez-Jiménez et al. 2014).

In einer Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse in der Biomarkerforschung beim IPS konnten zwar entitätenspezifische Veränderungen, wie z. B. eine Synukleinopathie, mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden, es ergaben sich jedoch Limitationen in der Spezifität sowie aufgrund von „quellenspezifischen Problemen“, wie z. B. einer Kontamination mit Blut, und einer Invasivität der Methode. Auch konnten einige detektierte Biomarker bis heute im Rahmen von

Folgestudien (noch) nicht validiert werden. Aus diesem Grund gibt es zum aktuellen Zeitpunkt keinen verlässlichen Biomarker in Körperflüssigkeiten von IPS-Erkrankten, der im klinischen Alltag bei der Diagnose und Differentialdiagnose oder im Monitoring des Krankheitsverlaufes Anwendung findet.

### **1.6 Der Tränenapparat**

Zu den anatomischen Strukturen des Tränenapparates zählen zum einen die Tränendrüsen sowie zum anderen der Tränensack (Saccus lacrimalis) und der Tränen-Nasen-Gang (Ductus nasolacrimalis) als ableitende Tränenwege. Unter dem Begriff „Tränendrüsen“ werden die akzessorischen Tränendrüsen (Gll. lacrimales accessoriae), die paarige Tränendrüse (Glandula (Gl.) lacrimalis), die Meibom- bzw. Tarsaldrüsen (Gll. tarsales) und die Moll- bzw. Wimperndrüsen (Gll. ciliares conjunctivales) zusammengefasst.

Die akzessorischen Tränendrüsen sind in die Epithelzellen der Bindehaut eingelagerte Becherzellen. Sie produzieren einen glykoproteinhaltigen Schleim (Muzin), der den Mikrovilli des Hornhautepithels wie ein Gel anhaftet und damit den Tränenfilm stabilisiert und eine Spreitfähigkeit des serösen Tränenfilms ermöglicht (Lutz 2001). Die Muzinschicht ist jener Bestandteil des Tränenfilms, der auch bei starkem Lidschlag nicht entfernt, sondern allenfalls stark verdünnt wird (Lutz 2001).

Die Gl. lacrimalis, die eigentliche (Haupt-)Tränendrüse, liegt dem Auge innerhalb der Augenhöhle von oben außen auf. Die Tränendrüse ist ein Konglomerat aus rein serösen Drüsen mit tubuloazinösen Endstücken. Das produzierte Sekret besteht im Wesentlichen aus einer farblosen und sterilen isotonen Salzlösung und verschiedenen Proteinen (Deller und Welsch 2005).

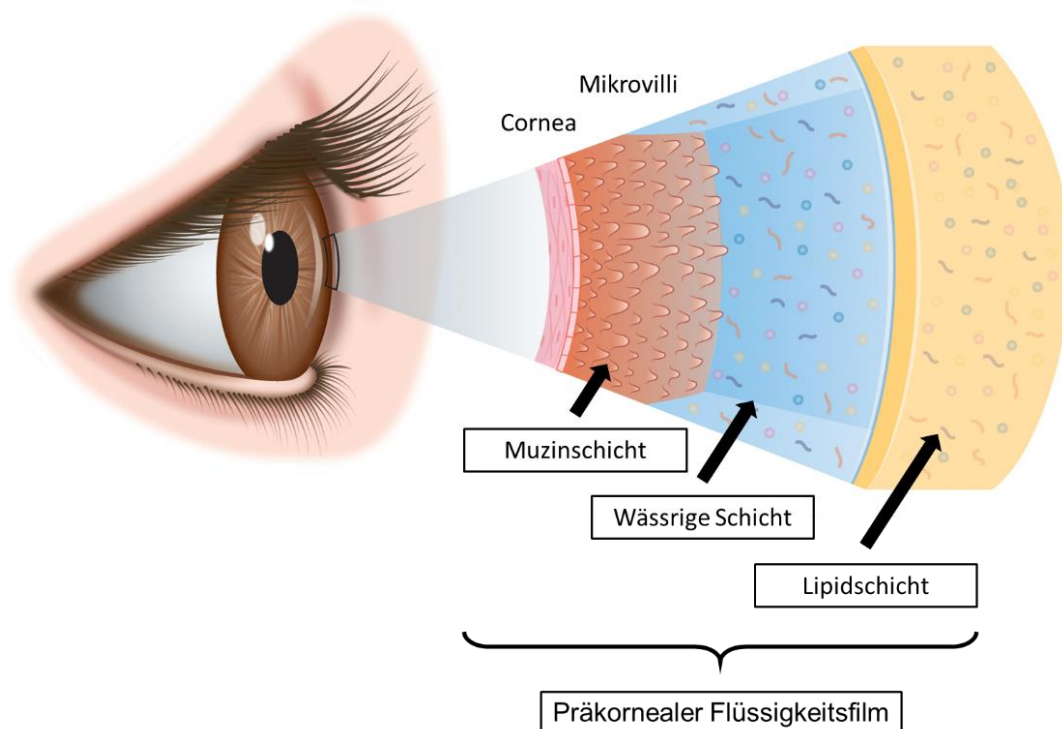
Die Meibom-Drüsen sind holokrine Drüsen am Knorpelrand der Augenlider. Als Talgdrüsen sezernieren sie eine lipid- und proteinhaltige, ölige Flüssigkeit, die sich als oberste Schicht dem Tränenfilm auflagert. Hierdurch wird ein Überlaufen der wässrigen Schicht am Lidrand und, aufgrund der hydrophoben Eigenschaften, auch eine vorzeitige Verdunstung verhindert sowie ein reibungsarmes Gleiten der Lider ermöglicht (Wagner und Lang 2014) (Klauß 2002) (Lutz 2001).

Die Moll-Drüsen sind modifizierte apokrine Schweißdrüsen, welche am Lidrand in die Haarbälge der Wimpern münden.

### 1.7 Die Tränenflüssigkeit

Als präkornealer bzw. präkonjunktivaler Flüssigkeitsfilm wird die Gesamtheit der Sekrete aller Tränendrüsen bezeichnet. Er besitzt einen dreischichtigen Aufbau: Die innerste Schicht (ca.  $0,8\ \mu\text{m}$ ) wird durch die Sekrete der Becherzellen gebildet, der mittlere, wässrige Anteil (ca.  $8\ \mu\text{m}$ ) entstammt der Gl. lacrimalis und der oberflächliche, lipidhaltige Anteil (ca.  $0,1\ \mu\text{m}$ ) wird durch die Meibom-Drüsen produziert (Wagner und Lang 2014) (Klauß 2002) (Abb. 1). Die Sekrete der Gl. lacrimalis stellen hierbei 95 % des präkornealen Flüssigkeitsfilms dar (Lutz 2001).

**Abb. 1:** Aufbau des Tränenfilms (eigene Abbildung, erstellt und modifiziert unter Mitarbeit des Elsevier Verlags).



Die Aufgaben des Tränenfilms sind eine Verbesserung der optischen Eigenschaften der Hornhaut durch Glättung der kornealen Oberfläche, Befeuchtung des Binde- und Hornhautepithels, Spülung und Desinfektion durch



Tränenfluss und bakterizide Eigenschaften der Tränen sowie eine Ernährung des Hornhautepithels (Klauß 2002).

Die wässrige Phase des präkornealen Tränenfilms, die eigentliche „Tränenflüssigkeit“, besteht aus Wasser (ca. 98 %), anorganischen Salzen (ca. 1 %), Lysozym (ca. 0,02 bis 0,06 %) sowie weiteren Proteinen und Eiweißen (ca. 0,02 bis 0,06 %), Glukose sowie Harnstoff und Mucopolysacchariden (Muzin) (Wagner und Lang 2014). Die Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit kann in Abhängigkeit von lokalen oder systemischen Erkrankungen (von Thun und Hohenstein-Blaul et al. 2013), Geschlecht (Ananthi et al. 2011), Alter (McGill et al. 1984), Tageszeit (Ng et al. 2001) sowie psychogenen oder sensorischen Reizen (Lutz 2001) variieren. Es finden sich zudem Unterschiede in der täglichen Zusammensetzung, auch innerhalb eines Individuums (García et al. 2014). Es sind bisher mehr als 1500 Proteine (Zhou et al. 2012) und hierunter 97 einzigartige Proteine in der Tränenflüssigkeit nachgewiesen worden (Green-Church et al. 2008). Die Gesamtkonzentration der Proteine in der Tränenflüssigkeit ist mit ca. 4 g/l zwar deutlich niedriger als im Plasma (Lutz 2001) (Kijlstra und Kuizenga 1994), jedoch wiederum höher als die durchschnittlichen Proteinmengen im Liquor (Brumback 1989) (Tab. 1).

**Tab. 1:** Referenzbereiche für Elektrolyte und Albumin in Plasma, Tränenflüssigkeit und Liquor.

	Plasma <sup>1</sup>	Tränenflüssigkeit <sup>3</sup>	Liquor <sup>1</sup>	
Na <sup>+</sup>	135 - 145	120 - 170	(138 - 150)	mmol/l
K <sup>+</sup>	3,6 - 4,8	6 - 14	2,7 - 3,9	mmol/l
Freies Ca <sup>2+</sup>	1,15 - 1,35	0,3 - 2,0	1,05 - 1,35	mmol/l
Mg <sup>2+</sup>	1,8 - 2,6	0,3 - 1,1	0,38 - 1,4	mmol/l
Cl <sup>-</sup>	92 - 105	106 - 135	116 - 127	mmol/l
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	23,67 ± 0,98	26	22,7 ± 1,15	mmol/l
Albumin	35 - 55 <sup>2</sup>	3,94	0,11 - 0,35 <sup>2</sup>	g/l

Quellen: <sup>1</sup> (Thomas 2005), <sup>2</sup> (Brumback 1989), <sup>3</sup> (Lutz 2001)

Bis auf die dominierende Albuminfraktion, welche in der Tränenflüssigkeit selber synthetisiert wird, unterscheiden sich diese Proteine stark von denen des Blutplasmas (Lutz 2001), da eine sogenannte „Blut-Tränen-Schranke“ existiert, die den Übertritt von großen Molekülen verhindert (Lutz 2001). Unter diesen Proteinen finden sich Wachstumsfaktoren (Dartt 2004), Zytokine (Boehm et al. 2011), Enzyme, wie z. B. Matrix-Metalloproteinasen (Holopainen et al. 2003), Lysozyme, welche mit über 1 g/l die höchsten Konzentrationen in allen Körperflüssigkeiten erreichen (Lutz 2001), sowie Proteasen und Protease-Inhibitoren (de Souza et al. 2006), Immunglobuline (z. B. Immunglobulin A, das in der Tränendrüse durch interstitielle Plasmazellen gebildet wird und eine Konzentration von 10 bis 100 mg/dl erreicht) (Bours et al. 2005) (Lutz 2001), Komplementfaktoren (Lutz 2001) (Sack et al. 1992), Sexualhormone (Mathers et al. 1998), kalziumbindende Proteine (Zhou et al. 2009) und Glykoproteine (Spurr-Michaud et al. 2007). Die Proteine Lysozym,  $\beta$ -Lysin, Lactoferrin und  $\gamma$ -Globulin gelten als tränenspezifisch (Wagner und Lang 2014) und sind u. a. an der Abwehr von Krankheitserregern beteiligt (Wagner und Lang 2014).

Die durchschnittliche tägliche basale Tränenproduktion beträgt ca. 500 ml (Kirsch et al. 2006). Bei Erwachsenen werden im Durchschnitt 1 bis 7  $\mu$ l Tränenflüssigkeit pro Minute produziert (Grehn 2008) (Lutz 2001). Die Menge der produzierten Tränenflüssigkeit sinkt mit zunehmendem Alter (McGill et al. 1984) und sistiert im Schlaf (Kirsch et al. 2006). Die Umsatzrate kann, je nach Stimulation, auf bis zu 10 ml/min gesteigert werden (Lutz 2001).

Man unterscheidet drei verschiedene Arten von Tränen: Eine Grund- bzw. Basisproduktion, eine Reizsekretion und Tränen im Rahmen einer emotionalen Reaktion, dem sogenannten „Weinen“. Diese drei Arten von Tränen sind durch eine unterschiedliche Zusammensetzung charakterisiert, da z. B. die Reizsekretion einen deutlich höheren Wasseranteil aufweist (Rohit et al. 2014).

Der äußerste Schicht des präkornealen Tränenfilms besteht aus polaren und neutralen Lipiden, ungesättigten und verzweigten Fettsäuren sowie Alkoholen, Wachsestern, Cholesterinen, Cholesterylestern und Squalen

(Wagner und Lang 2014) (Lutz 2001). Es konnten über 90 verschiedene Proteine im Sekret der Meibom-Drüsen nachgewiesen werden (Tsai 2006).

### **1.8 Die Innervation der Tränendrüse**

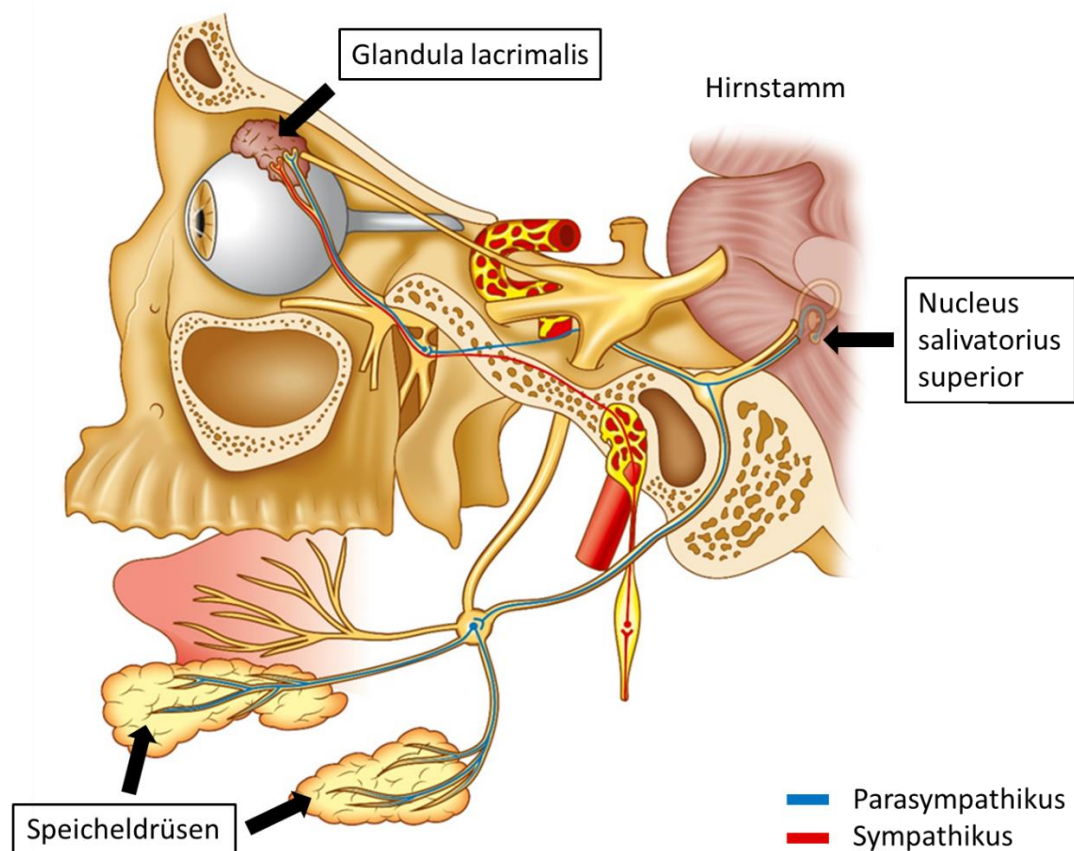
Die Innervation der Tränendrüsen erfolgt direkt über Nervenbahnen des autonomen Nervensystems.

Die Sekretion der Tränendrüsen wird durch parasymphatische Impulse aus dem Nervus (N.) intermedius des N. facialis aktiviert (Kirsch et al. 2006). Diese parasymphatischen Efferenzen stammen aus dem Nucleus (Ncl.) salivatorius superior im Pons, einem der drei paarigen Hirnnervenkerne des N. facialis (Kirsch et al. 2006) (Abb. 2). In diesem Kerngebiet sind allgemein-viszeromotorische und sekretorische Nervenzellen lokalisiert. Die hieraus entstammenden Nervenfasern versorgen die Tränen-, Nasen-, Gaumen- sowie Unterkieferspeichel- und Unterzungenspeicheldrüsen. Der Ncl. salivatorius superior wird über den Fasciculus longitudinalis dorsalis durch den Hypothalamus gesteuert. Die parasymphatischen Efferenzen werden im Ganglion (Ggl.) pterygopalatinum vom ersten auf das zweite Neuron umgeschaltet (Kirsch et al. 2006).

Die Produktion der Tränenflüssigkeit wird durch den Sympathikus über eine Vasokonstriktion gehemmt. Die präganglionären Fasern des Sympathikus entstammen aus den ersten Segmenten des Rückenmarks. Über den Halsteil des Grenzstrangs bzw. den Truncus vagosymphaticus gelangen diese zum Ggl. cervicale superius. Hier werden diese Nervenbahnen vom ersten auf das zweite Neuron umgeschaltet und bilden anschließend den Plexus caroticus internus. Zunächst dem Verlauf der Arteria (A.) carotis interna und später der A. lacrimalis folgend, erreichen die sympathischen Efferenzen anschließend die Tränendrüse (Kirsch et al. 2006).

Die Gl. lacrimalis wird sensibel durch den N. lacrimalis des N. trigeminus versorgt (Grehn 2008). Eine Reizung des N. trigeminus bewirkt über die Freisetzung von Acetylcholin, das mit einem G-Protein-gekoppelten Muskarin-Rezeptor interagiert und intrazelluläre Kalzium-Speicher mobilisiert, welche wiederum Chlorid- und Kalium-Kanäle öffnen, eine verstärkte Sekretion von Tränenflüssigkeit (Lutz 2001).

**Abb. 2:** Innervation der Tränen- und Speicheldrüsen (eigene Abbildung, erstellt und modifiziert unter Mitarbeit des Elsevier Verlags).



### 1.9 Erkrankungen der Tränendrüsen

Erkrankungen des Tränendrüsenapparates sind insgesamt sehr häufig. Je nach betroffener Tränendrüse unterscheidet man folgende Krankheitsbilder:

Eine Schädigung des Hornhautepithels durch z. B. Verätzung, Verbrennung oder Entzündung sowie ein Vitamin-A-Mangel und einer physiologischen Abnahme der Sekretionsleistung im höheren Lebensalter können über eine verminderte Produktion des schleimigen Sekrets der Becherzellen in der Bindehaut zu einer Tränenfilminstabilität führen (Klauß 2002).

Eine Dysfunktion der Gl. lacrimalis durch z. B. Veränderungen im Hormonhaushalt (z. B. Frauen in der Menopause) oder autoimmune (z. B. Sjögren-Syndrom), erregerbedingte oder aseptische Entzündungen (z. B. im Rahmen einer Bestrahlung) können in einer veränderten Zusammensetzung und Osmolarität mit vorzeitiger Verdunstung der wässrigen Schicht des Tränenfilms resultieren (Klauß 2002).

Eine Veränderung in der Zusammensetzung der äußersten, öligen Lipidschicht, welche durch die Meibom'schen Lidranddrüsen produziert wird, z. B. durch eine Unterfunktion oder Entzündung, kann ebenfalls zu einer Tränenfilminstabilität führen (Klauß 2002).

## **1.10 Ophthalmologische Störungen im IPS**

### **1.10.1 Prävalenz von ophthalmologischen Störungen im IPS**

Das Erscheinungsbild vom IPS wird dominiert durch die typische Symptomkonstellation, bestehend aus Brady- bzw. Hypokinese, Rigor, Tremor und/oder posturaler Instabilität. Neben diesen rein motorischen Komplikationen können jedoch auch eine Reihe von nicht motorischen Symptomen vorliegen, welche u. a. durch eine Mitbeteiligung des autonomen Nervensystems im Rahmen der globalen Neurodegeneration verursacht sein können: Neben z. B. Riech- und Geschmacksstörungen, Obstipation und Harninkontinenz sind Probleme des Sehens häufige, für Patienten sehr belastende, für den Arzt schwer zu behandelnde und wissenschaftlich (noch) unzureichend verstandene Komplikationen (Bye et al. 2009) (Biousse et al. 2004). Sehstörungen führen regelhaft zu einer Minderung der Lebensqualität (Almer et al. 2012) (Davidsdottir et al. 2005), da IPS-Erkrankte auf ein funktionierendes Sehen angewiesen sind, v. a. zur Kompensation der motorischen Komplikationen. Laut einem Fragenbogen mit 81 teilnehmenden IPS-Patienten gaben zwischen 57 bis 78 % der Befragten mindestens eine Störung bezogen auf das Sehen oder der visuell-räumlichen Wahrnehmung an. Hierbei berichteten jedoch nur ca. 44 % der Patienten, dieses Problem auch mit dem behandelnden Arzt besprochen zu haben (Davidsdottir et al. 2005). In weiteren Studien berichteten zwischen 26,7 und 42 % der IPS-Patienten von Problemen beim Lesen (Davidsdottir et al. 2005) (Biousse et al. 2004) und 75 % beim Schreiben (Davidsdottir et al. 2005). Am häufigsten weisen IPS-Patienten in der ophthalmologischen Untersuchung ein vermindertes Kontrastsehen (Bye et al. 2009) (Pieri et al. 2000), eine reduzierte Farbdiskriminierung (ca. 10 % der IPS-Studienpatienten) (Davidsdottir et al. 2005) (Pieri et al. 2000), eine verminderte Blinzelfrequenz (Agostino et al. 2008), ein Blepharospasmus bzw. eine Lidapraxie (Yoon et al. 2005) sowie Doppelbilder (22 bis 38 %) (Chaudhuri et al. 2006)

(Davidsdottir et al. 2005) und visuelle Halluzinationen (25 bis 40 %) (Kesler und Korczyn 2006) (Davidsdottir et al. 2005) (Biousse et al. 2004) auf. Des Weiteren finden sich gehäuft Komorbiditäten, wie z. B. eine seborrhoische Blepharitis (Kesler und Korczyn 2006) (Biousse et al. 2004), eine Keratokonjunktivitis sicca (Biousse et al. 2004), Funktionsstörungen der Meibom-Drüsen sowie Katarakte und/oder Glaukome (Nowacka et al. 2014). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass z. B. die Häufigkeit einer Blepharitis sich nicht signifikant von Kontrollpatienten unterschied und zudem altersabhängig war (Biousse et al. 2004).

### **1.10.2 Pathophysiologie von ophthalmologischen Störungen im IPS**

Nach aktuellem Kenntnisstand wird eine multifaktorielle Genese auf verschiedenen funktionalen Ebenen als Ursache der visuellen Störungen angenommen: Es wird eine motorische Beeinträchtigung der Augenmuskeln und Augenlider im Rahmen der Brady- bzw. Hypokinese (Armstrong 2011), eine Degeneration von dopaminsensitiven, neuronalen Strukturen in der Netzhaut (Armstrong 2011) sowie eine Dysfunktion von striatofrontalen (Owen et al. 1993) und auch visuospatialen Leitungsbahnen im okzipitalen Kortex vermutet. Sehprobleme zeigen sich sowohl in sehr frühen als auch in fortgeschrittenen Stadien sowie in unbehandelten als auch in behandelten Patienten (Davidsdottir et al. 2005). In frühen Stadien zeigen sich v. a. Störungen in der Farbdiskrimination bzw. im Farbsehen, insbesondere für Farben aus dem grünen und blauen Farbspektrum, da diese „Blau-Zapfen“ den geringsten Anteil aller Fotorezeptoren in der Netzhaut ausmachen und daher für ein dopaminerges Defizit am empfindlichsten sind (Bye et al. 2009). In fortgeschrittenen Stadien werden eher Doppelbilder und visuelle Halluzinationen berichtet, welche auch ein koinzidentielles Auftreten aufweisen können (Davidsdottir et al. 2005). Dieses stadienabhängige Auftreten könnte z. B. durch die fortschreitende Neurodegeneration und das Übergreifen der IPS-Pathologie auf den Neokortex erklärt werden. Hierbei zeigte sich keine Assoziation der visuellen Halluzinationen (v. a. Bilder von Tieren und Menschen), welche jeweils für wenige Minuten andauern und eher am Nachmittag und Abend auftreten, zur Einnahme von Levodopa oder Dopamin-Agonisten (Davidsdottir et al. 2005), sodass wahrscheinlich keine Medikamentennebenwirkung, sondern ein direkter

pathophysiologischer Zusammenhang zum IPS vermutet werden kann. Auch eine eindeutige Geschlechtspräferenz konnte nicht detektiert werden (Davidsdottir et al. 2005).

### **1.10.3 Auftreten einer Keratokonjunktivitis sicca bei Patienten mit IPS**

Eine Beteiligung von extraokulären Strukturen, wie z. B. des Tränenapparates, zeigt sich bei IPS-Erkrankten u. a. in einem gehäuften Auftreten einer Keratokonjunktivitis sicca, einer Erkrankung, welche auch als „Syndrom des trockenen Auges“ („*Dry Eye syndrome*“, DES) bezeichnet wird. Dieses Krankheitsbild ist durch eine „Trockenheit“ des Auges gekennzeichnet und äußert sich z. B. durch gerötete Bindehäute, „brennende“ Schmerzen, Verschwommensehen und Lichtempfindlichkeit. Es wird eine multifaktorielle Genese aufgrund einer Instabilität und Hyperosmolarität des Tränenfilms, einer Entzündung und Schädigung der Augenoberfläche sowie neurosensorischen Anomalien vermutet (Craig et al. 2017). In der Allgemeinbevölkerung findet sich eine Zunahme der Häufigkeit in Abhängigkeit vom Alter (Guillon und Maïssa 2010) (Chia et al. 2003).

In einer Studie mit IPS-Patienten berichteten ca. 63 % über typische Symptome eines DES im Vergleich zu nur 29 % der Kontrollpatienten (Biousse et al. 2004). Als Korrelat des DES in Patienten mit IPS lassen sich u. a. reduzierte Werte im Schirmer-Test (Aksoy et al. 2014) (Çomoğlu et al. 2013) (Tamer et al. 2005), einem Verfahren zur Messung der Tränenvolumina, und in Tests für die Tränenfilmstabilität (Aksoy et al. 2014) (Tamer et al. 2005) (Biousse et al. 2004) nachweisen. Als Ursache des DES in IPS-Patienten wird eine multifaktorielle Genese, bestehend aus Dysfunktion der vegetativen Nervenbahnen zu den Tränendrüsen (Reddy et al. 2013), einer Unterfunktion v. a. der Meibom-Drüsen (Nowacka et al. 2014) (Reddy et al. 2013) (Tamer et al. 2005), einer Änderung in der Zusammensetzung der wässrigen Schicht und Muzinschicht des Tränenfilms (Demirci et al. 2016) sowie einer reduzierten Blinzelfrequenz im Rahmen der Brady- bzw. Hypokinese (Agostino et al. 2008) oder aufgrund einer reduzierten kornealen Oberflächensensibilität (Reddy et al. 2013) vermutet.

Im Hinblick auf die Unter- bzw. Fehlfunktion der Meibom-Drüsen zeigt sich eine gegenseitige Abhängigkeit der ursächlichen Faktoren: So können die Meibom-

Drüsen nur während des Blinzeln sekretieren. Im Falle einer reduzierten Blinzelfrequenz, z. B. aufgrund einer Brady- bzw. Hypokinese oder aufgrund einer reduzierten Oberflächensensibilität der Kornea (Reddy et al. 2013), sinkt somit die Sekretionsleistung dieser Tränendrüsen signifikant. Darüber hinaus führt eine Verminderung der Sekretionsleistung der Meibom-Drüsen zu einer dünneren Lipidschicht, was wiederum zu einer vorzeitigen Verdunstung der wässrigen Schicht des Tränenfilms führen kann, da das Sekret der Meibom-Drüsen im Gesunden den Tränenfilm stabilisiert. Hieraus resultierende Schäden an der kornealen Oberfläche führen wiederum zu einer Schädigung der Becherzellen und somit zu einer verminderten Anheftung des Tränenfilms am Auge, was ebenfalls in einer Tränenfilmstabilität resultiert. Das vorzeitige Verdunsten der Tränenflüssigkeit kann auch zu einem gehäuften Auftreten von Infektionen und Entzündungen führen, u. a. durch verminderte bakterizide Eigenschaften und Freisetzung von Zytokinen, welche die Sekretionsleistung der Meibom-Drüsen reduzieren können. Diese Hypothese wird u. a. durch die negative Korrelation von Blinkrate und Tränenfilmstabilität in diversen Studien unterstützt (Söğütlü Sarı et al. 2015) (Biousse et al. 2004).

Reduzierte Blinzelfrequenzen sind häufiger in fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu finden und waren annähernd normal in Patienten mit einem leichten bis mildem Schweregrad der Erkrankung (Demirci et al. 2016) (Aksoy et al. 2014) (Bagheri et al. 1994) (Karson et al. 1982), wenn auch einige Studien keine Korrelation von Hoehn-und-Yahr (HY)-Stadium, Krankheitsdauer (Demirci et al. 2016) oder der Einnahme von dopaminergem Medikation (Fitzpatrick et al. 2012) (Agostino et al. 2008) (Tamer et al. 2005) zur Blinkrate aufzeigen konnten. Als Ursache für die verminderte Blinzelfrequenz wird, wie bereits aufgeführt, u. a. eine Brady- bzw. Hypokinese der Augenmuskeln vermutet (Agostino et al. 2008). Darüber hinaus zeigte sich jedoch eine Abnahme der Blinkrate mit dem Alter in allen Studienteilnehmern sowie überlappende Werte zwischen den Kohorten (Fitzpatrick et al. 2012), sodass diese Veränderungen nicht sicher als spezifisch eingeordnet werden können. Unterschiede in den Ergebnissen für Tränensekretionsrate und Blinzelfrequenz, u. a. aufgrund einer Heterogenität in den Kohorten, einer geringen Anzahl von Studienpatienten und Unterschieden in der dopaminergen Medikation können zudem hierbei nicht ausgeschlossen werden.



IPS-Patienten mit einer verminderten Blinkrate und einer erniedrigten Tränenfilmstabilität weisen häufig auch eine dünnere Dicke der Hornhaut auf (Demirci et al. 2016), wobei die Dicke der Kornea ein solider Indikator für die Gesundheit der Hornhaut ist. Als Ursachen für die Abnahme der Kornea-Dicke werden eine Veränderung des Milieus der wässrigen Schicht von vorwiegend isoton hin zu einer hypertonen Lösung, welche die Kornea austrocknen lässt (Gilbard et al. 1978), und/oder eine erhöhte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus dem kornealen Epithel, wie z. B. Interleukin-1, welche durch Induktion von Apoptose oder durch Freisetzung von Kollagenasen auf die Keratozyten wirken können (Wilson et al. 1996), vermutet. In IPS-Patienten zeigte sich eine Abnahme der Kornea-Dicke v. a. in fortgeschrittenen Krankheitsstadien (Aksoy et al. 2014). Zudem zeigte sich auch eine signifikant reduzierte Nervenfaserdichte in der Hornhaut von IPS-Patienten, welche mit erhöhten Werten für die Schwere sowohl der motorischen als auch der autonomen Symptome sowie einer parasymphatischen Dysfunktion invers korrelierte (Kass-Iliyya et al. 2015). Es ergab sich jedoch keine Assoziation zu Alter, Krankheitsdauer und Dosis der dopaminergen Medikation (Kass-Iliyya et al. 2015). Im Hinblick auf diese Ergebnisse zeigte sich interessanterweise auch, dass IPS-Patienten selbst von keinen bzw. nur geringen Beschwerden, wie z. B. „Brennen“ der Augen, berichteten, obwohl sich objektiv teils deutliche Veränderungen an der Augenoberfläche erkennen ließen. Diese Tatsache lässt sich a. e. aufgrund der reduzierten Oberflächensensibilität der Kornea in IPS-Patienten erklären (Reddy et al. 2013).

Reduzierte Tränenvolumina, gemessen z. B. durch den Schirmer-Test, können aber auch Folge einer verminderten Produktion der Tränendrüsen an sich und/oder einer raschen Verdunstung als Folge einer geänderten biochemischen Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit sein. Periphere autonome Neuropathien treten häufiger bei IPS-Patienten auf und können durch eine verminderte autonome Innervation der Tränendrüsen die Produktion von Tränenflüssigkeit reduzieren (Wang et al. 2013). Die allgemeine Häufigkeit von Störungen der Tränendrüsensekretion scheinen linear mit dem Krankheitsstadium von IPS-Patienten zu korrelieren (Tamer et al. 2005), wobei Studien zur Korrelation von Tränensekretionsrate zu Krankheitsstadium und -dauer nicht eindeutig gewesen sind, da sich in einer Studie keine Assoziation

zeigte (Söğütlü Sarı et al. 2015) und eine weitere Studie eine starke negative Korrelation aufwies (Aksoy et al. 2014). Es ergaben sich zudem keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Tränenosmolarität zwischen IPS-Patienten und gesunden Kontrollpatienten, wobei jedoch Erkrankte leicht höhere Werte aufwiesen (Söğütlü Sarı et al. 2015). Eine erhöhte Osmolarität wird im Allgemeinen als Auslöser für eine vermehrte Freisetzung von Entzündungsfaktoren gewertet, welche wiederum negative Einflüsse auf die Dicke der Kornea und damit auch auf die Sensibilität der Hornhaut haben können.

Zusammenfassend konnten bisher eine Vielzahl von Veränderungen des Auges, des Tränendrüsenapparates und der Tränenflüssigkeit von Patienten mit einem IPS aufgezeigt werden. Pathologische Veränderungen, wie z. B. eine reduzierte korneale Oberflächensensibilität, eine verminderte Stabilität des Tränenfilms, eine Störung der Meibom-Drüsen, eine reduzierte Blinzelfrequenz und eine verminderte Tränensekretion sind hierbei jedoch nicht IPS-spezifisch und können auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, wie z. B. in Patienten mit AD (Örnek et al. 2015), z. B. aufgrund einer Dysfunktion der cholinergen Nervenbahnen, wiedergefunden werden. In Patienten mit PSP ergaben sich sogar deutliche geringere Blinzelfrequenzen und eine deutlich geringere Oberflächensensibilität als in IPS-Patienten (Reddy et al. 2013). Detaillierte histopathologische Untersuchungen der Tränendrüsen bei IPS-Patienten liegen derzeit (noch) nicht vor. Zudem lässt sich aufzeigen, dass sich die unterschiedlichen pathophysiologischen Prozesse häufig gegenseitig negativ beeinflussen.

### **1.11 Biochemische Verfahren in der Proteomik**

Der Aufbau eines Proteins ist durch eine charakteristische Aminosäuresequenz festgelegt, welche in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) codiert ist. Im ersten Schritt erfolgt im Zellkern das Ablesen eines DNA-Abschnittes durch Polymerasen und die anschließende Synthese eines komplementären Ribonukleinsäure (RNA)-Moleküls. Dieser Prozess wird Transkription genannt. Die genetische Information des RNA-Moleküls wird dann im Zytoplasma an den Ribosomen abgelesen und es erfolgt anhand der vorliegenden Basensequenz eine Verknüpfung von Aminosäuren zu Polypeptiden, den sogenannten

Vorläuferproteinen. Die Polypeptide werden schließlich weiter zu Proteinen verknüpft. Durch Modifikation während der Proteinbiosynthese, z. B. des RNA-Moleküls während der Transkription (posttranskriptionale Modifikation) oder der Vorläuferproteine während der Translation (posttranslationale Modifikation), kann sich der ursprüngliche Informationsgehalt soweit verändern, dass aus ein und derselben Gensequenz eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine entstehen können.

Das Proteom ist eine Bezeichnung für die Gesamtheit aller Proteine in einem Lebewesen, einem Gewebe, einer Zelle, einem Zellkompartiment oder einer Körperflüssigkeit zu einem festgelegten Zeitpunkt und unter definierten Bedingungen (Wilkins et al. 1996). Das Proteom ist dynamisch und steht in einem kontinuierlichen Gleichgewicht von Neusynthese und Abbau von Proteinen. Die Zusammensetzung des Proteoms kann sich daher mit der Zeit, den biologischen Anforderungen (z. B. Temperatur) sowie aufgrund von Stress, Krankheiten, Medikamenten und anderen Umweltfaktoren verändern.

Als Proteomik bezeichnet man die biochemische Analyse der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung aller Proteine in einem geschlossenen System (Anderson und Anderson 1998). Die Komplexität und Dynamik des Proteoms stellt die Proteomik vor enorme technische Herausforderungen. Im Allgemeinen werden in der Proteomanalyse entweder antikörperbasierte Methoden (*immunosorbent assays*) oder massenspektrometrische Verfahren zum Proteinnachweis angewandt.

*Immunoblots*, wie z. B. *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) oder *Western blots*, gehören zu den geläufigsten Methoden in der Bioanalytik und werden seit Jahrzehnten zur Identifikation, zur Validierung und zur Quantifizierung von Kandidatenproteinen eingesetzt. *Immunoblots* bieten eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität bei geringem Aufwand hinsichtlich der technischen Ausstattung sowie des Kosten- und Zeitbedarfs. Darüber hinaus bieten *immunoblots* auch die Möglichkeit zur Automatisierung. Die Nachteile der *immunoblots* sind die hohen fachlichen Anforderungen an den Untersucher im Hinblick auf die technische Durchführung und anschließende Auswertung, v. a.

aufgrund der spezifischen chemischen Eigenschaften der eingesetzten Antikörper (Gan und Patel 2013).

Eine weitere Methode sind sogenannte „gelbasierte Verfahren“, wie z. B. die ein- oder zweidimensionale Elektrophorese (*one- or two-dimensional gel electrophoresis*, 1-DE bzw. 2-DE), einschließlich der fluoreszierenden zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese (*two-dimensional difference gel electrophoresis*, 2D-DIGE), welche die isoelektrische Fokussierung mit der Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) kombiniert: Im ersten Schritt, sogenannte „erste Dimension“, wandern die Proteine entlang eines Gelstreifens und in einem elektrischen Feld zu einem charakteristischen sogenanntem isoelektrischen Punkt, an dem sich die positiven und negativen Ladungen aufheben. Hierbei wird die Ladung des Proteins von den sauren und basischen Aminosäureresten bestimmt. In der zweiten Dimension werden die Proteine dann nach ihren Molekulargewichten in einem SDS-haltigen Polyacrylamidgel mittels erneuter Elektrophorese aufgetrennt. Die einzelnen *spots* enthalten nun idealerweise alle Proteine einer Molekülgröße, welche dann durch Anfärbung sichtbar gemacht werden können. Eine zusätzliche Quantifizierung kann über Bildanalysen erfolgen. Ein großer Vorteil der 2-DE ist die Identifikation auch der modifizierten Proteinspezies, die Zuverlässigkeit der Methode und die Möglichkeit zur Kombination mit anderen Techniken der Proteomik. Gelbasierte Verfahren sind jedoch im Allgemeinen sehr arbeitsintensiv und können methodenbedingt nur die abundantesten Proteine und Proteine mit hydrophilen Eigenschaften abbilden. Auch haben 2-DE-Gele eine Limitation hinsichtlich sehr basischer Proteine sowie eine begrenzte Reproduzierbarkeit aufgrund von Unterschieden in der Zusammensetzung der Gele und Puffer, welche zwischen den Herstellern variieren können (Rabilloud et al. 2010) (Graves und Haystead 2002).

Einen besonderen Stellenwert in der Proteomik nimmt heutzutage die Massenspektrometrie (MS) ein. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren zur Messung der Masse von Molekülen. MS-Verfahren können sowohl für die Identifikation als auch für die Quantifizierung von Proteinen eingesetzt werden. In einem Massenspektrometer wird die zu untersuchende Probe zunächst in einem Vakuum verdampft und ionisiert. Es gibt eine Vielzahl von verschiedenen Arten der Ionisierung, wie z. B. *electron impact*, *electrospray ionization* (ESI),

*chemical ionisation* oder *matrix-assisted laser desorption/ionization*. Je nach Ionisierungsart entstehen positiv oder negativ geladene Ionen. Sie können einfach oder auch mehrfach geladen sein. In einem Analysator erfolgt dann die Auftrennung der Ionen und weitere Analyse: Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Aufspaltung von Ionen, wie z. B. Sektorfeldgerät, *time of flight* oder *quadrupol*. Je nach angewandter Methodik werden die hieraus entstandenen Ionen dann elektrischen und/oder magnetischen Feldern ausgesetzt, welche eine Beschleunigung der Ionen bewirken. Messbare Parameter, wie z. B. Geschwindigkeit und Kreisbahnradius, sind von der Massenträgheit des Ions abhängig und können somit eindeutig zugeordnet werden. Ein Detektor registriert die einzelnen Ionen durch ihre charakteristische Wanderung entlang dieser Felder (Ionenstrom) und berechnet hieraus ein Massenspektrum. Aus einzelnen Signalen, den sogenannten *peaks*, lässt sich die molare Masse der Verbindung bzw. der Fragmente ablesen. Im Anschluss erfolgt ein Vergleich der detektierten Massenspektren mit bereits bekannten Massenspektren in verschiedenen Datenbanken. Auch bei unbekanntem Verbindungen, deren Struktur noch nicht in den Datenbanken hinterlegt ist, können anhand des Musters der Fragmentierung Rückschlüsse auf die zugrundeliegende Molekülstruktur erfolgen. Ein großer Vorteil der MS ist die Möglichkeit zur Analyse von unterschiedlichsten Substanzen (u. a. niedriger oder hoher molekularer Masse, unterschiedlicher Polarität sowie hoher oder niedriger Konzentration) aus verschiedensten Matrices. Auch ist die Entwicklung einer Methode, z. B. im Vergleich zur *immunosorbent assay*-Technologie, deutlich kostengünstiger und weniger aufwändig, da u. a. keine spezifischen Antikörper entwickelt werden müssen. Die Nachteile der MS sind die oftmals komplexen und daher zeitaufwändigen sowie nicht standardisierbaren und nicht automatisierbaren Arbeitsschritte, welche ein sehr gut ausgebildetes Bedienpersonal voraussetzen. Hinsichtlich der Vor- und Nachteile gibt es jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen MS-Verfahren (Fliser et al. 2007).

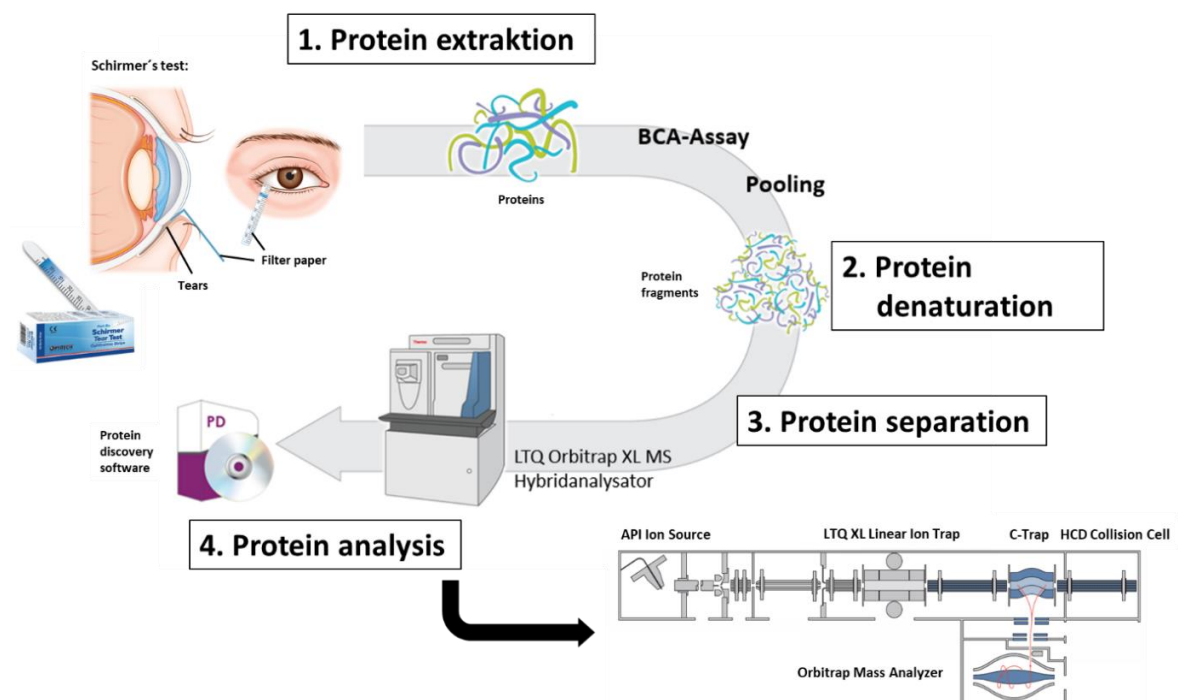
Heutzutage werden in der Proteomik zur Minimierung methodenspezifischer Limitationen verschiedene Verfahren der Proteomik gekoppelt: Durch die Einschränkungen der gelbasierten Verfahren, u. a. für hydrophobe Membranproteine, wurden sogenannte „gelfreie“ Techniken entwickelt, welche die Proteine zunächst zu Peptiden fragmentieren. Das Peptidgemisch wird dann

durch Flüssigkeitschromatographie (*Liquid chromatography*, LC) aufgetrennt und anschließend in ein Massenspektrometer zur weiteren Analyse überführt. Dieses Verfahren wird als *Shotgun proteomics* bzw. *Bottom-up proteomics* bezeichnet, da bei diesem Verfahren die Proteine direkt enzymatisch zu Peptiden verdaut werden und nicht, wie bei den *Top-down proteomics*, die intakten Proteine erst isoliert und dann fragmentiert werden. Die Vorteile der *Bottom-up proteomics* sind eine deutlich höhere Sensitivität, ein geringer Arbeitsaufwand und die breite Anwendbarkeit auf verschiedene Quellen. Ein Nachteil dieser frühen Fragmentierung von Proteinen ist jedoch, dass posttranskriptional und posttranslational modifizierte Proteine sowie sehr kleine Proteine nur unzureichend erkannt werden können.

In dieser Dissertation wurde ein Massenspektrometer namens LTQ Orbitrap XL<sup>®</sup> von der Firma Thermo Scientific verwendet, welches eine *linear trap quadrupole* (LTQ)- mit einer *Orbitrap*-Technologie kombiniert. Die *Orbitrap*-Technologie ist die jüngste Entwicklung innerhalb der sogenannten „Ionenfallen-Massenspektrometer“. Im Vergleich zu einem konventionellen Massenspektrometer, in dem die Ionisierung und Massenanalyse kontinuierlich, aber örtlich getrennt erfolgt, arbeitet ein Ionenfallen-Massenspektrometer diskontinuierlich. In einer Ionenfalle können Ionen mittels elektrischer und magnetischer Felder variabel festgehalten werden, sodass massenaufgetrennte Analysen möglich sind. Das LTQ Orbitrap XL<sup>®</sup>-Massenspektrometer funktioniert wie folgt: Nach Auftrennung der Proteine mittels LC erfolgt die Ionisierung über ESI. Die entstandenen Ionen werden zunächst in der *Linear ion trap* gesammelt und dann in die sogenannte *C-shaped storage trap* („*C-trap*“) überführt, in der die Ionen vor Injektion in die *Orbitrap* u. a. abgekühlt werden. Im Zentrum der *Orbitrap*-Ionenfalle befindet sich eine spindelförmige Elektrode, um die sich die Ionen aufgrund der elektrostatischen Anziehung radial auf sogenannten Kreisbahnen (*orbits*) bewegen. Die Frequenz der schwingenden Ionen erzeugt Signale in Detektorplatten, die mittels der Fouriertransformation in die entsprechenden Masse/Ladung ( $m/z$ )-Verhältnisse umgerechnet werden können (Abb. 3). Im Vergleich zu konventionellen Fouriertransformation-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometern funktioniert die *Orbitrap* mit einem elektrostatischen Feld statt einem Magnetfeld, sodass die *Orbitrap*-Massenspektrometer ohne eine aufwendige Kühlung mit flüssigem Helium und

somit einem geringeren Platzbedarf auskommen. Die Vorteile der modernen *Orbitrap*-Technologie sind zudem eine hohe Sensitivität, das hohe Auflösungsvermögen und die hohen erreichbaren Massen.

**Abb. 3:** Arbeitsablauf der Proteomanalyse mittels *Bottom-up*-LC-ESI-MS/MS (modifiziert nach Abbildungen von der Herstellerseite, mit freundlicher Genehmigung von <http://planetorbitrap.com>).



### 1.12 Hintergrund dieser Studie

Als ein Resultat der verbesserten Techniken in der MS ist die Proteomik ein bedeutender Baustein der Biomarkersuche in menschlichen Körperflüssigkeiten geworden.

Proteine in der Tränenflüssigkeit sind bereits intensiv bei verschiedensten lokalen und systemischen Erkrankungen untersucht worden (Hagan et al. 2016) (Tsuji und Kawazu 2012). Bis heute konnten einige Tränenproteine, z. B. kleinere Proteine, wie Zytokine und Chemokine, als mögliche Biomarker charakterisiert werden: Erhöhte Werte von TNF- $\alpha$  sowie Interleukin-1b, Interleukin-6 und Interferon- $\gamma$  wurden in diversen inflammatorischen, aber auch nicht entzündlichen Krankheitsbildern beobachtet (Boehm et al. 2011) (Enruez-de-Salamanca et al. 2010) (Liu et al. 2010) (Lam et al. 2009)

(Pflugfelder et al. 1999). Zytokine und Chemokine sind als stabile und gut reproduzierbare Biomarker beschrieben worden (Benito et al. 2014), obwohl auch Veränderungen in Abhängigkeit von bestimmten Erkrankungen und unter Einnahme von bestimmten Medikamenten gezeigt werden konnten, welche somit in der Auswertung Beachtung finden müssen (Pieragostino et al. 2013).

Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es nur eine begrenzte Anzahl an Studien über Tränenflüssigkeit als mögliche Quelle von Biomarkern in neurodegenerativen Erkrankungen: In einigen Studien konnten parkinsonspezifische Veränderungen in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, die eine enge anatomisch-topographische Nähe zum Tränendrüsenapparat aufweisen: So konnten z. B. Lewy-Körper in den Speicheldrüsen von IPS-Patienten (Del Tredici et al. 2010) sowie erniedrigte Werte für  $\alpha$ -Syn (Al-Nimer et al. 2014) (Devic et al. 2011) und erhöhte Konzentrationen von DJ-1 mittels *ELISA* assay im Speichel von Patienten mit IPS nachgewiesen werden (Devic et al. 2011). Interessanterweise stammen die Nerven, welche die Speicheldrüsen innervieren, analog zu den Efferenzen, welche die Tränendrüsen innervieren, aus einem gemeinsamen Kerngebiet, dem Ncl. salivatorius superior im Hirnstamm (Abb. 2). Der Hirnstamm ist wiederum nach aktuellem Stand der Forschung sehr früh im Krankheitsverlauf eines IPS von pathophysiologischen Veränderungen betroffen (Braak et al. 2003). Darüber hinaus wird im aktuellen wissenschaftlichen Diskurs eine aktive Sekretion (Lee 2005) und Transmission von  $\alpha$ -Syn entlang von Nervenbahnen diskutiert (Recasens und Dehay 2014) (Brundin et al. 2010). Daher kann eine Übertragung und Freisetzung von  $\alpha$ -Syn und/oder anderen parkinsonassoziierten Proteinen in die Tränenflüssigkeit vermutet werden. Bis heute ist dieser Sachverhalt jedoch von keiner Forschungsgruppe hinreichend untersucht worden. Einschränkend ist zu erwähnen, dass sich die Sekrete von Speichel- und Tränendrüsen in ihrer Zusammensetzung unterscheiden: Der Speichel wird z. B. durch mehrere Drüsen, d. h. Ohr-, Unterkiefer- und Unterzungenspeicheldrüsen, produziert. Die Tränenflüssigkeit ist ein Sekret der Tränendrüse, der Meibom-Drüsen und der Becherzellen. Die Gesamtproteinkonzentration im Speichel ist zudem ca. 10-fach niedriger als in der Tränenflüssigkeit (Tab. 1).



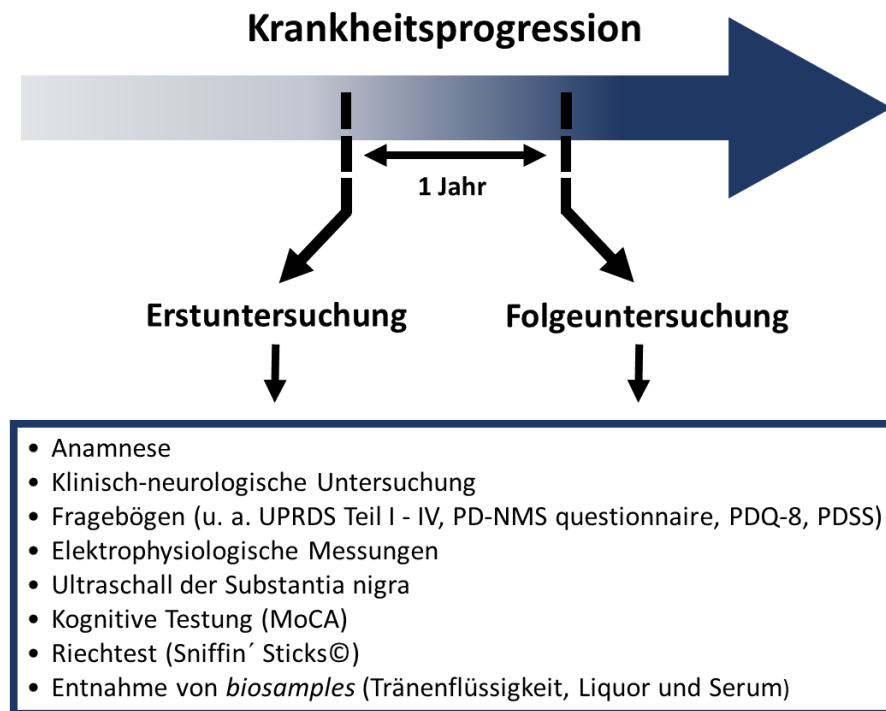
Im Jahr 2013 konnte eine Studie von Çomoğlu et al. signifikant erhöhte Werte von TNF- $\alpha$ , einem Zytokin, das von Makrophagen und neuronalem Gewebe produziert wird, in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten nachweisen. Es zeigte sich aber keine Korrelationen zur Dauer der Erkrankung oder motorischen Komplikationen (Çomoğlu et al. 2013). Erst im Jahr 2019 veröffentlichte die Arbeitsgruppe von Hamm-Alvarez zwei Publikationen über pathophysiologisch bedeutsame Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten, welche jedoch zum Zeitpunkt der Promotionsarbeit in den Jahren 2015 bis 2016 noch nicht vorlagen: In einer ersten Studie wurden sogenannte „Reflextränen“ (Entnahme der Tränen ohne Lokalanästhetikum) von IPS-Patienten durch Schirmer-Teststreifen entnommen sowie mittels *single* und *multiplex ELISA assays* analysiert. Es zeigten sich signifikant erhöhte Werte für oligomeres  $\alpha$ -Syn, CCL-2, einem Chemokin, und Lactoferrin sowie signifikant reduzierte Lauflängen im Schirmer-Test (Hamm-Alvarez et al. 2019a). In einer weiteren Analyse, diesmal von unstimulierter Tränenflüssigkeit (Entnahme der Tränen mit Lokalanästhetikum), zeigten sich erniedrigte Werte für die Gesamtkonzentration von  $\alpha$ -Syn und erhöhte Werte für oligomeres  $\alpha$ -Syn in IPS-Patienten. Die Werte für CCL-2 und MMP-9, einem Protein, welches in Patienten mit DES und inflammatorischen Augenerkrankungen erhöht ist, sowie Lactoferrin zeigten keine Unterschiede zwischen den Kohorten (Hamm-Alvarez et al. 2019b). DJ-1 zeigte in beiden Studien einen Trend für erhöhte Werte. Hinsichtlich der Gesamtproteinkonzentration und dem *Ocular surface disease index*, einem subjektiven Fragebogen im Hinblick auf trockene Augen, ergaben sich in beiden Studien ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Im Vergleich zu den Studien im Speichel von IPS-Patienten konnten somit analoge Veränderungen auch in der unstimulierten Tränenflüssigkeit gezeigt werden, wobei jedoch das Ausmaß der Veränderungen von oligomerem  $\alpha$ -Syn in der Tränenflüssigkeit stärker gewesen ist. Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass in diesen monozentrischen Studien signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern vorlagen: So ergaben sich nur in der männlichen Kohorte signifikant höhere Werte für das gesamte und oligomere  $\alpha$ -Syn sowie auch nur hier erhöhte Werte für DJ-1, CCL-2 und Lactoferrin. Darüber hinaus zeigte sich nur eine geringe Sensitivität und Spezifität für eine Kombination von oligomerem  $\alpha$ -Syn, CCL-2 und der Lauflängen im Schirmer-Test (AUC 0,85). Die

IPS-Patienten wiesen darüber hinaus nur moderate motorische Einschränkungen (durchschnittlich 28 Punkte im Teil III der *Unified Parkinson's disease rating scale*, UPDRS) und eine geringe Krankheitsschwere (Stadium 2 auf der mHY-Skala) auf. Auch verbleibt der Anstieg von CCL-2 und Lactoferrin, welcher nur in den Reflextränen auftrat, unklar (Hamm-Alvarez et al. 2019b).

Im Allgemeinen weist die Tränenflüssigkeit als mögliche Quelle für Biomarker im Vergleich zu anderen Körperflüssigkeiten mehrere Vorteile auf: Sie ist leicht erhältlich, sodass die Kollektion der Proben nicht invasiv, schmerzlos und zugleich preiswert ist. Es ist nur eine kurze Einweisung von medizinischem und nicht medizinischem Personal zur standardisierten Entnahme von Tränenflüssigkeit erforderlich. Die Tränenflüssigkeit ist zudem eine reine Flüssigkeit ohne höhergradige Kontamination durch andere Flüssigkeiten, wie z. B. Blut, welche die Evaluation von Proteinen stören könnte. Des Weiteren sind durch die Analyse des Tränenproteoms in anderen Erkrankungen, die Probenkollektion und -analyse bereits ausführlich validiert und etabliert. Neben den genannten Vorteilen in der Analyse von Tränenflüssigkeit als Quelle für Biomarker müssen jedoch auch eine Reihe von möglichen Störfaktoren beachtet werden: Im Gegensatz zu Blut und Liquor besitzt die Tränenflüssigkeit keine direkte Verbindung zum zentralen Nervensystem und weist im Vergleich zum Blut einen niedrigeren Proteingehalt auf (Lutz 2001), welcher jedoch im Vergleich zum Liquor höher ist (Tab. 1). Besonders bei älteren Menschen und in neurodegenerativen Erkrankungen sind physiologisch verminderte Tränenvolumina und ein DES häufige Probleme (Demirci et al. 2016) (Tamer et al. 2005) (Kwon et al. 1994) (Bagheri et al. 1994) (McGill et al. 1984). Des Weiteren müssen mögliche medikamentenassoziierte Einflüsse auf die Menge und Zusammensetzung der Tränenflüssigkeit, z. B. durch Betablocker, Diuretika und Kortikosteroide, beachtet werden (Kalkan Akcay et al. 2015) (Lee et al. 2006) (Bergmann et al. 1985) (Almog et al. 1982), insbesondere bei multimorbiden älteren Patienten.

## 2. Material und Methoden

Die vorliegende Promotionsarbeit stellt ein Teilprojekt der „LiX-Studie“ dar, einer im Jahr 2013 gestarteten und aktuell noch laufenden Studie in der Abteilung für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen zur Identifikation von Biomarkern in Patienten mit Parkinson-Syndromen. Im Rahmen dieser Studie werden bei Patienten mit typischen sowie atypischen und sekundären bzw. symptomatischen Parkinson-Syndromen eine erweiterte Anamnese, eine ausführliche klinisch-neurologische Untersuchung (inklusive des motorischen Teils der UPDRS), eine Riechtestung (Sniffin´Sticks®), eine kognitive Testung (*Montreal Cognitive Assessment*, MoCA), ein transtemporaler Hirnparenchymultraschall der Substantia nigra, eine Entnahme von Blut und lumbalem Liquor sowie elektrophysiologische Messungen (Neurographien des N. tibialis und suralis beidseits sowie somatosensibel evozierte Potentiale des N. tibialis beidseits) durchgeführt. Zudem erfolgt die Erhebung verschiedener Fragebögen zur Erfassung von nicht motorischen Symptomen (*Parkinson’s disease-Non-motor symptoms questionnaire*, PD-NMS *questionnaire*) sowie zur Lebens- (*Parkinson’s disease questionnaire-8*, PDQ-8) und zur Schlafqualität (*Parkinson’s disease sleep scale*, PDSS). Nach einem Intervall von einem Jahr erfolgt bei einem Teil der Patienten eine Re-Evaluation der Diagnose und eine *Follow up*-Untersuchung nach demselben Schema (Abb. 3). Seit Juli 2014 erfolgt zudem die Entnahme und biochemische Analyse von Tränenflüssigkeit bei einem Teil der Studienpatienten, deren Daten dieser Promotionsarbeit zugrundeliegen. Das Ziel dieser klinischen Studie ist die Identifikation und Evaluation von möglichen Biomarkern zur Früh- und Differentialdiagnose sowie Verlaufsprogression bei Parkinson-Syndromen und parkinsonähnlichen Erkrankungen im Liquor cerebrospinalis und in der Tränenflüssigkeit sowie deren Korrelation zu demographischen Daten und der durchgeführten Zusatzdiagnostik.

**Abb. 4:** Aufbau der „LiX-Studie“ (eigene Abbildung).

Abkürzungen: UPDRS = *Unified Parkinson’s disease rating scale*, PD-NMS = *Parkinson’s disease-Non-motor symptoms (questionnaire)*, PDQ-8 = *Parkinson’s disease questionnaire-8*, PDSS = *Parkinson’s disease sleep scale*, MoCA = *Montreal Cognitive Assessment*.

## 2.1 Studienkohorte

Über einen Zeitraum von fast einem Jahr, d. h. zwischen Juli 2014 und Mai 2015, erfüllten 36 Patienten mit IPS (26 Männer und 10 Frauen) sowie 18 Kontrollpersonen (im Folgenden als Kontrollen (KTR) bezeichnet, 11 Männer und 7 Frauen) die Einschlusskriterien und willigten in die Teilnahme an der Studie ein. Das mittlere Lebensalter betrug  $66,3 \pm 10,1$  Jahre (von 33 bis 85 Jahren) in der IPS-Kohorte und  $63,4 \pm 12,5$  Jahren (von 45 bis 84 Lebensjahren) in der KTR-Kohorte. Mit einer mittleren Erkrankungsdauer von  $5,6 \pm 4,4$  Jahren (1 bis 23 Jahren) gab es bei den IPS-Patienten einen Trend zu einer minimalen bis leichten Schwere der Erkrankung, welche nach der mHY-Skala graduiert wurde. Die IPS-Patienten zeigten mit einer Punktzahl von  $25,1 \pm 10,5$  Punkten (von 8 bis 53 Punkten) mäßige motorische Beeinträchtigungen, welche unter

Verwendung des dritten (motorischen) Teils der UPDRS quantifiziert wurde (Tab. 2). Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der IPS- und KTR-Studienkohorte in Bezug auf Alter oder Geschlecht ( $p = 0,40$  bzw.  $p = 0,44$ , Student's t-Test).

Im Hinblick auf ophthalmologische Komorbiditäten berichtete in der IPS-Kohorte ein Patient über trockene Augen (2,8 %), zwei Patienten hatten ein Glaukom (5,6 %), zwei weitere Patienten waren mit Katarakten (5,6 %) vordiagnostiziert, von denen ein Patient bereits operiert worden war, und ein weiterer Patient litt an einer Makuladegeneration (2,8 %). In der Kontrollgruppe hatten zwei Patienten ein Glaukom (11,1 %) und zwei weitere Patienten berichteten Katarakte (11,1 %), von denen ebenfalls bereits eine Person operiert worden war (Tab. 2). Auch im Hinblick auf die ophthalmologischen Komorbiditäten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten ( $p = 0,593$  bzw. 1, Fisher's exact test).

Zusätzlich zur IPS- und KTR-Studienkohorte wurde Tränenflüssigkeit auch von einer heterogenen Gruppe von 16 Patienten mit anderen neurodegenerativen Störungen als IPS, wie z. B. atypischen Parkinson-Syndromen, vaskulärem Parkinsonismus und Amyotropher Lateralsklerose, gesammelt. Diese Gruppe wurde in den Nachweis des Gesamtproteoms einbezogen, aber in den Subgruppenanalysen wegen der zu erwartenden hohen Heterogenität der Proteinzusammensetzung nicht weiter analysiert.

**Tab. 2:** Darstellung der demographischen Daten, der ophthalmologischen Komorbiditäten und der Medikamentenanamnese.

	IPS	KTR	p-Wert
<b>Anzahl</b>	36	18	
<b>Geschlecht, männlich (%)</b>	26 (72,2 %)	11 (61,1 %)	ns (0,536 <sup>F</sup> )
<b>Alter</b>			
Mean ± SD, Jahre	66,3 ± 10,1	63,4 ± 12,5	ns (0,401 <sup>S</sup> )
Median (Min.-Max.)	68,0 (33-85)	61,5 (45-84)	
<b>Krankheitsdauer, Jahre</b>			
Mean ± SD	5,6 ± 4,4	NA	
Median (Min.-Max.)	4,5 (1-23)	NA	
<b>Modified Hoehn und Yahr scale</b>			
Mean ± SD	2,0 ± 0,6	NA	
Median (Min.-Max.)	2 (1-3)	NA	
Stadium 1	7 (19,4 %)	NA	
Stadium 1,5	0	NA	
Stadium 2	20 (55,6 %)	NA	
Stadium 2,5	6 (16,7 %)	NA	
Stadium 3	3 (8,3 %)	NA	
Stadium 4	0	NA	
Stadium 5	0	NA	
<b>UPDRS Teil III, Punkte</b>			
Mean ± SD	25,1 ± 10,5	NA	
Median (Min.-Max.)	25 (8-53)	NA	
<b>PD-NMS questionnaire, Punkte</b>			
Mean ± SD	8,4 ± 5,4	NA	
Median (Min.-Max.)	8,5 (0-24)	NA	
<b>Ophthalmologische Komorbiditäten</b>			
Trockene Augen	1 (2,8 %)	0	ns (1 <sup>F</sup> )
Glaukom	2 (5,6 %)	2 (11,1 %)	ns (0,593 <sup>F</sup> )
Katarakt (nicht operiert)	1 (2,8 %)	1 (5,6 %)	ns (1 <sup>F</sup> )
Katarakt (operiert)	1 (2,8 %)	1 (5,6 %)	ns (1 <sup>F</sup> )
Makuladegeneration	1 (2,8 %)	0	ns (1 <sup>F</sup> )

<b>Medikamente* mit möglichen Auswirkungen auf die <i>Lacrima functional unit</i></b>			
Betablocker (lokal)	0	1 (5,6 %)	ns (1 <sup>F</sup> )
Betablocker (systemisch)	9 (25,0 %)	8 (44,4 %)	ns (0,215 <sup>F</sup> )
Diuretika	6 (16,7 %)	2 (11,1 %)	ns (0,704 <sup>F</sup> )
Kortikosteroide	0	2 (11,1 %)	ns (0,107 <sup>F</sup> )
Prostaglandinanaloga	1 (2,8 %)	1 (5,6 %)	ns (1 <sup>F</sup> )
Karboanhydrase-Inhibitoren	1 (2,8 %)	0	ns (1 <sup>F</sup> )
Anticholinergika	1 (2,8 %)	0	ns (1 <sup>F</sup> )
Antidepressiva	3 (8,3 %)	3 (16,7 %)	ns (0,388 <sup>F</sup> )
Neuroleptika	2 (5,6 %)	0	ns (0,547 <sup>F</sup> )

Abkürzungen: IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom, KTR = Kontrollen, NA = *not applicable*, SD = *standard deviation*, UPDRS = *Unified Parkinson's disease rating scale*, PD-NMS questionnaire = *Parkinson's disease-Non-motor symptoms questionnaire*.

\* Einige Patienten haben mehr als ein Medikament eingenommen

<sup>F</sup> Fisher's exact test

<sup>S</sup> Student's t-Test

## 2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In diese klinische Studie wurden Patienten mit der Verdachtsdiagnose oder klinisch gesicherter Diagnose eines IPS eingeschlossen, welche sich ambulant oder stationär zwischen Juli 2014 und Mai 2015 in der Abteilung für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen vorstellten. Die Diagnose wurde anhand des mehrstufigen Schemas der *United Kingdom Parkinson's disease Society Brain Bank* (UKPDBB)-Kriterien (Gibb und Lees 1988) gestellt bzw. bestätigt. Im Verlauf erfolgte zudem eine Re-Evaluation der Diagnose anhand der, zum Zeitpunkt der Studie neu veröffentlichten, international etablierten Diagnosekriterien der *Movement Disorder Society* (Postuma et al. 2015). Die Diagnose wurde durch einen oder mehrere Experten für Bewegungsstörungen validiert.

Im Hinblick auf die KTR-Kohorte wurden Patienten eingeschlossen, welche keine Symptome für eine neurodegenerative Erkrankung aufwiesen und sich aus anderen Gründen, wie z. B. chronischen Kopfschmerzen oder Schwindel, vorstellten.

Alle Studienteilnehmer wurden auf systemische oder lokale bzw. ophthalmologische Ausschlusskriterien untersucht. Es wurden folgende Ausschlusskriterien angewandt: Alter von weniger als 30 Lebensjahren, eine Anamnese mit plötzlichem Auftreten von Parkinson-Symptomen (Hinweis auf vaskuläre Genese), vorbekannte hämatologische oder neoplastische Erkrankungen, Alkoholabhängigkeit, akute oder chronische systemische Infektionen sowie Leber- oder Nierenversagen innerhalb der letzten 6 Monate. Patienten mit einer aktiven, erregerbedingten Augeninfektion oder anderweitigen Entzündungszeichen der Augen, Allergien mit Beteiligung der Augen, Verwendung von Kontaktlinsen sowie einer Augenoperationen innerhalb der letzten 3 Monate wurden ebenfalls von der Studie ausgeschlossen.

### **2.3 Sammlung der Tränenflüssigkeitsproben**

Für die Kollektion der Proben wurde zuvor die Zustimmung von der Ethikkommission von der Universitätsmedizin Göttingen eingeholt, welche unter der Vorgangsnummer 13/11/12 archiviert ist. Die Probenentnahme entsprach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Alle Probanden haben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung in die Studie und Probenkollektion gegeben. Alle Spender waren ambulante oder stationäre Patienten in der Abteilung für Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen.

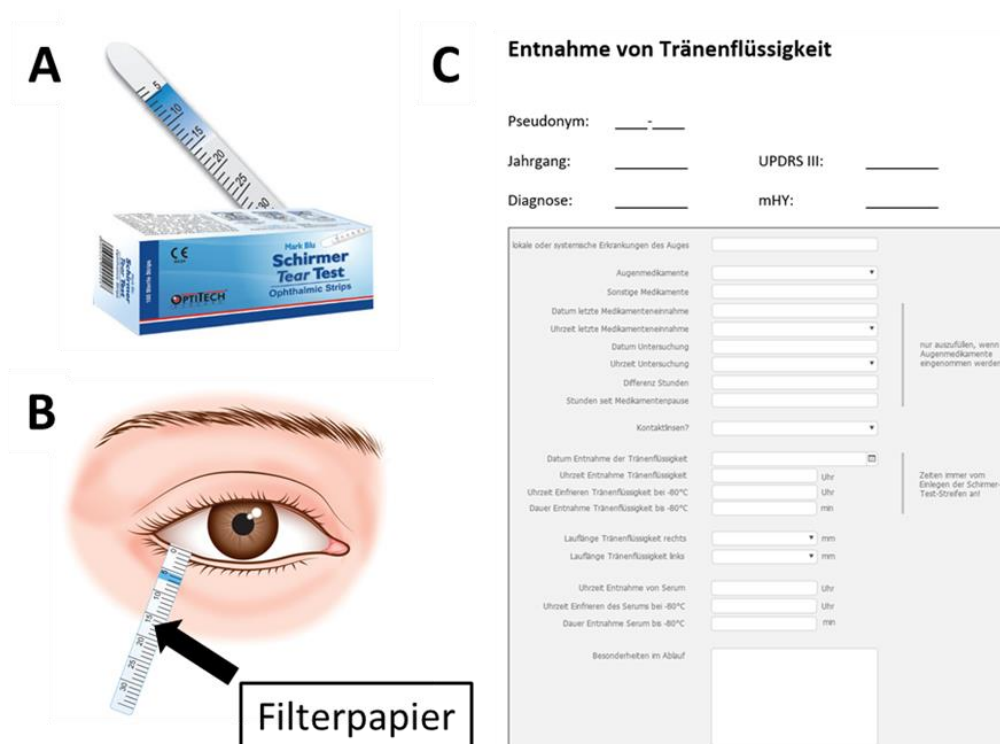
Die Probenentnahme im Rahmen dieser Promotionsarbeit erfolgte mittels Schirmer-Teststreifen der Marke OptiTech EyeCare Mark Blu© Schirmer Tear Test Ophthalmic Strips von der Firma Tarun Enterprises (Abb. 5A) nach Angaben und Empfehlungen des Herstellers sowie international etabliertem Standard für den Schirmer-Sekretionstest: Im ersten Schritt erfolgte bei jedem Studienteilnehmer eine gründliche Anamnese und klinische Beurteilung des vorderen Augenabschnitts (u. a. Auffälligkeiten der Konjunktiven und Lidränder) hinsichtlich möglicher Ausschlusskriterien. Danach wurde die Tränenflüssigkeit



vom unteren Meniskus beider Augen gesammelt: Hierzu wurde ein steriler Filterpapierstreifen (Abmessungen ca. 5 x 35 mm) etwa 2 bis 3 mm vom lateralen Augenwinkel in den unteren Augenliddeckel von beiden Augen eingelegt (Abb. 5B). Der Untersucher trägt hierbei Handschuhe. Es wurde standardisiert mit dem rechten Auge begonnen. Die Tränenflüssigkeit wurde nun von den Schirmer-Teststreifen aufgesogen. Die alkalische Tränenflüssigkeit verfärbt den mit Coomasie-Blau vorgefärbten Teststreifen blau. Da der Teststreifen die Bindehaut reizt, wurde hiermit sowohl die Basis- als auch in gewissem Maße die Reizsekretion bestimmt, da zur isolierten Beurteilung der Basissekretion die Bindehaut vor dem Test hätte anästhesiert werden müssen. Hierauf wurde jedoch aufgrund möglicher Kontaminationen durch chemische Bestandteile eines Lokalanästhetikums verzichtet. Zudem wurde jede Anstrengung unternommen das Augengewebe nicht zu verletzen, da hierdurch auch eine zusätzliche Tränen- bzw. Reizsekretion hätte induziert werden können (Anmerkung: die Reizsekretion besitzt z. B. einen höheren Wasseranteil, der u. a. zu noch geringeren Konzentrationen bereits gering vorhandener Proteine hätte führen können, welche dann unter die Nachweisbarkeitsgrenze der angewandten MS-Methodik gefallen wären). Auch auf eine zusätzliche Provokation zur Steigerung der Menge an Tränenflüssigkeit wurde aufgrund von möglichen Verunreinigungen und möglicher Änderungen in der Zusammensetzung des Proteoms verzichtet, obwohl laut Literaturangaben geringere Tränenvolumina bei älteren Patienten und Patienten mit einem IPS vorliegen können. Um eine Heterogenität in der Probenkollektion zu vermeiden, wurden alle Messungen im selben Zeitintervall (von 09:00 bis 14:00 Uhr), bei einer definierten Temperatur (20 bis 25 °C) und bei einer konstanten relativen Luftfeuchtigkeit (35 bis 45 %) durchgeführt. Nach einem definierten und für alle Studienteilnehmer gleichen Zeitraum von fünf Minuten wurden die Teststreifen, beginnend mit der rechten Seite, wieder entfernt. Nach Ablesen des blau markierten Anteils des Filterpapierstreifens, welcher die Lauflänge der Tränenflüssigkeit anzeigt, wurden die Teststreifen sofort in zuvor sterilisierte 2 ml-Polypropylen-Röhrchen (*tubes*) der Firma Eppendorf eingelegt, verschlossen und innerhalb von maximal 10 min bei -80 °C in einem Gefrierschrank tiefgefroren. Im Anschluss wurde die Lauflänge der Tränenflüssigkeit, die Anamnese bezüglich relevanter Augenerkrankungen und Vor-Operationen sowie Art und Zeit der Applikation von

Augenmedikamenten auf einem standardisierten Dokumentationsbogen notiert (Abb. 5C). Der hier aufgeführte Arbeitsablauf wurde, nach ausführlicher Einweisung und unter regelmäßigen Kontrollen, z. T. durch medizinisches Hilfspersonal (u. a. Studienassistentinnen) durchgeführt.

**Abb. 5:** Schema der Entnahme von Tränenflüssigkeit in dieser Dissertation. **A:** Abbildung der verwendeten OptiTech EyeCare Mark Blu© Schirmer Tear Test Ophthalmic Strips von der Herstellerfirma Tarun Enterprises aus Allahabad in Indien. **B:** Darstellung der korrekten Lage der Schirmer-Teststreifen im unteren äußeren Augenlid am Beispiel des rechten Auges (eigene Abbildung, erstellt und modifiziert unter Mitarbeit des Elsevier Verlags). **C:** Abbildung des standardisierten Dokumentationsbogens für die Entnahme von Tränenflüssigkeit.



## 2.4 Anamnese, klinisch-neurologische Untersuchung und Fragebögen

Die ausführliche Anamnese und klinisch-neurologische Untersuchung der IPS-Patienten erfolgte durch mindestens einen, in der Regel jedoch mehrere Spezialisten für Bewegungsstörungen mit mehrjähriger Erfahrung. Die Diagnose basierte, wie bereits weiter oben aufgeführt, auf den international etablierten UKPDBB-Kriterien (Gibb und Lees 1988) und entsprach auch den im Verlauf

veröffentlichten klinischen Richtlinien der Movement Disorder Society (Postuma et al. 2015). Die demographischen Daten eines jeden Patienten, einschließlich Alter bei Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer, Medikation und relevanter Komorbiditäten, wurden aufgezeichnet. Neben der klinischen Charakterisierung wurden zudem grundlegende Labortests, ein transkranieller Ultraschall der Substantia nigra, Nervenmessungen, Tests der kognitiven und olfaktorischen Funktion sowie eine Liquoranalyse durchgeführt, um die gestellte Diagnose durch Zusatzdiagnostik zu verifizieren bzw. andere Ursachen für das vorliegende Parkinson-Syndrom zu erfassen. Zur Beurteilung von nicht motorischen Beeinträchtigungen, welche nur eingeschränkt durch eine körperliche Untersuchung hätten erkannt werden können, wurde zusätzlich der PD-NMS *questionnaire* (Chaudhuri et al. 2006) implementiert, einem Fragebogen zur Selbstauskunft vegetativer Störungen. In unklaren Fällen der Parkinson-Symptomatik wurde zudem eine strukturelle oder funktionelle bzw. nuklearmedizinische Bildgebung des Neurokraniums durchgeführt, um andere Ursachen extrapyramidaler Zeichen abzuklären.

Die Beurteilung der Kontrollpersonen umfasste die Erhebung der demographischen Daten, der Anamnese und der aktuellen Medikation.

### **2.5 Ablauf der *Bottom-up*-LC-ESI-MS/MS-Proteomanalyse**

Als Vorbereitung für die massenspektrometrische Analyse wurden die tiefgefrorenen Schirmer-Teststreifen in 300 µl einer sogenannten Dulbecco's phosphatgepufferten Kochsalzlösung (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, Missouri, USA) eingeweicht und über Nacht bei 4 °C unter ständiger Bewegung in einem Kreisschüttler (KS250 Basic© Intellimixer; Kika Labortechnik, Köln, Deutschland) extrahiert. Im Anschluss erfolgte dann eine Quantifizierung der Proteine in den Extrakten unter Verwendung eines Bicinchoninsäure (BCA)-Tests (Pierce© *BCA protein assay kit*; Thermo Scientific, Rockford, Illinois, USA).

Der im Folgenden aufgezeigte massenspektrometrische Arbeitsablauf eines *Shotgun proteomics*- bzw. *Bottom-up proteomics*-Verfahren wurde durch Dr. rer. nat. und Dipl.-Biol. Sebastian Funke aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Franz Grus aus der Experimentellen Ophthalmologie in der

Abteilung für Ophthalmologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt und konnte bereits für verschiedene Tränenproben in unterschiedlichen Krankheiten und durch mehrere Arbeitsgruppen erfolgreich etabliert werden (Funke et al. 2017) (Funke et al. 2016b) (Funke et al. 2016a).

Aufgrund der Durchführung im Rahmen einer Pilotstudie und der geringen Probenmengen wurden repräsentative *Pool*-Proben erzeugt, welche gleiche Teile der Proteinmenge aus den Extrakten der Schirmer-Teststreifen vom rechten und linken Auge enthielten. Für jede der vier experimentellen Gruppen, d. h. „idiopathisches Parkinson-Syndrom“, „Kontrollen“, „atypische Parkinson-Syndrome“ und „sonstige neurodegenerative Erkrankungen“, wurden vier identische *pools*, d. h. technische Replikate, für die *Bottom-up-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry* (*Bottom-up-LC-ESI-MS/MS* bzw. BULCMS)-Analyse vorbereitet, welche jeweils 50 µg des Tränenproteingehaltes aus den Extrakten enthielten.

Als Vorbereitung für die weitere massenspektrometrische Analyse erfolgte im ersten Schritt die Auftrennung der Tränenproteine in den *pools* mit leichter Abwandlung zur bewährten 1-D-SDS-PAGE (Funke et al. 2012): Die einzelnen *Pool*-Proben wurden zunächst in einem Vakuum auf das geeignete Ladevolumen konzentriert bzw. reduziert, dann mit Lithiumdodecylsulfat (LDS)-Probenpuffer vermischt und für 10 Minuten bei 90 °C erhitzt. Die Verwendung von LDS anstelle von SDS erfolgte, da LDS bei niedrigen Temperaturen besser löslich ist und keine Kristalle bildet. Hierdurch sollte die Qualität der Bandenmuster deutlich optimiert werden. LDS entfaltet die Proteinmoleküle und heftet sich dann unter Abspaltung von Lithium an die einzelnen Aminosäureketten an, sodass diese eine negative Ladung erhalten. Die Bindung von LDS an die Proteine erfolgt in einem immer gleichen Verhältnis, sodass die Gesamtladung dann der Masse des Moleküls entspricht. Als Matrize wurde ein vorgefertigtes Gel aus Polyacrylamid (WedgeWells©) mit Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan (BisTris) in einer Konzentration von 12 % als alleinige Puffersubstanz verwendet (NuPAGE© Novex©; Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA). Die Verwendung von BisTris als Pufferlösung bietet den Vorteil, dass aufgrund des neutralen pH-Wertes etwaige Proteinmodifikationen minimiert werden. Zudem „laufen“

niedermolekulare Proteine zum Ende des Gels nicht schneller, wodurch das Auflösungsvermögen des Gels nochmals verbessert wird. Die eigentliche Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte dann mittels Elektrophorese bei 150 Volt unter Verwendung von 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure als Pufferlösung (Invitrogen). Am Ende der Elektrophorese lagen alle Proteine der Größe nach sortiert vor. Unter Verwendung des Novex® Colloidal Blue staining kit (Invitrogen) wurden die Proteine dann mittels Coomassie-Brillant-Blau angefärbt. Jedes Bandenmuster entsprach hierbei einem technischem Replikat. Die insgesamt 16 Bandenmuster wurden dann jeweils in 17 Massenabschnitte unterteilt (Abb. 9), welche für einen *In-gel*-Trypsinverdau unter Verwendung eines modifizierten Protokolls von Shevchenkov et al. (Shevchenko et al. 2007) vorgesehen waren: Die einzelnen Gel-Massenabschnitte wurden hierzu zerteilt, entfärbt, dehydratisiert sowie mittels 100 µl Trypsin (15 ng/µl) (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA) verdaut und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Entfernung der Puffersalze aus dem Peptidgemisch wurde eine Festphasenextraktion mit C<sub>18</sub>-Harz mittels ZipTip®-Protokoll durchgeführt (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) (u. a. 20 Bindungszyklen, drei Waschzyklen mit 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) und zwei Elutions-Zyklen mit 50 % Acetonitril (ACN)/0,1 % TFA). Das Peptidgemisch wurde dann gefriergetrocknet und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse zwischengelagert. Die weitere Auftrennung des Peptidgemisches zur Injektion in das Massenspektrometer erfolgte dann mittels LC nach einem modifizierten Protokoll von Funke et al. (Funke et al. 2012): Zunächst wurde das gefriergetrocknete Peptidgemisch in 10 µl einer 0,1 %-igen TFA resolubilisiert. Das *Reversed Phase*(RP)-Säulensystem setzte sich aus einer BioBasic® C18-Vorsäule (30 × 0,5 mm), einer BioBasic® C18-Analysesäule (150 × 0,5 mm) (Thermo Scientific) und einem vorgeschalteten A 316 online-Vorsäulenfilter mit 0,5 µm Durchmesser (Upchurch Scientific, Washington D.C., USA) zusammen. Die maximale Flussrate der verwendeten Rheos Allegro® Pumpe (Thermo Scientific) wurde auf einen Kapillarfluss von  $6,7 \pm 0,03$  µl/min eingestellt. Der Elutionspuffer A setzte sich aus 98 % H<sub>2</sub>O, 1,94 % ACN, 0,06 % Methanol und 0,05 % Ameisensäure zusammen. Der Elutionspuffer B beinhaltete 95 % ACN, 3 % Methanol, 2 % H<sub>2</sub>O und 0,05 % Ameisensäure. Für jeden Gel-Massenabschnitt wurde ein 50-minütiger Gradient verwendet (0 - 2 min: 15 - 20 %, 2 - 10 min: 20 - 30 %, 10 - 15 min: 30 - 40 %, 15 - 20 min: 40 - 50 %, 20 - 25 min: 50 - 60 %, 25 - 30 min: 60 - 70 %, 30 - 35 min: 70 - 80 %, 35 - 40 min: 80 - 90 %, 40 - 45 min: 90 - 95 %, 45 - 50 min: 95 - 100 %).

2 - 35 min: 20 - 60 %, 35 - 40 min: 60 - 100 %, 40 - 45 min: 100 - 0 %, 45 - 50 min: 0 %). Pro Versuch wurden 5 µg/l Peptidlösung in ein LTQ Orbitrap XL®-Massenspektrometer (Thermo Scientific) unter Verwendung einer ESI-Metallnadel mit niedrigem Durchfluss eingeführt. Die Probeninjektion wurde durch einen *Sample*-Roboter (CTC Analytics, Zwingen, Basel-Landschaft, Schweiz) realisiert, wobei die Proben randomisiert injiziert wurden, jeweils unterteilt durch Waschinjektionen mittels 80 %-iger ACN-Lösung. Das LC-ESI-MS/MS-System wurde von XCalibur® 2.0.7 SP1 (Thermo Scientific) gesteuert. Die folgenden Einstellungen wurden hierfür verwendet: Die *Orbitrap* hatte einen Scanbereich von 300 - 2000 m/z (positiver Modus) und die Fragmentierung erfolgte in der *ion trap* durch *collision induced decay* mittels Helium mit einer Auflösung von 30.000. Das System wurde extern durch eine Pierce® LTQ ESI *positive ion*-Kalibrierlösung (Thermo Scientific) und intern durch eine sogenannte *Lock*-Massen-Kalibrierungsstrategie justiert (Olsen et al. 2005).

Die Rohdaten wurden dann mit der Software MaxQuant® in der Version 1.4.1.2 (Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, München; <http://www.maxquant.org>) aufgearbeitet. Hierzu erfolgte eine Proteinquantifizierung durch markierungsfreie Quantifizierung (*label-free quantification*, LFQ), einem Verfahren bei dem die Signalintensitäten korrespondierender Peptide zwischen verschiedenen Messungen zur Abschätzung der relativen Mengenverhältnisse eines Proteins verglichen werden, da ein direkter Zusammenhang zwischen der Signalintensität und der Analytkonzentration in der Probe besteht. Vor der Proteinquantifizierung mittels LFQ mussten die Signalintensitäten zuvor „normalisiert“ werden, d. h. es wurden u. a. unterschiedliche Retentionszeiten zwischen den einzelnen Messungen angeglichen (*normalized LFQ intensities*). Es wurden folgende Einstellungen angewandt: Massentoleranzpeptid = ± 30 ppm, Fragment = ± 0,5 Da, Enzym = Trypsin (zwei fehlende Spaltungen erlaubt), Modifikationen = Oxidation und Acetylierung (Protein N-Term) (variabel) sowie Carbamidomethylierung (fest). Über die integrierte Andromeda-Suchmaschine erfolgte ein Abgleich mit den hinterlegten Proteinsequenzen in der humanen SWISS-PROT®-Datenbank (SwissProt\_111101, Homo sapiens, 533049 Sequenzen, 189064225 Reste) zur Proteinidentifikation. Für die Analyse wurden ausschließlich Peptide und Proteine

betrachtet, die eine *False discovery rate* (FDR)  $< 1\%$  aufwiesen (weitere Einstellungen:  $\geq 6$  Aminosäurereste, nur *unique* und *razor peptides*).

Die statistische Aufarbeitung erfolgte unter Verwendung der Software STATISTICA® in der Version 10 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA). Die Normalverteilung der massenspektrometrischen Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test getestet: Je nach Verteilung wurden parametrische (*one-way ANOVA*) und nicht-parametrische (Kruskal-Wallis-Test) univariate Strategien verwendet. Da der Fokus auf dem Vergleich der IPS- und KTR-Gruppe lag, wurden die beiden Gruppen zusätzlich durch Student's t-Test (bei Normalverteilung) oder Mann-Whitney-U-Test (bei nicht normaler Verteilung) analysiert. Es wurden nur solche LFQ-Intensitäten für die weitere Analyse in Betracht gezogen, welche vergleichbare Tendenzen in den *Raw*-Intensitäten zeigten. LFQ-Nullwerte wurden exkludiert. Exklusives Vorhandensein eines Proteins oder das absolute Fehlen eines Proteins wurde, basierend auf den *Raw*-Intensitäten, untersucht. Für den Vergleich der einzelnen Datenreihen wurde Venny® in der Version 2.1.0 eingesetzt (<http://www.bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>) (Oliveros 2007).

## 2.6 Bioinformatische und statistische Analysen

Die bioinformatische und statistische Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Anna Roser, aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Paul Lingor, und Dr. rer. nat. Andreas Leha aus der Medizinischen Biometrie und Statistischen Bioinformatik in der Abteilung für Medizinische Statistik der Universität Göttingen. Für funktionelle Annotationen zu Genontologie (*gene ontology*, GO)-Begriffen wurde Cytoscape® in der Version 2.8.3 (Smoot et al. 2011) mit integriertem BINGO® 2.44 Plugin und DAVID® in der Version 6.8 (Huang et al. 2009) benutzt. Hierfür wurde das Modul für funktionelle Annotationen für GO-biologische Prozesstermini mit einem EASE-Wert von 0,1 und einer Mindestanzahl von zwei Zählungen angewendet. Für die Analyse von Protein-Protein-Interaktions (PPI)-Netzwerken wurde STRING® in der Version 10.5 (Szklarczyk et al. 2017) mit einem minimal erforderlichen Interaktions-Score von 0,4 verwendet. Gruppenvergleiche erfolgten unter Verwendung eines Student's t-Tests oder eines zweiseitigen Fisher's exact test.

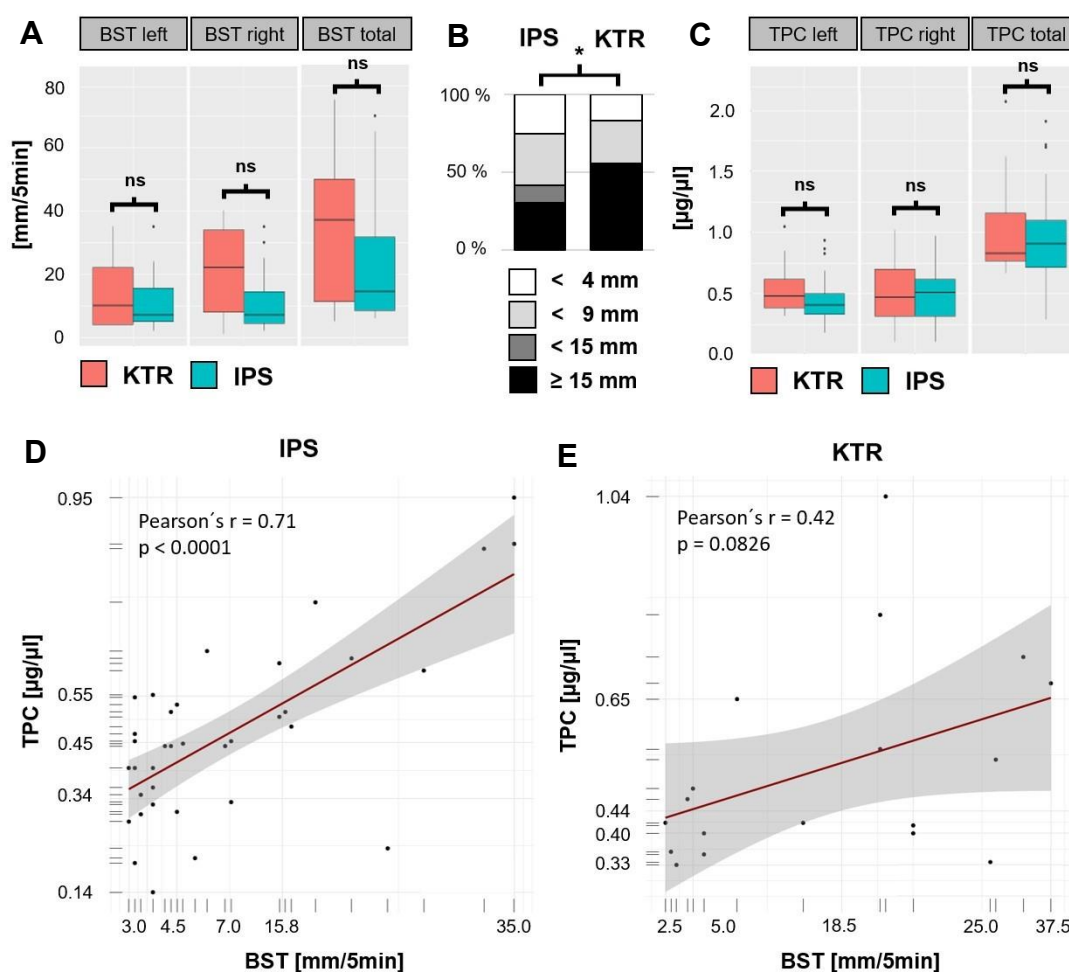
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Bewertung der Tränenvolumina und der Tränenproteinkonzentrationen

Das sekretierte Tränenvolumen ist ein bekannter Faktor, welcher u. a. die Tränenproteinkonzentration beeinflussen kann: Je mehr Tränenflüssigkeit sekretiert wird, desto geringer ist die Konzentration der einzelnen Proteine. Bei Patienten mit einem IPS wurde zuvor gezeigt, dass reduzierte Tränenvolumina vorliegen können (Bagheri et al. 1994). Wir haben daher zunächst die Tränenvolumina und die Gesamtkonzentration der Tränenproteine innerhalb der Studienkohorte analysiert: Der Basis-Sekretionstest (*basic secretion test*, BST), definiert als die maximale Lauflänge der Tränenflüssigkeit innerhalb von 5 Minuten, zeigte in der IPS-Kohorte mit einer mittleren Lauflänge von  $11,31 \pm 9,33$  mm/5 min einen Trend zu reduzierten Lauflängen im Vergleich zu  $17,11 \pm 12,06$  mm/5 min in der KTR-Gruppe ( $p = 0,092$ , Student's t-Test) (Abb. 6A). In der IPS-Gruppe zeigten zudem 49 von 70 (= 70 %) der Schirmer-Teststreifen eine Lauflänge von  $< 15$  mm/5 min, was als pathologisch reduzierte Lauflänge definiert ist, während nur 16 von 34 (= 47,06 %) der Teststreifen in der KTR-Kohorte unterhalb des normalen Bereichs lagen ( $p = 0,03$ , Fisher's exact test) (Abb. 6B). Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtproteinkonzentration (*total protein concentration*, kurz TPC) in der Tränenflüssigkeit von IPS- versus KTR-Patienten, welche mit einem BCA assay gemessen wurde ( $0,48 \pm 0,2$  µg/µl bei IPS und  $0,51 \pm 0,22$  µg/ml bei KTR,  $p = 0,379$ , Student's t-test) (Abb. 6C). Die Korrelationsanalyse zeigte eine starke positive Korrelation von BST- zu TPC-Werten in der IPS-Kohorte (Pearson's  $r$  ( $\rho$ ) = 0,71,  $p < 0,0001$ ) (Abb. 6D) und einen Trend für eine moderate Korrelation bei den KTR-Patienten ( $\rho = 0,42$ ,  $p = 0,0826$ ) (Abb. 6E).



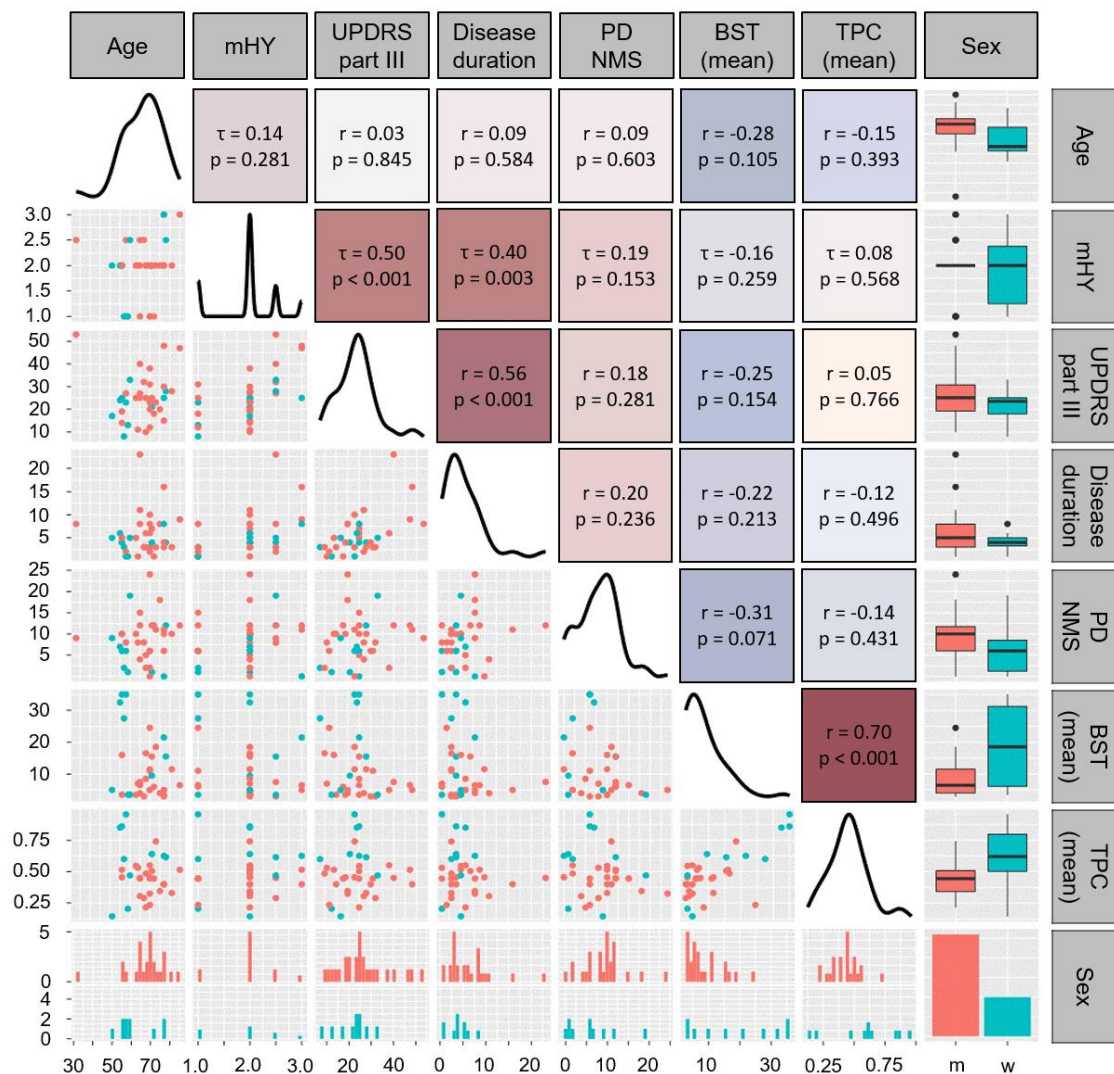
**Abb. 6:** Statistische Analysen von Tränenvolumina und Tränenproteinkonzentrationen. **A:** Die BST-Werte zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen IPS und KTR, aber einen klaren Trend zu reduzierten Tränenvolumina in der IPS-Kohorte (Student's t-Test). **B:** Im BST wiesen 70 % der IPS-Patienten Werte von  $< 15$  mm/5 min im Vergleich zu nur 47,06 % in der KTR-Kohorte auf (\*,  $p < 0,05$ , Fisher's exact test). **C:** Die TPC ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen IPS und KTR (Student's t-Test). **D:** Die Korrelationsanalyse von BST- zu TPC-Werten zeigte eine signifikante und hohe positive Korrelation in der IPS-Patientenkohorte ( $\rho = 0,71$ ,  $p < 0,0001$ ). **E:** In der KTR-Studienkohorte konnte nur ein Trend für eine mittlere positive Korrelation von BST- zu TPC-Werten nachgewiesen werden ( $\rho = 0,42$ ,  $p < 0,0826$ ) (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).



Abkürzungen: BST = *basic secretion test*, IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom, KTR = Kontrollen, TPC = *total protein concentration*.

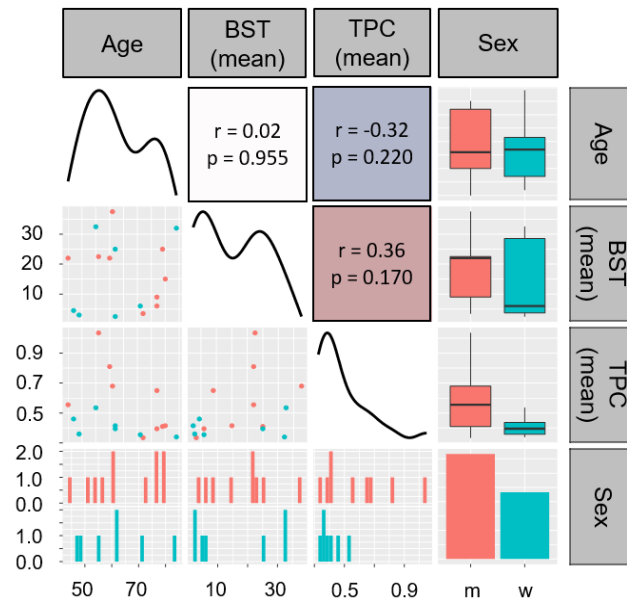
Daraufhin analysierten wir die Korrelationen von BST- und TPC-Werten zu verschiedenen demographischen und klinischen Parametern (u. a. Alter, Krankheitsdauer, Stadium nach der mHY-Skala, UPDRS Teil III (motorischer Teil) und PD-NMS *questionnaire*), welche im Rahmen der Studienvisite erhoben wurden. Erwartungsgemäß beobachteten wir signifikante positive Korrelationen zwischen UPDRS Teil III und Krankheitsdauer ( $\rho = 0,56$ ,  $p < 0,001$ ) sowie mHY *scale* zu Krankheitsdauer ( $\tau = 0,40$ ,  $p = 0,003$ ) und zu UPDRS Teil III ( $\tau = 0,5$ ,  $p < 0,001$ ). Es zeigte sich zudem ein Trend für eine moderate negative Korrelation von BST zu den Punktwerten im PD-NMS *questionnaire* ( $\rho = -0,31$ ,  $p = 0,071$ ). Darüber hinaus korrelierten die BST- und TPC-Werte jedoch nicht signifikant mit anderen klinischen oder demographischen Parametern in der IPS-Kohorte (Abb. 7). Interessanterweise gab es in der KTR-Gruppe keine signifikanten Korrelationen zwischen Alter sowie BST- oder TPC-Werten entgegen einiger Literaturangaben (Abb. 8).

**Abb. 7:** Korrelationsanalysen von Alter, mHY scale, UPDRS Teil III (motorischer Teil), Krankheitsdauer, PD-NMS *questionnaire* sowie BST- und TPC-Werten in der IPS-Studienkohorte (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).



Abkürzungen: BST = *basic secretion test*, mHY = *modified Hoehn and Yahr (scale)*,  $r$  = Pearson's  $\rho$ ,  $\tau$  = Kendall's tau, TPC = *total protein concentration*, UPDRS = *Unified Parkinson's disease rating scale*, PD = *Parkinson's disease*, PD-NMS = *Parkinson's disease-Non-motor symptoms (questionnaire)*.

**Abb. 8:** Korrelationsanalysen von Alter sowie BST- und TPC-Werten in der KTR-Kohorte (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).

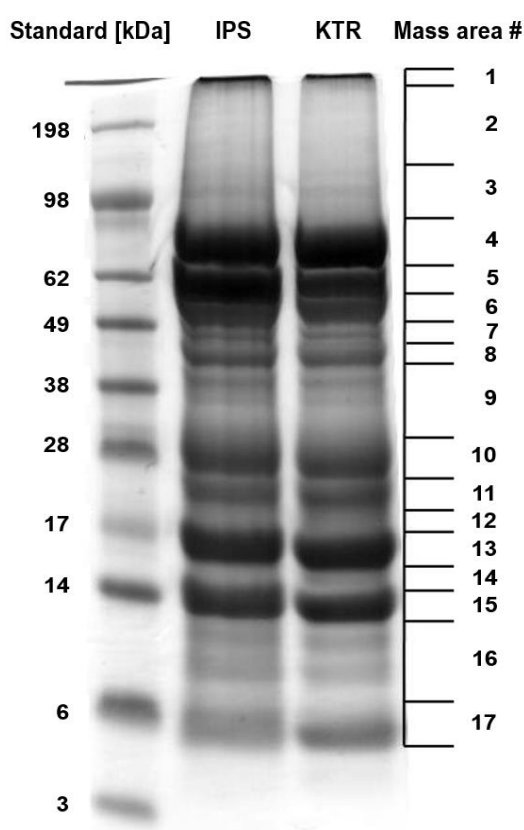


Abkürzungen: BST = *basic secretion test*,  $r$  = Pearson's  $\rho$ , TPC = *total protein concentration*.

### 3.2 Bottom-up-LC-MS/MS-Analyse

Die modifizierte 1-D-SDS-PAGE führte zu einem qualitativ hochwertigen Migrationsmuster der Tränenproteine (Abb. 9).

**Abb. 9:** Beispielhaftes Massenmigrationsmuster von gepoolten Tränenproben der IPS- und KTR-Patienten mittels modifizierter 1-D-SDS-PAGE. Die Massenfläche „#“ stellt das Gelschnittmuster dar, welches für den *In-gel*-Trypsinverdau verwendet wurde (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).



Abkürzungen: IPS = Idiopathisches Parkinson-Syndrom, KTR = Kontrollen.

Unter selektiven (stringenten) Bedingungen (FDR < 1 %) innerhalb der Datenbankrecherche konnten insgesamt 571 Tränenproteine identifiziert werden, wobei eine hohe Kongruenz mit vorherigen Tränenproteomstudien nachgewiesen werden konnte (Funke et al. 2016a) (Zhou et al. 2012) (de Souza et al. 2006). Mit univariaten Statistiken konnten mehrere

gruppenspezifische Veränderungen im Tränenproteom von beiden Studienkohorten beobachtet werden: Eine Summe von 31 Proteinen wurde ausschließlich in der IPS-Gruppe identifiziert, während 7 Proteine in der IPS-Kohorte nicht identifiziert werden konnten, jedoch ausschließlich in der KTR-Gruppe nachgewiesen wurden (Ergänzende Tab. A1 und A2). Im Vergleich zwischen den Kohorten waren 21 Proteine in der IPS-Kohorte signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ), während 11 weitere Proteine tendenziell erhöht ( $p < 0,1$ ) und 19 Proteine signifikant verringert ( $p < 0,05$ ) waren (Ergänzende Tab. A3 und A4).

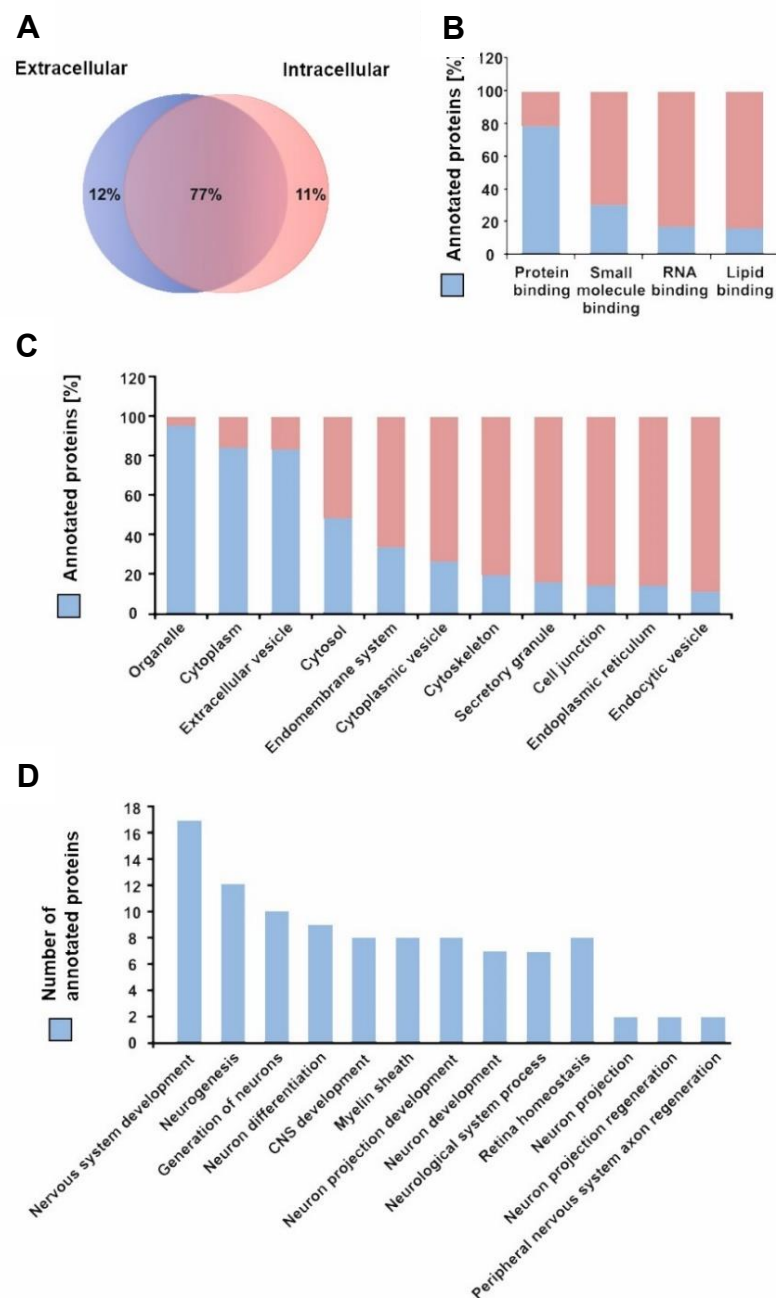
### **3.3 Funktionelle Annotationsanalysen in *gene ontology* und Protein-Protein-Interaktionsanalysen in STRING©**

Um die Rolle der differentiell regulierten Proteine im biologischen Kontext zu verstehen, führten wir funktionelle Annotationsanalysen in GO mit Cytoscape© und DAVID© durch. Zur Analyse und Visualisierung von PPI-Netzwerken wurde die STRING©-Plattform verwendet.

Gemäß einer Analyse in Cytoscape© waren 93 % der differentiell regulierten Proteine (d. h. abwesend, exklusiv oder fehlreguliert) in der IPS-Gruppe mit verschiedenen Zellkompartiment-Begriffen assoziiert: Mit 77 % konnte eine große Mehrheit der differentiell exprimierten Proteine sowohl im extra- als auch im intrazellulären Kompartiment lokalisiert werden, während nur 12 % der Proteine ausschließlich im extrazellulären und 11 % isoliert im intrazellulären Raum vorlagen (Abb. 10A). Eine molekulare Funktionsanalyse konnte insgesamt 92 % der differentiell exprimierten Proteine mit verschiedenen molekularen Funktionstermini verbinden, von denen die meisten mit Proteinbindungsfunktionen assoziiert waren (Abb. 10B). Im Hinblick auf eine Zuordnung zu den Zellkompartimenten ergab sich eine Herkunft nahezu aller Proteine aus Organellen (> 90 %), Zytoplasma (> 80 %) oder extrazellulären Vesikeln (> 80 %) (Abb. 10C). Etwa 40 % der IPS-defizienten Proteine konnten mit neuronalen Funktionen in Verbindung gebracht werden (Abb. 10D): Hiervon waren sieben Proteine (Prolin-reiches Protein 4 [PRR4], Serotransferrin [TF], Immunoglobulin kappa constant [IGKC], Zymogengranulat-Protein 16 Homolog B [ZG16B], Beta-2-Mikroglobulin [B2M], Immunoglobulin Alpha-2-Kette C-Region [IGHA2] und Lactotransferrin [LTF]) mit der Retina und weitere acht Proteine

(Actin-verwandtes Protein 2 [ACTR1A], Hitzeschockprotein HSP 90-alpha [HSP90AA1], Gelsolin [GSN], WD Repeat-Containing Protein 1 [WDR1], Carboanhydrase 2 [CA2] und 13 [CA13], Myosin-14 [MYH14] und Ezrin [EZR]) mit der Myelinscheide assoziiert. Interessanterweise konnte auch die IPS-assoziierte Protein-Deglycase DJ-1 [PARK7] mit etwas höheren Werten sowohl in der IPS- als auch innerhalb der KTR-Kohorte detektiert werden. Die erhöhten Werte in der IPS-Kohorte waren jedoch nicht signifikant verändert.

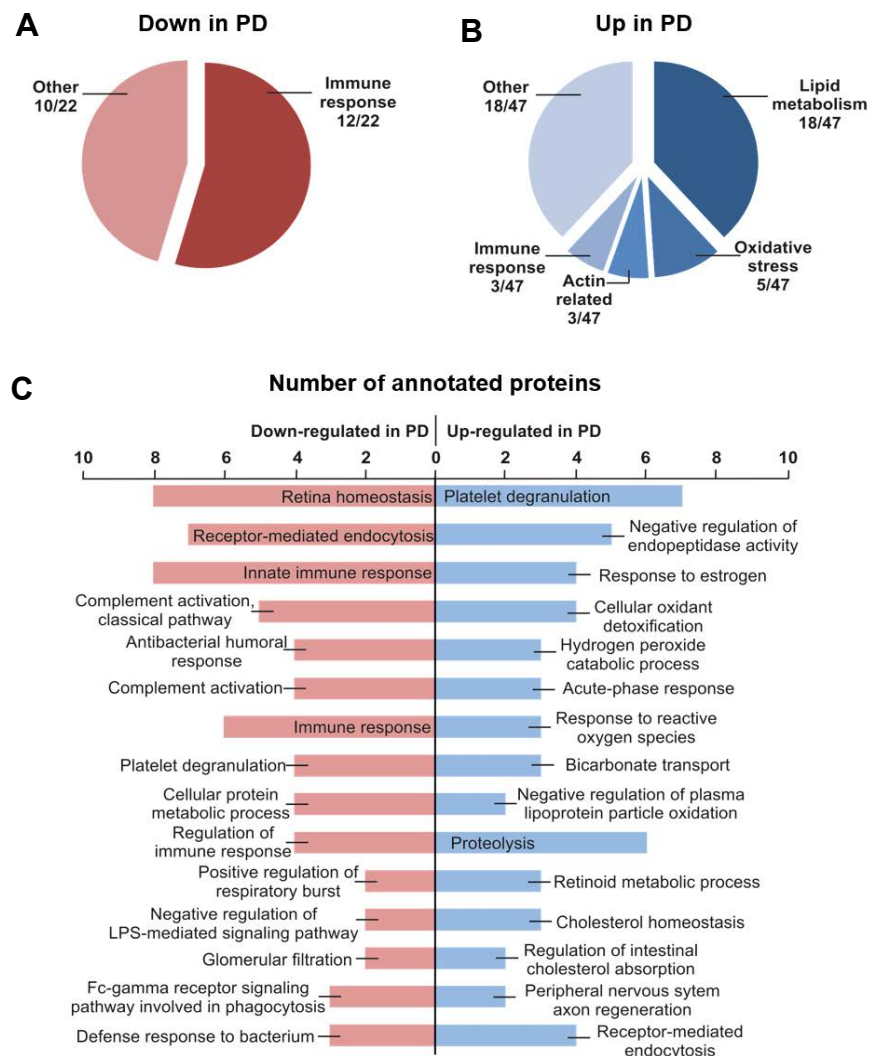
**Abb. 10:** Darstellung der funktionellen Zuordnung der differentiell exprimierten Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten zu verschiedenen GO-Begriffen. **A:** Venn-Diagramm mit Zuordnung zum extra- oder intrazellulären Kompartiment. **B:** GO-Analyse mit Zuordnung zur molekularen Funktion. **C:** GO-Analyse mit Zuordnung zum zellulären Kompartiment. **D:** Assoziation der bei IPS-Patienten fehlregulierten Proteine zu Funktionen im Nervensystem, einschließlich der Netzhaut (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).





Um einen tieferen Einblick in die biologischen Prozesse zu erhalten, welche durch die differenziell regulierten Proteinspiegel möglicherweise beeinflusst werden könnten, wurden die dysregulierten Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten unter Verwendung von DAVID© zu biologischen Prozessbegriffen annotiert: 95,2 % (25 von 26) der Proteine, welche in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten erniedrigt waren, konnten mit 22 verschiedenen GO-biologischen Begriffen annotiert werden, wobei sich die Mehrheit, nämlich 12 dieser 22 Prozessbegriffe, auf die Kategorie "Immunantwort" bezogen (Abb. 11A). Bei den Proteinen, welche in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten erhöht waren, konnten 94,1 % (48 von 51) der Proteine zu insgesamt 47 unterschiedlichen biologischen GO-Begriffen annotiert werden: Hier waren die am häufigsten vertretenen biologischen Prozesskategorien "Lipidstoffwechsel" (18 von 47 Prozessbegriffen) und "Oxidativer Stress" (5 von 47 Prozessbegriffen) (Abb. 11B). Die 15 häufigsten GO-biologischen Prozessbegriffe für vermindert und erhöht vorhandene Proteine sowie die Anzahl der annotierten Proteine wurden identifiziert und sind in Abb. 11C aufgelistet.

**Abb. 11:** Annotation der differentiell regulierten Proteine in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten zu biologischen Prozessen. **A und B:** Darstellung der am häufigsten vertretenen biologischen Prozesskategorien in der GO-Annotation von erniedrigt (**A**) und erhöht (**B**) nachweisbaren Proteinen in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten. **C:** Auflistung der jeweils 15 häufigsten annotierten biologischen Prozesse (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).

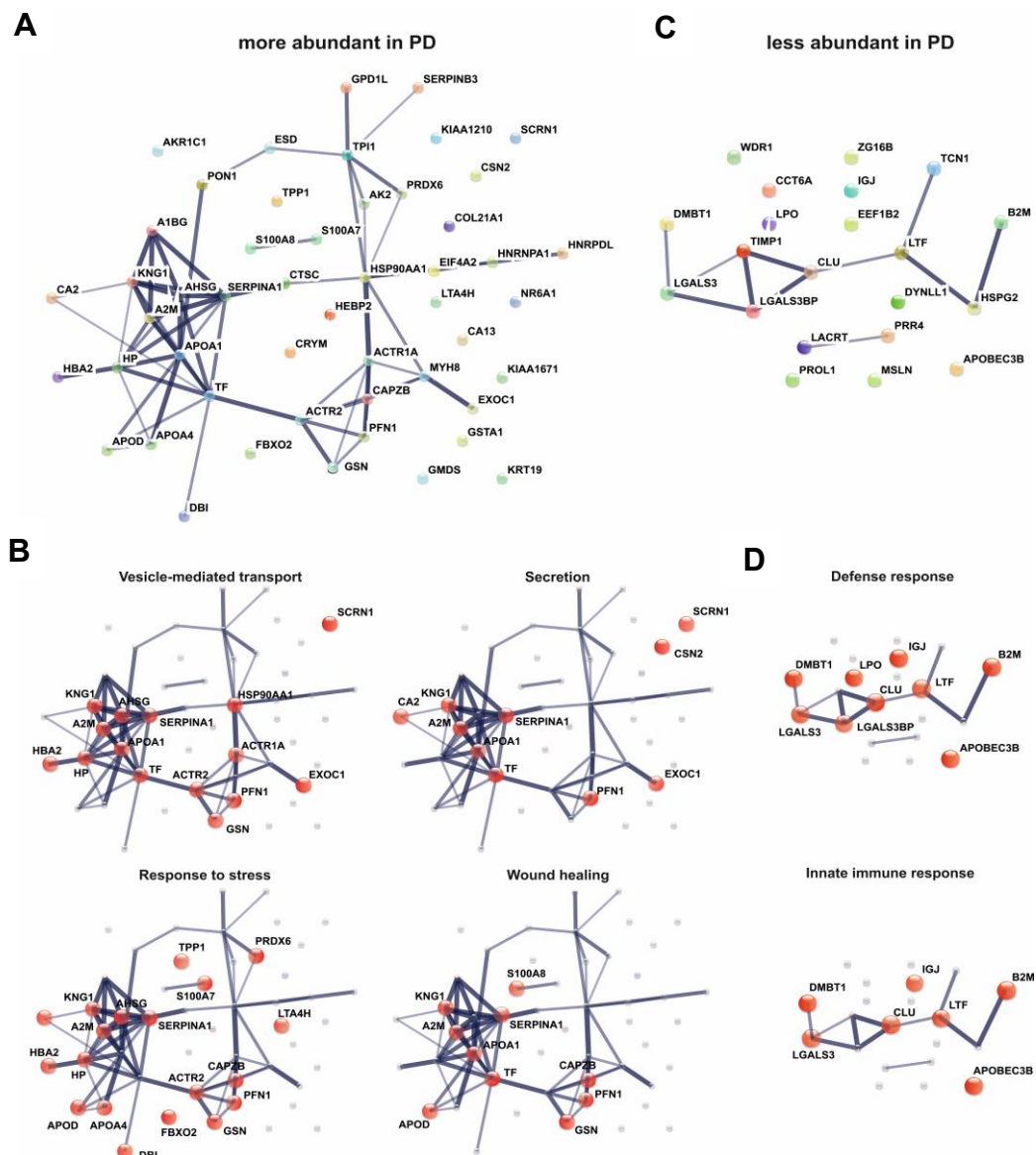


Abkürzungen: PD = *Parkinson's disease*.

Eine STRING©-Analyse von Wechselwirkungen zwischen den Proteinen konnte unter jenen Proteinen, welche exklusiv oder mit erhöhten Konzentrationen in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten nachgewiesen wurden, signifikant mehr Interaktionen aufzeigen als erwartet ( $p = 6,55 \text{ E-}15$ ), was darauf hinweist, dass diese Proteine zumindest teilweise biologisch verbunden sind. Innerhalb des

hieraus resultierenden PPI-Netzwerkes (Abb. 12A) konnten verschiedene Subnetzwerke herausgearbeitet werden, die mit den GO-biologischen Prozessbegriffen „Vesikel-vermittelter Transport“ (*vesicle-mediated transport*), „Sekretion“ (*secretion*), „Reaktion auf Stress“ (*response to stress*) und „Wundheilung“ (*wound healing*) (Abb. 12B) assoziiert waren. Innerhalb dieser Netzwerke fanden sich auch wiederholt dieselben Proteine wieder. Die starke Wechselwirkung in diesem Datensatz und die Häufigkeit dieser biologischen Prozesstermini deutet somit auf eine mögliche Relevanz dieser Proteine im Hinblick auf Pathomechanismen im IPS hin. Auch für jene Proteine, welche mit verminderten Werten in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten oder nur in den Tränen von KTR-Patienten nachgewiesen werden konnten, zeigte die STRING©-Netzwerkanalyse eine signifikant höhere Anzahl von Wechselwirkungen als erwartet ( $p = 4,20 \text{ E-}7$ ). In diesem PPI-Netzwerk (Abb. 12C) konnten die GO-biologischen Prozessbegriffe „Abwehrreaktion“ (*defense response*) und „Angeborene Immunantwort“ (*innate immune response*) erkannt und ebenfalls in korrespondierenden Subnetzwerken aufgezeigt werden (Abb. 12D). Die aufgezeigten Ergebnisse der GO-Analyse mittels STRING© konnten auch mittels DAVID© bestätigt werden.

**Abb. 12:** Darstellung der Netzwerkanalyse der dysregulierten Tränenproteine mittels STRING®. **A:** Vollständiges PPI-Netzwerk von Proteinen mit erhöhten Werten bei IPS-Patienten, einschließlich solcher Proteine, welche ausschließlich in der IPS-Gruppe gefunden wurden. **B:** Subnetzwerke, welche aus A für ausgewählte GO-biologische Prozesse abgeleitet wurden. **C:** Vollständiges PPI-Wechselwirkungsnetzwerk von Proteinen, welche in der Tränenflüssigkeit von IPS-Patienten verringert sind, einschließlich von solchen Proteinen, die ausschließlich in der KTR-Gruppe gefunden wurden. **D:** Von C abgeleitete Kernnetzwerke für ausgewählte GO-biologische Prozesse (Abbildung adaptiert aus Boerger et al. 2019).



Abkürzungen: PD = *Parkinson's disease*.

## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Pilot-Studie wurde die Zusammensetzung des Proteoms in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit IPS und alterskorrelierten KTR mittels Massenspektrometrie charakterisiert und analysiert. Die vorliegenden Daten sind nach unserem besten Wissen die erste umfassende Proteomanalyse von Tränenflüssigkeit bei Patienten mit einem IPS.

Bei Patienten mit einem IPS konnten wir zwar nur einen Trend zu reduzierten Lauflängen im Schirmer-Test nachweisen, aber es ergab sich im Vergleich zu den KTR insgesamt eine signifikant höhere Anzahl von pathologisch reduzierten Lauflängen, was für eine erhöhte Prävalenz von reduzierten Tränenvolumina bei IPS-Patienten, z. B. im Rahmen eines DES, hindeutet. Unsere Ergebnisse im Schirmer-Test waren kongruent mit einer Studie, welche eine größere Kohorte von 100 IPS-Patienten in vergleichbaren Krankheitsstadien und -dauer sowie 100 Kontrollpersonen beinhaltete (Nowacka et al. 2014). Eine Studie mit Patienten in fortgeschritteneren Stadien zeigte jedoch noch weiter reduzierte Lauflängen (Demirci et al. 2016), sodass hier ein Effekt in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer vermutet werden kann. Interessanterweise berichteten nur 2,8 % der IPS-Patienten in unserer Studie trotz signifikant reduzierter Tränenvolumina von DES-typischen Beschwerden, wie z. B. „trockenen Augen“. Unsere Daten unterstützen somit die Hypothese, dass IPS-Patienten häufiger an einem DES leiden als gleichaltrige KTR (Demirci et al. 2016) (Tamer et al. 2005) (Bagheri et al. 1994) (Kwon et al. 1994). Es ergaben sich jedoch in unserer Studie keine Assoziationen von reduzierten Tränenvolumina zu Alter, Krankheitsdauer und -stadium oder Schwere der motorischen Symptome.

In den Korrelationsanalysen konnten wir einen Trend für eine moderate negative Korrelation der Lauflänge zu den Werten im PD-NMS *questionnaire* nachweisen. Obwohl die IPS-Kohorte unserer Pilotstudie möglicherweise zu klein war, um hier eine signifikante Korrelation zu zeigen, deutet dies dennoch darauf hin, dass die reduzierten Tränenvolumina bei IPS-Patienten ein weiteres, nicht motorisches

Symptom darstellen könnten, welches mit der Gesamtbelastung aller nicht motorischen Symptome korreliert.

In der durchgeführten biochemischen Analyse des Proteoms konnten wir insgesamt 571 Tränenproteine identifizieren. Dieses Ergebnis liegt im Bereich von bisher veröffentlichten Proteomstudien zur Tränenflüssigkeit, welche jeweils zwischen 404 und 1543 Proteine identifizieren konnten, wobei Unterschiede in der massenspektrometrischen Analysetechnik und dem Studiendesign miteinbezogen werden müssen (Funke et al. 2016a) (Zhou et al. 2012) (Böhm 2012) (Lebrecht et al. 2009) (de Souza et al. 2006). Unter den detektierten Proteinen konnten wir vier Gruppen von Proteinen identifizieren: Proteine, die in beiden Gruppen nachgewiesen wurden, aber im Vergleich zur KTR-Gruppe bei IPS erhöht oder erniedrigt waren, und Proteine, die ausschließlich entweder in der IPS- oder in der KTR-Gruppe gefunden wurden. Im Hinblick auf MS-Analysen von Proteinen ist hierbei jedoch zu beachten, dass Proteine, welche in höherer Konzentration vorhanden sind, die Anwesenheit von weniger häufigen Proteinen maskieren können, sodass die vorliegenden Daten aus dieser Pilot-Studie mit anderen Verfahren, wie z. B. *immunoblots*, weiterführend validiert werden müssen. Zusätzlich muss bei der Analyse von Tränenflüssigkeit das Phänomen der "Impressionszytologie" berücksichtigt werden, welches besagt, dass durch die Platzierung des Schirmer-Teststreifens an der konjunktivalen Oberfläche die oberen Schichten des Epithels an der Augenoberfläche beschädigt und entfernt werden können. Somit kann es zu einer „Verschleppung“ von zellulären Proteinen ins Tränenflüssigkeitsproteom kommen (Singh 2005). Im weiteren Sinne wird hierdurch jedoch die Menge an identifizierbaren Proteinen erhöht und es wird ein detaillierterer Einblick in mögliche pathophysiologische Prozesse, insbesondere in den Flüssigkeitsschichten nahe der Kornea, ermöglicht.

Die aufgezeigte Analyse von GO-Begriffen legt nahe, dass nur etwa ein Zehntel der in unserer Studie identifizierten Proteine ausschließlich intrazellulär vorkommen. Fast derselbe Prozentsatz wurde als ausschließlich extrazellulären Ursprungs identifiziert, während fast 80% der identifizierten Proteine in beiden Kompartimenten vorkommen.

Kürzlich wurde eine erhöhte Expression von Protein S100A4 und S100A8, Retinaldehydrogenase-1, Peroxiredoxin-1, Annexin-A1 und -A2 sowie  $\alpha$ -Enolase und Glutathion S-Transferase-P in impressionszytologischen Proben von DES-Patienten dokumentiert (Soria et al. 2017). Interessanterweise konnte unsere Pilot-Studie die Proteine S100A7 [S100A7], S100A8 [S100A8], S100A11 [S100A11], Peroxiredoxin-6 [PRDX6], Annexin-A5 [ANXA5] und Glutathion-S-Transferase-A1 [GSTA1] ebenfalls mit erhöhten Konzentrationen nachweisen. Diese Proteine könnten somit das proteomische Korrelat der DES-Pathologie bei IPS-Patienten darstellen und z. B. die Folge einer Impressionszytologie sein. Bemerkenswerterweise gehörte keines dieser Proteine zu jener Gruppe von Proteinen, welche ausschließlich bei IPS-Patienten identifiziert wurden, was darauf hindeutet, dass sich IPS-spezifische Veränderungen von DES-spezifischen Veränderungen des Proteoms unterscheiden müssen.

In der Annotation von Proteinen mit erhöhten Werten und solchen Proteinen, die ausschließlich bei IPS gefunden wurden, zeigte sich, dass 40 % aller entsprechenden biologischen Prozessbegriffe mit dem Lipidstoffwechsel assoziiert und mehr als 10 % mit oxidativem Stress verbunden waren. Veränderungen des Cholesterinspiegels und seiner oxidierten Derivate, den Oxysterolen, wurden zuvor mit der Pathogenese des IPS und anderen Synukleinopathien in Verbindung gebracht (Doria et al. 2016): So konnten z. B. im Kortexgewebe von Patienten mit Lewy-Körper-Demenz erhöhte Konzentrationen von oxidierten Cholesterinmetaboliten nachgewiesen werden (Bosco et al. 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass 24S-Hydroxycholesterol im Liquor mit der Erkrankungsdauer beim IPS korreliert (Björkhem et al. 2013). Mehrere Apolipoproteine, u. a. [ApoD], [ApoA4] und [ApoA1], fanden sich in dieser Studie mit erhöhten Werten in der IPS-Kohorte. Von allen ist bekannt, dass sie am Lipidstoffwechsel in neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind (Emamzadeh 2017). Niedrigere Serumspiegel von Apolipoprotein A1 waren mit einem früherem Krankheitsbeginn assoziiert (Swanson et al. 2015). Darüber hinaus wurde Serumparaoxonase und Arylesterase 1 [PON1], ein Enzym, das in der Lage ist Organophosphate zu metabolisieren, als eines der ausschließlichen bzw. exklusiven Proteine in der IPS-Gruppe in unserer Studie identifiziert.

Polymorphismen in PON1 sind mit einem erhöhten Risiko für ein IPS verbunden (Clarimon et al. 2004).

Unsere Beobachtungen unterstützen somit die Beteiligung des Fettstoffwechsels und des oxidativen Stresses beim IPS und legen nahe, dass Tränenflüssigkeit auch eine wertvolle Quelle für lipidomische Biomarker sein könnte.

Die STRING©-basierte PPI-Netzwerkanalyse ergab zudem Kernnetzwerke, welche mit Vesikel-vermittelten Transport, Sekretion, Wundheilung und Stressreaktion assoziiert waren. Eine Untergruppe von Proteinen, z. B. Alpha-2-Makroglobulin [A2M], Alpha-1-Antiproteinase [SERPINA1] und Profilin 1 [PFN1], konnten allen oben genannten Prozessen zugeschrieben werden: Alpha-2-Makroglobulin ist aufgrund seiner Fähigkeit den Abbau von Amyloid- $\beta$  (Blacker et al. 1998) zu vermitteln mit der AD-Pathologie assoziiert. Erhöhte Werte von Alpha-2-Makroglobulin wurden im Plasma von AD-Patienten gefunden und korrelierten auch mit der Schwere der Erkrankung (Thambisetty et al. 2008) (Hye et al. 2006). Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus im A2M-Gen war mit erhöhten Konzentrationen von Amyloid- $\beta$  in AD-Patienten (Liao et al. 1998) und in einer holländischen Kohorte mit der Lewy-Körper-Demenz assoziiert (Sleegers et al. 2004). Alpha-1-Antiproteinase, ein Produkt des menschlichen Gens SERPINA1, ist an einer Reihe von biologischen Prozessen beteiligt, einschließlich Koagulation und Entzündung. Bei AD-Patienten wurde festgestellt, dass der Protease-Inhibitor Alpha-1-Antiproteinase mit Ablagerungen von Amyloid- $\beta$  assoziiert ist (Kowalska et al. 1996). Genetische Variationen von Alpha-1-Antiproteinase zeigten eine erhöhte Inzidenz bei AD-Patienten in einer polnischen Kohorte (Kowalska et al. 1996). Interessanterweise wurden Mutationen im PFN1-Gen, welches für das aktinbindende Protein Profilin-1 kodiert, kürzlich mit familiärer Amyotropher Lateralsklerose, einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, in Verbindung gebracht (Yang et al. 2016). Die Rolle von Profilin-1 in IPS-Patienten ist noch nicht abschließend geklärt.

Bemerkenswerterweise sind mehr als 50 % aller biologischen Prozesse von Proteinen, welche bei IPS-Patienten herunterreguliert oder ausschließlich nicht in dieser Gruppe gefunden wurden, mit dem Begriff „Immunantwort“ assoziiert. Eine ähnliche Annotation zeigte sich auch in der Kernnetzwerkanalyse mit



STRING©: Zum Beispiel gehören Lactotransferrin [LTF], Clusterin [CLU], Galectin-3 [LGALS3] und Beta-2-Microglobulin [B2M] zu dieser Untergruppe von herunterregulierten Proteinen. Lactotransferrin ist ein sehr häufig vorkommendes Protein, das von der Gl. lacrimalis und den Meibom-Drüsen produziert wird und an der antimikrobiellen Abwehr beteiligt ist. Es ist bekannt, dass es in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten (Ohashi et al. 2003) vermindert ist. Die Zugehörigkeit zur Gruppe der verminderten Proteine in dieser Studie deutet somit auf eine DES-ähnliche Dysfunktion des Tränendrüsensapparates bei IPS-Patienten hin. Clusterin gehört zur Familie der kleinen Hitzeschockproteine und ist als molekulares Chaperon für die Proteinfaltung sezernierter Proteine sowie die Clearance von Zelltrümmern und Apoptose verantwortlich. Es ist in Lewy-Körpern lokalisiert (Sasaki et al. 2002) und wurde mit erhöhten Konzentrationen im Liquor (Přikrylová Vranová et al. 2016) (Yin et al. 2009) und im Serum (Zhao et al. 2010) von IPS-Patienten gefunden. Es wird vermutet, dass Clusterin die Bildung von  $\alpha$ -Syn-positiven Einschlusskörpern in Neuronen, den Lewy-Körpern, und zytoplasmatische Einschlüsse von  $\alpha$ -Syn in Gliazellen modifiziert (Sasaki et al. 2002). In der Tränenflüssigkeit verhindert und verbessert Clusterin Störungen der Barrierefunktion der Augenoberfläche. Wenn der Clusterin-Spiegel jedoch unter einen kritischen Schwellenwert fällt, wird die Barriere anfällig für eine Austrocknung (Fini et al. 2016). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Beta-2-Microglobulin in der Tränenflüssigkeit von DES-Patienten verringert ist (Nichols und Green-Church 2009). Da es für die Zelloberflächenexpression und die Stabilität von Molekülen des Histokompatibilitätskomplexes der Klasse I wichtig ist, kann die vorliegende Reduktion auf eine verminderte angeborene Immunität und/oder eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen hinweisen. In Zusammenschau dieser Daten kann eine Fehlfunktion des Immunsystems im okulären Kompartiment von IPS-Patienten vermutet werden.

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Analyse des Proteoms hat ein hohes Potential Biomarker-Kandidaten zu identifizieren. Die relative Nichtinvasivität der Tränenflüssigkeitssammlung macht diese Körperflüssigkeit zu einer viel versprechenden Quelle für Biomarker. Obwohl diese Pilot-Studie auf der Analyse von gepoolten Tränenflüssigkeitsproben basierte und nicht erlaubte auf das Proteom einzelner Patienten zu schließen, zeigte die vorliegende Analyse bisher unbekannte Veränderungen in der Zusammensetzung des Proteoms bei Patienten mit einem idiopathischen Parkinson-Syndrom (IPS) im Vergleich zu alterskorrelierten Kontrollen. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass bei IPS-Patienten pathologische Veränderungen wie bei einem *Dry Eye syndrome* (DES) häufiger vorhanden sind. Gleichzeitig konnten wir aber auch IPS-spezifische Unterschiede im Proteom beobachten, die bei DES-Patienten nicht nachgewiesen werden konnten. Zudem detektierten wir eine Dysregulation von Tränenproteinen, die am Fettstoffwechsel, oxidativen Stress, Vesikelsekretion und Immunantwort beteiligt sind. Hierdurch werden vermutete bzw. bereits bekannte Mechanismen in der Pathogenese von IPS bestärkt. Zahlreiche der in dieser Promotion aufgezeigten Proteine konnten auch in Studien zu anderen neurologischen Erkrankungen identifiziert werden, was die Bedeutung dieser Proteine für die Pathogenese von neurodegenerativen Krankheiten beweist. Einige der aufgezeigten differentiell regulierten Proteine könnten somit in Zukunft als Ansatzpunkt für nachfolgende Biomarkerstudien in der Tränenflüssigkeit von Patienten mit IPS und/oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen genutzt werden.

## 6. Anhang

**Ergänzende Tab. A1 und A2:** Liste von Tränenproteinen, die ausschließlich in der IPS-Kohorte nachgewiesen (**A1**) oder spezifisch in dieser Kohorte nicht nachgewiesen wurden (**A2**). Die Analyse basiert auf MaxQuant-*Raw*-Intensitäten, um zu bestätigen, dass ein Protein von dem MS-System nicht detektiert wird, und ein Nullwert sich nicht durch LFQ-Normalisierung erklärt.

### Ergänzende Tab. A1:

Protein	Gen	Identifikation in UniProt-Datenbank
Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	P27169
Kininogen-1	KNG1	P01042
Carbonic anhydrase 13	CA13	Q8N1Q1
Carbonic anhydrase 2	CA2	P00918
Alpha-centractin (ARP1)	ACTR1A	P61163
Leukotriene A-4 hydrolase	LTA4H	P09960
Ketimine reductase mu-crystallin (CRYM)	CRYM	Q14894
Adenylate kinase 2, mitochondrial	AK2	P54819
Nuclear receptor subfamily 6 group A member 1	NR6A1	Q15406
Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin A)	AHSG	P12763 (P02765)
Exocyst complex component 1	EXOC1	Q9NV70
S-formylglutathione hydrolase	ESD	P10768
F-actin-capping protein subunit beta	CAPZB	P47756
Uncharacterized protein KIAA1210	KIAA1210	Q9ULL0
Myosin-2	MYH8	P13535
Apolipoprotein D	APOD	P05090
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	GPD1L	Q8N335
Tripeptidyl-peptidase 1	TPP1	O14773

Serpin B3	SERPINB3	P29508
F-box only protein 2	FBXO2	QU9K22
Uncharacterized protein KIAA1671	KIAA1671	Q9BY89
Beta-casein (CON__P02666)	CSN2	P02666 (P05814)
Alpha-1-antiproteinase (Serpin A1)	SERPINA1	P34955 (P01009)
Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	P53634
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1-like 2	HNRNPA1	P09651
Collagen alpha-1(XXI) chain	COL21A1	Q96P44
Eukaryotic initiation factor 4A-II	EIF4A2	Q14240
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0	HNRNPDL	O14979
Secernin-1	SCRN1	Q12765
Hemoglobin subunit alpha	HBA1	P69905
Apolipoprotein A-IV	APOA4	P06727

**Ergänzende Tab. A2:**

<b>Protein</b>	<b>Gen</b>	<b>Identifikation in UniProt-Datenbank</b>
Immunoglobulin heavy variable 3-49	IGHV3-49	A0A0A0MS15
Elongation factor 1-beta	EEF1B2	P24534
WD repeat-containing protein 1	WDR1	D6RD66
Metalloproteinase inhibitor 1 (TIMP1)	TIMP1	Q5H9A7
Ig kappa chain V-I region EU	IGKV1-5	P01602
T-complex protein 1 subunit zeta	CCT6A	P40227
Dynein light chain 2, cytoplasmic	DYNLL1	P63167

**Ergänzende Tab. A3 und A4:** Liste von Proteinen, welche zwischen der IPS- und KTR-Studienkohorte entweder hoch- (**A3**) oder herunterreguliert (**A4**) nachgewiesen werden konnten. Die Proteine wurden mittels Student-t-Test oder Mann-Whitney-U-Test (Shapiro-Wilks  $p < 0,05$ ) analysiert. Proteinkandidaten zeigten eine signifikante ( $p < 0,05$  in IPS versus KTR, Ausnahmen werden durch \* und/oder SL hervorgehoben) und kongruente Regulation in beiden MaxQuant-Intensitätsformen (*Raw* und nach LFQ-Normalisierung).

**Ergänzende Tab. A3:**

Protein	Gen	Identifikation in UniProt-Datenbank	Fold Change IPS/KTR	P-Wert
Keratin, type I cytoskeletal	KRT19	P08727	6.430676339	0.002093
GDP-mannose 4,6 dehydratase <sup>NP</sup>	GMDS	O60547	5.447013581	0.026519
Actin-related protein 2 <sup>NP</sup>	ACTR2	P61160	4.813584097	0.026519
Heat shock protein HSP 90-alpha <sup>NP</sup>	HSP90AA1	P07900	3.639808845	0.030384
Myosin-14*	MYH14	Q7Z406	2.623073497	0.056856
Apolipoprotein A-I <sup>NP</sup>	APOA1	P02647	2.495095712	0.030384
Protein S100-A7	S100A7	P31151	2.424756042	0.000003
Glutathione S-transferase A1	GSTA1	P08263	2.250301759	0.003434
Glutathione peroxidase*	GPX1	P07203	2.20585427	0.091871
Alpha-1B-glycoprotein <sup>SL</sup>	A1BG	P04217	2.179552315	0.038505
Serotransferrin <sup>NP</sup>	TF	P02787	1.845711123	0.030384
Fructose-bisphosphate aldolase*	ALDOA	P04075	1.840595757	0.054280
Haptoglobin	HP	P00738	1.804369421	0.039904
Actin, alpha skeletal muscle*	ACTA1	P68133	1.763420162	0.074068
Profilin-1	PFN1	P07737	1.661407417	0.013696
Gelsolin	GSN	P06396	1.524438708	0.003266
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	P01857	1.476276405	0.020090
Acyl-CoA-binding protein	DBI	P07108	1.462493027	0.013605
Protein S100-A8	S100A8	P05109	1.446071587	0.006716

Alpha-2-macroglobulin*	A2M	P01023	1.405606163	0.047854
Aldo-keto reductase family 1 member C1	AKR1C1	Q04828	1.383762572	0.002926
Annexin A5*	ANXA5	P08758	1.35140838	0.076850
Vitamin D-binding protein*	GC	P02774	1.34975641	0.061626
Heme-binding protein 2	HEBP2	Q9Y5Z4	1.327068567	0.005161
Pyridoxal kinase*	PDXK	O00764	1.303790822	0.050801
Peroxiredoxin-6	PRDX6	P30041	1.289740632	0.022707
Triosephosphate isomerase	TPI1	P60174	1.286652343	0.015353
Phosphatidylethanolamine-binding protein 1*	PEBP1	P30086	1.241408356	0.064021
Ezrin*	EZR	P15311	1.188348258	0.077545
Protein S100-A11*	S100A11	P31949	1.145552797	0.074399
Hemopexin*	HPX	P02790	1.143781318	0.076008

#### Ergänzende Tab. A4:

Protein	Gen	Identifikation in UniProt-Datenbank	Fold Change IPS/KTR	P-Wert
Ig kappa chain V-III region SIE	IGKV3-20	P01620	-1.274640347	0.027198
Ig kappa chain C region	IGKC	P01834	-1.381265825	0.002369
Galectin-3 <sup>SL</sup>	LGALS3	P17931	-1.46098405	0.001539
Transcobalamin-1 <sup>SL</sup>	TCN1	P20061	-1.703931549	0.027629
Lactotransferrin	LTF	P02788	-1.719258808	0.000125
Proline-rich protein 4 <sup>SL</sup>	PRR4	Q16378	-1.759055197	0.001136
Mesothelin <sup>SL</sup>	MSLN	Q13421	-1.843792094	0.034455
Immunoglobulin J chain <sup>SL, NP</sup>	JCHAIN	P01591	-1.878579889	0.030384
Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	Q08380	-2.001119429	0.006740
Proline-rich protein 1 (Opiorphin prepropeptide) <sup>SL</sup>	OPRPN	Q99935	-2.050077019	0.002197
Clusterin <sup>SL</sup>	CLU	P10909	-2.065778854	0.001325
Beta-2-microglobulin	B2M	H0YLF3	-2.082029447	0.001462
DNA dC->dU-editing enzyme APOBEC-3A	APOBEC3B	Q9UH17	-2.092202629	0.043256

---

Deleted in malignant brain tumors 1 protein	DMBT1	Q9UGM3	-2.103705156	0.006323
Ig alpha-2 chain C region	IGHA2	P01877	-2.587712673	0.000293
Extracellular glycoprotein lacritin	LACRT	Q9GZZ8	-2.613485777	0.003488
Zymogen granule protein 16 homolog B	ZG16B	Q96DA0	-2.694506636	0.000077
Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein	HSPG2	P98160	-3.068024252	0.027105
Lactoperoxidase	LPO	P22079	-4.163591297	0.000590

## 7. Literaturverzeichnis

- Adler CH, Beach TG, Hentz JG, Shill HA, Caviness JN, Driver-Dunckley E, Sabbagh MN, Sue LI, Jacobson SA, Belden CM, et al. (2014): Low clinical diagnostic accuracy of early versus advanced Parkinson's disease: clinicopathologic study. *Neurology* 83, 406-412
- Agostino R, Bologna M, Dinapoli L, Gregori B, Fabbrini G, Accornero N, Berardelli A (2008): Voluntary, spontaneous, and reflex blinking in Parkinson's disease. *Mov Disord* 23, 669-675
- Aksoy D, Ortak H, Kurt S, Cevik E, Cevik B (2014): Central corneal thickness and its relationship to Parkinson's disease severity. *Can J Ophthalmol* 49, 152-156
- Almer Z, Klein KS, Marsh L, Gerstenhaber M, Repka MX (2012): Ocular motor and sensory function in Parkinson's disease. *Ophthalmology* 119, 178-182
- Almog Y, Monselise M, Almog C, Barishak YR (1982): The effect of oral treatment with beta blockers on the tear secretion. *Metab Pediatr Syst Ophthalmol* 6, 343-345
- Al-Nimer MSM, Mshatat SF, Abdulla HI (2014): Saliva  $\alpha$ -synuclein and a high extinction coefficient protein: A novel approach in assessment biomarkers of Parkinson's disease. *N Am J Med Sci* 6, 633-637
- Ananthi S, Santhosh RS, Nila MV, Prajna NV, Lalitha P, Dharmalingam K (2011): Comparative proteomics of human male and female tears by two-dimensional electrophoresis. *Exp Eye Res* 92, 454-463
- Anderson NL, Anderson NG (1998): Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861
- Angot E, Steiner JA, Hansen C, Li JY, Brundin P (2010): Are synucleinopathies prion-like disorders? *Lancet Neurol* 9, 1128-1138



- Armstrong RA (2011): Visual symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* 2011, 1-9
- Armstrong RA (2017): Visual dysfunction in Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 134, 921-946
- Bagheri H, Berlan M, Senard JM, Rascol O, Montastruc JL (1994): Lacrimation in Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 17, 89-91
- Benito MJ, González-García MJ, Tesón M, García N, Fernández I, Calonge M, Enríquez-de-Salamanca A (2014): Intra- and inter-day variation of cytokines and chemokines in tears of healthy subjects. *Exp Eye Res* 120, 43-49
- Bergmann MT, Newman BL, Johnson NC (1985): The effect of a diuretic (hydrochlorothiazide) on tear production in humans. *Am J Ophthalmol* 99, 473-475
- Biomarkers Definitions Working Group (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95
- Biousse V, Skibell BC, Watts RL, Loupe DN, Drews-Botsch C, Newman NJ (2004): Ophthalmologic features of Parkinson's disease. *Neurology* 62, 177-180
- Björkhem I, Lövgren-Sandblom A, Leoni V, Meaney S, Brodin L, Salveson L, Winge K, Pålhagen S, Svenningsson P (2013): Oxysterols and Parkinson's disease: evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci Lett* 555, 102-105
- Blacker D, Wilcox MA, Laird NM, Rodes L, Horvath SM, Go RC, Perry R, Watson B, Bassett SS, McInnis MG et al. (1998):  $\alpha$ -2-macroglobulin is genetically associated with Alzheimer's disease. *Nat Genet* 19, 357-360
- Boehm N, Riechardt AI, Wiegand M, Pfeiffer N, Grus FH (2011): Proinflammatory cytokine profiling of tears from Dry Eye patients by means of antibody microarrays. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 7725-7730

- Boerger M, Funke S, Leha A, Roser AE, Wuestemann AK, Maass F, Bähr M, Grus F, Lingor P (2019): Proteomic analysis of tear fluid reveals disease-specific patterns in patients with Parkinson's disease - A pilot study. *Parkinsonism Relat Disord* 63, 3-9
- Böhm D (2012): Comparison of tear protein levels in breast cancer patients and healthy controls using a de novo proteomic approach. *Oncol Rep.* 28, 429-438
- Bosco DA, Fowler DM, Zhang Q, Nieva J, Powers ET, Wentworth P, Lerner RA, Kelly JW (2006): Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate  $\alpha$ -synuclein fibrilization. *Nat Chem Biol* 2, 249-253
- Bours J, Reitz C, Strobel J, Breipohl W (2005): Detection of secretory IgM in tears during rhino-conjunctivitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 243, 456-463
- Braak H, Tredici KD, Rüb U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E (2003): Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 24, 197-211
- Brumback R: Anatomic and physiologic aspects of the cerebrospinal fluid space. In: Herndon R, Brumback R (Hrsg.): *The cerebrospinal fluid*. Kluwer Academic Publishing, Boston 1989, 15-43
- Brundin P, Melki R, Kopito R (2010): Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 301-307
- Bye L, Vamadevan P, Chaudhuri KR: Ophthalmological aspects of Parkinson's disease. In: Chaudhuri KR, Tolosa E, Schapira A, Poewe W (Hrsg.): *Non motor symptoms of Parkinson's disease*. Oxford University Press, Oxford, United Kingdom 2009, 297-307
- Chahine LM, Stern MB (2017): Parkinson's disease biomarkers: Where are we and where do we go next? *Mov Disord Clin Pract* 4, 796-805

- Chaudhuri KR, Martinez-Martin P, Schapira AHV, Stocchi F, Sethi K, Odin P, Brown RG, Koller W, Barone P, MacPhee G et al. (2006): International multicenter pilot study of the first comprehensive self-completed nonmotor symptoms questionnaire for Parkinson's disease: The NMSQuest study. *Mov Disord* 21, 916-923
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006): Non-motor symptoms of Parkinson's disease: Diagnosis and management. *Lancet Neurol* 5, 235-245
- Chen X, Hu Y, Cao Z, Liu Q, Cheng Y (2018): Cerebrospinal fluid inflammatory cytokine aberrations in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Front Immunol* 9, 2122
- Chia EM, Mitchell P, Rochtchina E, Lee AJ, Maroun R, Wang JJ (2003): Prevalence and associations of Dry Eye syndrome in an older population: The Blue Mountains Eye Study. *Clin Experiment Ophthalmol* 31, 229-232
- Chu Y, Kordower JH (2007): Age-associated increases of  $\alpha$ -synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? *Neurobiol Dis* 25, 134-149
- Clarimon J, Eerola J, Hellström O, Tienari PJ, Singleton A (2004): Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population. *Neurosci Lett* 367, 168-170
- Çomoğlu SS, Güven H, Acar M, Öztürk G, Koçer B (2013): Tear levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 553, 63-67
- Craig JP, Nichols KK, Akpek EK, Caffery B, Dua HS, Joo CK, Liu Z, Nelson JD, Nichols JJ, Tsubota K, Stapleton F (2017): TFOS DEWS II Definition and Classification Report. *Ocul Surf* 15, 276-283
- Dartt DA (2004): Interaction of EGF family growth factors and neurotransmitters in regulating lacrimal gland secretion. *Exp Eye Res* 78, 337-345

- Daividsdottir S, Cronin-Golomb A, Lee A (2005): Visual and spatial symptoms in Parkinson's disease. *Vision Res* 45, 1285-1296
- de Souza GA, de Godoy LM, Mann M (2006): Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 7, R72
- Del Tredici K, Hawkes CH, Ghebremedhin E, Braak H (2010): Lewy pathology in the submandibular gland of individuals with incidental Lewy body disease and sporadic Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 119, 703-713
- Deller T, Welsch U: Sehorgan. In: Welsch U (Hrsg.), Kummer W (Hrsg.), Deller T: *Histologie - Das Lehrbuch*. 5. Auflage; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2005, 623
- Demirci S, Gunes A, Koyuncuoglu HR, Tok L, Tok O (2016): Evaluation of corneal parameters in patients with Parkinson's disease. *Neurol Sci* 37, 1247-1252
- Deutsche Gesellschaft für Neurologie und die am Konsensusprozess beteiligten medizinisch-wissenschaftlichen Fachgesellschaften, Berufsverbände und Organisationen. S3-Leitlinie: Idiopathisches Parkinson-Syndrom 2016
- Devic I, Hwang H, Edgar JS, Izutsu K, Presland R, Pan C, Goodlett DR, Wang Y, Armaly J, Tumas V, et al. (2011): Salivary  $\alpha$ -synuclein and DJ-1: Potential biomarkers for Parkinson's disease. *Brain* 134, e178-e178
- Dickson DW (2012): Parkinson's disease and parkinsonism: Neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009258
- Doria M, Maugest L, Moreau T, Lizard G, Vejux A (2016): Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med* 101, 393-400
- El-Agnaf OMA, Salem SA, Paleologou KE, Cooper LJ, Fullwood NJ, Gibson MJ, Curran MD, Court JA, Mann DMA, Ikeda S et al. (2003):  $\alpha$ -synuclein implicated in Parkinson's disease is present in extracellular biological fluids, including human plasma. *FASEB J* 17, 1945-1947

- Eller M, Williams DR (2009): Biological fluid biomarkers in neurodegenerative parkinsonism. *Nat Rev Neurol* 5, 561-570
- Emamzadeh FN (2017): Role of apolipoproteins and  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 62, 344-355
- Enders D, Balzer-Geldsetzer M, Riedel O, Dodel R, Wittchen HU, Sensken SC, Wolff B, Reese JP (2017): Prevalence, duration and severity of Parkinson's disease in Germany: A combined meta-analysis from literature data and outpatient samples. *Eur Neurol* 78, 128-136
- Enríquez-de-Salamanca A, Castellanos E, Stern ME, Fernández I, Carreño E, García-Vázquez C, Herreras JM, Calonge M (2010): Tear cytokine and chemokine analysis and clinical correlations in evaporative-type Dry Eye disease. *Mol Vis* 16, 862-873
- Fini ME, Bauskar A, Jeong S, Wilson MR (2016): Clusterin in the eye: An old dog with new tricks at the ocular surface. *Exp Eye Res* 147, 57-71
- Fitzpatrick E, Hohl N, Silburn P, O'Gorman C, Broadley SA (2012): Case-control study of blink rate in Parkinson's disease under different conditions. *J Neurol* 259, 739-744
- Fliser D, Novak J, Thongboonkerd V, Argilés À, Jankowski V, Girolami MA, Jankowski J, Mischak H (2007): Advances in urinary proteome analysis and biomarker discovery. *J Am Soc Nephrol* 18, 1057-1071
- Funke S, Azimi D, Wolters D, Grus FH, Pfeiffer N (2012): Longitudinal analysis of taurine induced effects on the tear proteome of contact lens wearers and Dry Eye patients using a RP-RP-Capillary-HPLC–MALDI TOF/TOF MS approach. *J Proteomics* 75, 3177-3190
- Funke S, Beck S, Lorenz K, Kotterer M, Wolters D, Perumal N, Pfeiffer N, Grus FH (2016a): Analysis of the effects of preservative-free tafluprost on the tear proteome. *Am J Transl Res* 8, 4025

- Funke S, Perumal N, Beck S, Gabel-Scheurich S, Schmelter C, Teister J, Gerbig C, Gramlich OW, Pfeiffer N, Grus FH (2016b): Glaucoma related proteomic alterations in human retina samples. *Sci Rep* 6, 29759
- Funke S, Markowitsch S, Schmelter C, Perumal N, Mwiiri FK, Gabel-Scheurich S, Pfeiffer N, Grus FH (2017): In-depth proteomic analysis of the porcine retina by use of a four step differential extraction Bottom-up-LC-MS platform. *Mol Neurobiol* 54, 7262-7275
- Gan SD, Patel KR (2013): Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol* 133, e12
- Gao L, Tang H, Nie K, Wang L, Zhao J, Gan R, Huang J, Zhu R, Feng S, Duan Z, et al. (2015): Cerebrospinal fluid  $\alpha$ -synuclein as a biomarker for Parkinson's disease diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Int J Neurosci* 125, 645-654
- García N, Tesón M, Enríquez-de-Salamanca A, Mena L, Sacristán A, Fernández I, Calonge M, González-García MJ (2014): Basal values, intra-day and inter-day variations in tear film osmolarity and tear fluorescein clearance. *Curr Eye Res* 39, 673-679
- Gibb WR, Lees AJ (1988): The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51, 745-752
- Gilbard JP, Farris RL, Santamaria J (1978): Osmolarity of tear microvolumes in keratoconjunctivitis sicca. *Arch Ophthalmol* 96, 677-681
- Graves PR, Haystead TAJ (2002): Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 39-63
- Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L, Nichols JJ (2008): Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 14, 456
- Grehn F: Tränenorgane. In: Grehn F: *Augenheilkunde*. 30. Auflage; Springer 2008, 72-73

- Guillon M, Maïssa C (2010): Tear film evaporation effect of age and gender. *Cont Lens Anterior Eye* 33, 171-175
- Hagan S, Martin E, Enríquez-de-Salamanca A (2016): Tear fluid biomarkers in ocular and systemic disease: potential use for predictive, preventive and personalised medicine. *EPMA J* 7, 15
- Hamm-Alvarez SF, Janga SR, Edman MC, Feigenbaum D, Freire D, Mack WJ, Okamoto CT, Lew MF (2019a): Levels of oligomeric  $\alpha$ -synuclein in reflex tears distinguish Parkinson's disease patients from healthy controls. *Biomark Med.* 13, 1447-1457
- Hamm-Alvarez SF, Okamoto CT, Janga SR, Feigenbaum D, Edman MC, Freire D, Shah M, Ghanshani R, Mack WJ, Lew MF (2019b): Oligomeric  $\alpha$ -synuclein is increased in basal tears of Parkinson's patients. *Biomark Med.* 13, 941-952
- Hirsch L, Jette N, Frolkis A, Steeves T, Pringsheim T (2016): The Incidence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 46, 292-300
- Holopainen JM, Moilanen JA, Sorsa T, Kivelä-Rajamäki M, Tervahartiala T, Vesaluoma MH, Tervo TM (2003): Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2550-2556
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009): Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44-57
- Hughes AJ, Daniel SE, Kilford L, Lees AJ (1992): Accuracy of clinical diagnosis of idiopathic Parkinson's disease: a clinico-pathological study of 100 cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55, 181-184
- Hughes AJ, Daniel SE, Ben-Shlomo Y, Lees AJ (2002): The accuracy of diagnosis of parkinsonian syndromes in a specialist movement disorder service. *Brain* 125, 861-870

- Hye A, Lynham S, Thambisetty M, Causevic M, Campbell J, Byers HL, Hooper C, Rijdsdijk F, Tabrizi SJ, Banner S, et al. (2006): Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* 129, 3042-3050
- Jiménez-Jiménez FJ, Alonso-Navarro H, García-Martín E, Agúndez JAG (2014): Cerebrospinal fluid biochemical studies in patients with Parkinson's disease: toward a potential search for biomarkers for this disease. *Front Cell Neurosci.* 8, 369
- Kalkan Akcay E, Akcay M, Can GD, Aslan N, Uysal BS, Ceran BB, Koseahya P, Cagil N (2015): The effect of antihypertensive therapy on Dry Eye disease. *Cutan Ocul Toxicol* 34, 117-123
- Karson CN, LeWitt PA, Calne DB, Wyatt RJ (1982): Blink rates in parkinsonism. *Ann Neurol* 12, 580-583
- Kass-Iliyya L, Javed S, Gosal D, Kobylecki C, Marshall A, Petropoulos IN, Ponirakis G, Tavakoli M, Ferdousi M, Chaudhuri KR et al. (2015): Small fiber neuropathy in Parkinson's disease: A clinical, pathological and corneal confocal microscopy study. *Parkinsonism Relat Disord* 21, 1454-1460
- Kesler A, Korczyn A (2006): Visual disturbances in Parkinson's disease. *Practical Neurol* 6, 28-33
- Kijlstra A, Kuizenga A (1994): Analysis and function of the human tear proteins. *Adv Exp Med Biol* 350, 299-308
- Kirsch J: Tränenapparat. In: Bob A, Bob K (Hrsg.), Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Wurzinger LJ: *Duale Reihe - Anatomie*. 1. Auflage; Thieme 2006, 1062–1063
- Klauß V: Tränenorgane. In: Sachsenweger M, Klauß V, Nasemann J, Ugi I: *Duale Reihe - Augenheilkunde*. 2. Auflage; Thieme 2002, 38-48
- Lutz J: Physiologie und Biochemie. In: Collins JF, Augustin AJ (Hrsg.): *Augenheilkunde*. 2. Auflage; Springer 2001, 1105-1106 und 1121-1123



- Kowalska A, Danker-Hopfe H, Wender M, Florczak J, Walter H (1996): Association between the PI\*M3 allele of  $\alpha$  1-antitrypsin and Alzheimer's disease? A preliminary report. *Hum Genet* 98, 744-746
- Kwon OY, Kim SH, Kim JH, Kim MH, Ko MK (1994): Schirmer test in Parkinson's disease. *J Korean Med Sci* 9, 239-242
- Lam H, Bleiden L, de Paiva CS, Farley W, Stern ME, Pflugfelder SC (2009): Tear cytokine profiles in dysfunctional tear syndrome. *Am J Ophthalmol* 147, 198-205
- Lebrecht A, Boehm D, Schmidt M, Koelbl H, Schwirz RL, Grus FH (2009): Diagnosis of breast cancer by tear proteomic pattern. *Cancer Genomics Proteomics* 6, 177-182
- Lee HJ, Patel S, Lee SJ (2005): Intravesicular localization and exocytosis of  $\alpha$ -synuclein and its aggregates. *J Neurosci*. 25, 6016-6024
- Lee HK, Ryu IH, Seo KY, Hong S, Kim HC, Kim EK (2006): Topical 0.1% prednisolone lowers nerve growth factor expression in keratoconjunctivitis sicca patients. *Ophthalmology* 113, 198-205
- Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, Rebeck GW, Gomez-Isla T, Clatworthy A, Binetti G et al. (1998): Genetic association of an  $\alpha$ -2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 7, 1953-1956
- Litvan I, Bhatia KP, Burn DJ, Goetz CG, Lang AE, McKeith I, Quinn N, Sethi KD, Shults C, Wenning GK (2003): SIC Task Force appraisal of clinical diagnostic criteria for parkinsonian disorders. *Mov Disord* 18, 467-486
- Liu J, Shi B, He S, Yao X, Willcox MD, Zhao Z (2010): Changes to tear cytokines of type 2 diabetic patients with or without retinopathy. *Mol Vis* 31, 2931-2938
- Magliozzi R, Howell OW, Nicholas R, Cruciani C, Castellaro M, Romualdi C, Rossi S, Pitteri M, Benedetti MD, Gajofatto A et al. (2018): Inflammatory

intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 83, 739–755

Malek N, Swallow D, Grosset KA, Anichtchik O, Spillantini M, Grosset DG (2014):  $\alpha$ -synuclein in peripheral tissues and body fluids as a biomarker for Parkinson's disease - a systematic review. *Acta Neurol Scand* 130, 59–72

Mathers WD, Stovall D, Lane JA, Zimmerman MB, Johnson S (1998): Menopause and tear function: The influence of prolactin and sex hormones on human tear production. *Cornea* 17, 353–358

McGeer PL, McGeer EG (2004): Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 10 Suppl 1, S3-7

McGill JI, Liakos GM, Goulding N, Seal DV (1984): Normal tear protein profiles and age-related changes. *Br J Ophthalmol* 68, 316-320

Mollenhauer B, El-Agnaf OMA, Marcus K, Trenkwalder C, Schlossmacher MG (2010): Quantification of  $\alpha$ -synuclein in cerebrospinal fluid as a biomarker candidate: Review of the literature and considerations for future studies. *Biomark Med* 4, 683-699

Mollenhauer B, Locascio JJ, Schulz-Schaeffer W, Sixel-Döring F, Trenkwalder C, Schlossmacher MG (2011):  $\alpha$ -synuclein and tau concentrations in cerebrospinal fluid of patients presenting with parkinsonism: A cohort study. *Lancet Neurol* 10, 230-240

Nerius M, Fink A, Doblhammer G (2017): Parkinson's disease in Germany: Prevalence and incidence based on health claims data. *Acta Neurol Scand* 136, 386-392

Nerius M, Ziegler U, Doblhammer G, Fink A (2020): Trends in der Prävalenz von Demenz und Parkinson - Eine Analyse auf Basis aller gesetzlich versicherten Personen im Alter 65+ in Deutschland zwischen 2009 und 2012. *Gesundheitswesen* 82, 761-769

- Ng V, Cho P, Wong F, Chan Y (2001): Variability of tear protein levels in normal young adults: Diurnal (daytime) variation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 239, 257-263
- Nichols JJ, Green-Church KB (2009): Mass spectrometry-based proteomic analyses in contact lens-related Dry Eye. *Cornea* 28, 1109-1117
- Nowacka B, Lubinski W, Honczarenko K, Potemkowski A, Safranow K (2014): Ophthalmological features of Parkinson's disease. *Med Sci Monit* 20, 2243-2249
- Ohashi Y, Ishida R, Kojima T, Goto E, Matsumoto Y, Watanabe K, Ishida N, Nakata K, Takeuchi T, Tsubota K (2003): Abnormal protein profiles in tears with Dry Eye syndrome. *Am J Ophthalmol* 136, 291-299
- Oliveros JC (2007): VENNY - An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams, <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> (Version 2.1, letzter Zugriff am 07.04.2020)
- Olsen JV, de Godoy LM, Li G, Macek B, Mortensen P, Pesch R, Makarov A, Lange O, Horning S, Mann M (2005): Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Mol Cell Proteomics* 4, 2010-2021
- Örnek N, Dağ E, Örnek K (2015): Corneal sensitivity and tear function in neurodegenerative diseases. *Curr Eye Res* 40, 423-428
- Owen AM, Beksinska M, James M, Leigh PN, Summers BA, Marsden CD, Quinn NP, Sahakian BJ, Robbins TW (1993): Visuospatial memory deficits at different stages of Parkinson's disease. *Neuropsychologia* 31, 627-644
- Pflugfelder SC, Jones D, Ji Z, Afonso A, Monroy D (1999): Altered cytokine balance in the tear fluid and conjunctiva of patients with Sjögren's syndrome keratoconjunctivitis sicca. *Curr Eye Res* 19, 201-211
- Pieragostino D, Agnifili L, Fasanella V, D'Aguanno S, Mastropasqua R, Di Ilio C, Sacchetta P, Urbani A, Del Boccio P (2013): Shotgun proteomics reveals

- specific modulated protein patterns in tears of patients with primary open angle glaucoma naïve to therapy. *Mol Biosyst* 9, 1108
- Pieri V, Diederich NJ, Raman R, Goetz CG (2000): Decreased color discrimination and contrast sensitivity in Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 172, 7-11
- Pinter B, Diem-Zangerl A, Wenning GK, Scherfler C, Oberaigner W, Seppi K, Poewe W (2015): Mortality in Parkinson's disease: A 38-year follow-up study. *Mov Disord* 30, 266-269
- Poewe W, Seppi K, Tanner CM, Halliday GM, Brundin P, Volkmann J, Schrag A-E, Lang AE (2017): Parkinson's disease. *Nat Rev Dis Primers* 3, 17013
- Postuma RB, Berg D, Stern M, Poewe W, Olanow CW, Oertel W, Obeso J, Marek K, Litvan I, Lang AE et al. (2015): MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. *Mov Disord* 30, 1591-1601
- Přikrylová Vranová H, Hényková E, Mareš J, Kaiserová M, Menšíková K, Vašík M, Hlušík P, Zapletalová J, Strnad M, Stejskal D, Kaňovský P (2016): Clusterin CSF levels in differential diagnosis of neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci* 361, 117-121
- Pringsheim T, Jette N, Frolkis A, Steeves TDL (2014): The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 29, 1583-1590
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C (2010): Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics* 73, 2064-2077
- Rajput AH, Rozdilsky B, Rajput A (1991): Accuracy of clinical diagnosis in parkinsonism - a prospective study. *Can J Neurol Sci* 18, 275-278
- Recasens A, Dehay B (2014):  $\alpha$ -synuclein spreading in Parkinson's disease. *Front Neuroanat* 8, 159

- Reddy VC, Patel SV, Hodge DO, Leavitt JA (2013): Corneal sensitivity, blink rate, and corneal nerve density in progressive supranuclear palsy and Parkinson's disease. *Cornea* 32, 631-635
- Riederer P, Wuketich S (1976): Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's disease: A detailed study of influential factors in human brain amine analysis. *J Neural Transm* 38, 277-301
- Rohit A, Stapleton F, Brown SHJ, Mitchell TW, Willcox MDP (2014): Comparison of tear lipid profile among basal, reflex, and flush tear samples. *Optom Vis Sci* 91, 1391-1395
- Sack RA, Tan KO, Tan A (1992): Diurnal tear cycle: Evidence for a nocturnal inflammatory constitutive tear fluid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33, 626-640
- Sako W, Murakami N, Izumi Y, Kaji R (2014): Reduced  $\alpha$ -synuclein in cerebrospinal fluid in synucleinopathies: Evidence from a meta-analysis. *Mov Disord* 29, 1599-1605
- Sako W, Murakami N, Izumi Y, Kaji R (2015): Neurofilament light chain level in cerebrospinal fluid can differentiate Parkinson's disease from atypical parkinsonism: Evidence from a meta-analysis. *J Neurol Sci* 352, 84-87
- Sasaki K, Doh-ura K, Wakisaka Y, Iwaki T (2002): Clusterin/apolipoprotein J is associated with cortical Lewy bodies: Immunohistochemical study in cases with  $\alpha$ -synucleinopathies. *Acta Neuropathol* 104, 225-230
- Schapira AHV, Chaudhuri KR, Jenner P (2017): Non-motor features of Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 18, 435-450
- Scherling CS, Hall T, Berisha F, Klepac K, Karydas A, Coppola G, Kramer JH, Rabinovici G, Ahljanian M, Miller BL et al. (2014): Cerebrospinal fluid neurofilament concentration reflects disease severity in frontotemporal degeneration. *Ann Neurol* 75, 116-126
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M (2007): In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* 1, 2856-2860

- Shulman LM, Taback RL, Rabinstein AA, Weiner WJ (2002): Non-recognition of depression and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 8, 193-197
- Singh R (2005): Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol* 89, 1655-1659
- Slegers K, Roks G, Theuns J, Aulchenko YS, Rademakers R, Cruts M, van Gool WA, Van Broeckhoven C, Heutink P, Oostra BA et al. (2004): Familial clustering and genetic risk for dementia in a genetically isolated Dutch population. *Brain* 127, 1641-1649
- Smoot ME, Ono K, Ruscheinski J, Wang P-L, Ideker T (2011): Cytoscape 2.8: New features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* 27, 431-432
- Söğütlü Sarı E, Koçak R, Yazıcı A, Şahin G, Çakmak H, Kocatürk T, Ermiş SS (2015): Tear osmolarity, break-up time and schirmer's scores in Parkinson's disease. *Turk J Ophthalmol* 45, 142–145
- Soria J, Acera A, Durán JA, Boto-de-los-Bueis A, Del-Hierro-Zarzuelo A, González N, Reigada R, Suárez T (2017): The analysis of human conjunctival epithelium proteome in ocular surface diseases using impression cytology and 2D-DIGE. *Exp Eye Res* 167, 31-43
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M (1997):  $\alpha$ -synuclein in Lewy bodies. *Nature* 388, 839-840
- Spurr-Michaud S, Argüeso P, Gipson I (2007): Assay of mucins in human tear fluid. *Exp Eye Res* 84, 939-950
- Swanson CR, Berlyand Y, Xie SX, Alcalay RN, Chahine LM, Chen-Plotkin AS (2015): Plasma apolipoprotein A1 associates with age at onset and motor severity in early Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 30, 1648-1656
- Szklarczyk D, Morris JH, Cook H, Kuhn M, Wyder S, Simonovic M, Santos A, Doncheva NT, Roth A, Bork P, et al. (2017): The STRING database in

- 2017: Quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Res* 45, D362–D368
- Tamer C, Melek IM, Duman T, Öksüz H (2005): Tear film tests in Parkinson's disease patients. *Ophthalmology* 112, 1795
- Thambisetty M, Hye A, Foy C, Daly E, Glover A, Cooper A, Simmons A, Murphy D, Lovestone S (2008): Proteome-based identification of plasma proteins associated with hippocampal metabolism in early Alzheimer's disease. *J Neurol* 255, 1712–1720
- Thomas L: Labor und Diagnose. 6. Auflage; TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt/Main 2005
- Trepel M: Neuroanatomie. 7. Auflage; Urban&Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2017, 138-140
- Tsai PS (2006): Proteomic analysis of human meibomian gland secretions. *Br J Ophthalmol* 90, 372-377
- Tsuji F, Kawazu K (2012): Biomarker identification of tear fluid. *Metabolomics* 2, 1
- Tufekci KU, Meuwissen R, Genc S, Genc K (2012): Inflammation in Parkinson's disease. *Adv Protein Chem Struct Biol* 88, 69-132
- von Thun und Hohenstein-Blaul N, Funke S, Grus FH (2013): Tears as a source of biomarkers for ocular and systemic diseases. *Exp Eye Res* 117, 126-137
- Wagner P und Lang GK: Tränenorgane. In: Lang GK: Augenheilkunde. 5. Auflage; Thieme 2014, 52-54
- Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R (2013):  $\alpha$ -synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 81, 1604-1610
- Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Yan JX, Gooley AA, Hughes G, Humphery-Smith I et al. (1996): From proteins to

- proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology* 14, 61-65
- Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL (1996): Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 62, 325-327
- Yang C, Danielson EW, Qiao T, Metterville J, Brown RH, Landers JE, Xu Z (2016): Mutant PFN1 causes ALS phenotypes and progressive motor neuron degeneration in mice by a gain of toxicity. *Proc Natl Acad Sci* 113, E6209-E6218
- Yin GN, Lee HW, Cho JY, Suk K (2009): Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. *Brain Res* 1265, 158-170
- Yoon WT, Chung EJ, Lee SH, Kim BJ, Lee WY (2005): Clinical analysis of blepharospasm and apraxia of eyelid opening in patients with parkinsonism. *J Clin Neurol* 1, 159-165
- Zhao X, Xiao WZ, Pu XP, Zhong LJ (2010): Proteome analysis of the sera from Chinese Parkinson's disease patients. *Neurosci Lett* 479, 175-179
- Zhou L, Beuerman RW, Ang LP, Chan CM, Li SF, Chew FT, Tan DT (2009): Elevation of human  $\alpha$ -defensins and S100 calcium-binding proteins A8 and A9 in tear fluid of patients with pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 2077-2086
- Zhou L, Zhao SZ, Koh SK, Chen L, Vaz C, Tanavde V, Li XR, Beuerman RW (2012): In-depth analysis of the human tear proteome. *J Proteomics* 75, 3877-3885



## **Danksagung**

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Paul Lingor für die engagierte Betreuung und Förderung meiner Arbeit. Ohne seine fachliche Beratung und großartige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die zahlreichen und wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Studie und der schriftlichen Ausarbeitung sowie die geduldige Beantwortung meiner Fragen und für die Korrektur dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Franz Grus und Herrn Dr. rer. nat. und Dipl.-Biol. Sebastian Funke von der Universitätsmedizin Mainz für die massenspektrometrische Analyse, bei Herrn Dr. rer. nat. Andreas Leha für die sehr gute fachliche Beratung innerhalb der statistischen Auswertung sowie bei den Mitgliedern der AG Lingor bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere bei Dr. rer. nat. Anna Roser für die Mithilfe bei der Erstellung der Graphiken und bioinformatischen Analyse sowie bei unseren Parkinson Study Nurses, Gudrun Leyerer, Silke Jünemann, Jennifer Heinemann und Alexandra Helbing, für die Mithilfe bei der Probensammlung und -asservierung.