

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Institut für klinische Pharmakologie
Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger

**Endocannabinoide und andere Lipidmediatoren bei Morbus Parkinson-
assoziierten Schmerzen: Untersuchung mittels Quantitativer Sensorischer
Testung (QST)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Katharina Klatt-Schreiner

aus Gladkovka / Ukraine

Frankfurt am Main, 03.09.2021

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Institut für klinische Pharmakologie
Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt am Main
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger

**Endocannabinoide und andere Lipidmediatoren bei Morbus Parkinson-
assoziierten Schmerzen: Untersuchung mittels Quantitativer Sensorischer
Testung (QST)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Katharina Klatt-Schreiner

aus Gladkovka / Ukraine

Frankfurt am Main, 03.09.2021

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referentin: Prof. Dr. Irmgard Tegeder
Korreferent/in: Herr Prof. Dr. Georg Auburger
Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Abstract	6
3. Abkürzungsverzeichnis	8
4. Einleitung.....	9
5.1 Darstellung der Publikation	11
5.1.1 Methoden, Zielsetzung und Design der Studie.....	11
5.1.2 Schmerzbeurteilung	11
5.1.3 Quantitative sensorische Testung	12
5.1.4 Analyse der Fettsignalmoleküle	14
5.1.5 Datenanalyse und Statistik	14
5.2 Ergebnisse.....	16
5.2.1 Ergebnisse der Schmerzevaluation.....	16
5.2.2 Ergebnisse der quantitativen sensorischen Testung	17
5.2.3 Ergebnisse der Lipidanalyse	17
5.2.4 Zusammenhang zwischen Lipidprofil, QST und Schmerz.....	18
6. Diskussion.....	18
7. Publikation	22
8. Darstellung des eigenen Anteils.....	34
9. Literaturverzeichnis	35
10. Lebenslauf	41
11. Schriftliche Erklärung.....	43

1. Zusammenfassung

Morbus Parkinson ist die zweithäufigste neurodegenerativen Erkrankung, die durch Untergang der dopaminergen Neuronen im Mesenzephalon zu einer Störung des extrapyramidalen motorischen Systems führt. Daraus resultierende Bewegungsstörungen, zu denen Rigor, Tremor, Hypokinese und posturale Instabilität gehören, werden von nichtmotorischen Symptomen wie autonome Dysregulation, veränderte sensorische Wahrnehmung, sowie kognitive und psychische Störungen begleitet.

Mehrere Studien berichten über erhöhte Schmerzprävalenz bei Parkinson Patienten. Die genaue Pathogenese der gestörten Schmerzempfindung bleibt unklar. Zusätzlich zu den zentralen Mechanismen entstehen die Schmerzen bei Morbus Parkinson wahrscheinlich durch eine Schädigung der peripheren somatosensorischen und autonomen Neuronen, die sich in sensorischen Defiziten, sowie in erhöhter Schmerzempfindlichkeit manifestieren. Als Korrelat dazu wurden abnormale somatosensorisch evozierte Potenziale, pathologische Ergebnisse in der quantitativen sensorischen Testung und eine Abnahme der Nervenfaserdichte beschrieben.

Ein Schwerpunkt unserer Untersuchungen lag auf der Erforschung von potentiellen Veränderungen von Lipidsignalmolekülen. Eine Reihe von Studien zeigen eine Schmerzlinderung durch Cannabis-Einnahme, sowie eine Tendenz zur Schmerzentwicklung bei Parkinson Patienten mit dem bekannten FAAH-Polymorphismus. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Störung im Endocannabinoid-System höchstwahrscheinlich zu erhöhter Schmerzprävalenz bei Morbus Parkinson beiträgt. Eine weitere wichtige Lipid-Gruppe sind Glycosylceramide. Ihr Abbau kann durch heterozygote Mutationen des lipidabbauenden Enzyms Glukocerebrosidase 1 (GBA1) gestört sein. GBA1 Mutationen sind mit der schnell progredienten sporadischen Verlaufsform der Parkinson-Krankheit assoziiert.

Im Rahmen der Studie wurden zwei Kohorten von Parkinson Patienten analysiert. Die 128 Patienten aus Israel wurden im ersten Teil mit 224 jungen gesunden deutschen Probanden verglichen. Im zweiten Teil wurden 50 deutschen Patienten und 50 gesunde altersgleiche Probanden untersucht. Die Schmerzevaluation erfolgte anhand der "Brief

Pain Inventory“ und "Neuro Detect“ Fragebögen. Bei allen Probanden wurde quantitative sensorische Testung durchgeführt und die Plasmakonzentrationen der Lipidsignalmoleküle mittels quantitativer HPLC-Tandem-Massenspektrometrie analysiert.

Nach Auswertung der Schmerzevaluation konnte eine erhöhte Schmerzprävalenz bei Parkinson Patienten festgestellt werden. Die Prävalenz betrug 66% im ersten Teil der Studie und 74% in der deutschen Kohorte, im Vergleich zu 40% bei den altersgleichen gesunden Probanden. Ergebnisse der quantitativen sensorischen Testung zeigen einen Verlust der thermischen Empfindung (erhöhte Schwellen) bei der gleichzeitigen mechanischen Überempfindlichkeit (erniedrigte Schwellen). In der multivariaten Lipid-Analyse konnten erniedrigte Konzentrationen von Anandamid und Lysophosphatidsäure 20:4 und eine Erhöhung der Glucosylceramide nachgewiesen werden. Diese Veränderungen waren bei Parkinson Patienten mit Schmerzen stärker ausgeprägt. Außerdem wurde eine lineare Korrelation zwischen Glucosylceramiden (GlcCer 18:1, GlcCer 24:1) und der Schmerzintensität, sowie sensorischem Defizit festgestellt.

Nach sorgfältiger Auswertung der Studienergebnisse kommen wir zu der Schlussfolgerung, dass eine Veränderung der Endocannabinoide und der Glucosylceramide zur Pathogenese der Schmerzen und der sensorischen Neuropathie bei Morbus Parkinson beitragen. Die Erkenntnisse könnten zukünftig zur Diagnosestellung durch frühzeitige Erkennung prämotorischer sensorischer Symptome beitragen. Darüber hinaus könnten unsere Ergebnisse zur Therapieoptimierung durch Wiederherstellung der Lipid-Homeostases beitragen.

2. Abstract

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder that results in disruption of the extrapyramidal motor system due to loss of dopaminergic neurons in the mesencephalon. The resulting movement symptoms including rigor, tremor, hypokinesia, and postural instability, are accompanied by nonmotor symptoms such as autonomic dysregulation, altered sensory perception, and cognitive and psychological disturbances.

Several studies report increased pain prevalence in PD patients. The pathogenesis of PD-associated pain remains unclear. In addition to central mechanisms, pain in PD likely results from damage to peripheral somatosensory and autonomic neurons, manifested in sensory deficits, as well as increased pain sensitivity. As a correlate, abnormal somatosensory evoked potentials, pathological results in quantitative sensory testing, and decrease in nerve fiber density have been described.

We studied pain rating and QST in parallel with lipid Redoxstress molecules. Several studies have demonstrated relief of PD-associated pain from cannabis. Furthermore, PD patients carrying a FAAH polymorphism have an increased risk for PD-associated pain, suggesting that a disturbance in the endocannabinoid system may contribute to increased pain prevalence in PD. In addition to endocannabinoids, sporadic PD is associated with mutations in glucocerebrosidase 1 (GBA1), which is a lysosomal enzyme that degrades glucosylceramides. It is associated with the rapidly progressive sporadic form of PD.

Two cohorts of PD patients were analysed. In the first part, 128 patients from Israel were compared with 224 young healthy German subjects. In the second part, 50 German patients and 50 healthy age-matched subjects were studied. Pain evaluation was performed using "Brief Pain Inventory" and "Neuro Detect" questionnaires. Quantitative sensory testing was performed in all subjects, and plasma levels of lipid signal molecules were determined by targeted lipidomic analyses using HPLC-tandem mass spectrometry.

After evaluation of the pain assessment, an increased prevalence of pain was found in Parkinson's disease patients. The prevalence was 66% in the first part of the study and

74% in the German cohort, compared with 40% in age-matched healthy subjects. Results of quantitative sensory testing showed a predominant phenotype with loss of thermal sensitivity with concomitant mechanical hypersensitivity. Multivariate lipid analyses revealed decreased concentrations of anandamide and lysophosphatidic acid 20:4 and increased glucosylceramides. This change was more pronounced in PD patients with pain. In addition, a linear correlation was found between glucosylceramides (GlcCer 18:1, GlcCer 24:1) and pain intensity, as well as the sensory deficit.

We conclude that impaired lipid homeostasis may contribute to PD-associated pain and sensory neuropathy. Lipid analyses could be useful in future diagnostic methods and early assessment of premotor sensory symptoms. In addition, our results could contribute to therapy optimization by restoring lipid homeostasis.

3. Abkürzungsverzeichnis

PD – Morbus Parkinson (engl. Parkinson's disease)

AEA - Anandamid

2-AG - 2-Arachidonylglycerol

CB1 – Cannabinoid-Rezeptor 1

CB2 – Cannabinoid-Rezeptor 2

MAGL - Monoacylglycerin-Lipase

FAAH - Fettsäureamid-Hydrolase

BOLD - Blut-Sauerstoff-Level-abhängige Signale

GBA1 – Glucocerebrosidase 1

DHET - Dihydroxyicosatrienoid Säure

LPA – Lysophosphatidsäure

GlcCer - Glukosylceramid

QST – quantitative sensorische Testung

CDT – Kälteerkennungsschwelle (engl. cold detection threshold)

WDT – Wärmedetektionsschwelle (engl. warm detection threshold)

CPT – Kälteschmerzschwelle (engl. cold pain threshold)

HPT - Hitzeschmerzschwelle (engl. heat pain threshold)

TSL – thermische Unterschiedsschwelle (engl. thermal sensory limen)

PHS – paradoxe Hitzeempfindung (engl. paradoxical heat sensation)

WUR – Wind-up Ratio

MDT – mechanische Detektionsschwelle (mechanical detection threshold)

MPT – mechanische Schmerzschwelle (mechanical pain threshold)

MPS – mechanische Schmerzsensitivität (mechanical pain sensitivity)

ALL – dynamisch mechanische Allodynie (dynamic mechanical allodynia)

VDT – Vibrationsdetektionsschwelle (vibration detection threshold)

PPT – Druckschmerzschwelle (pressure pain threshold)

4. Einleitung

Morbus Parkinson ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen mit in den letzten Jahrzehnten deutlich zunehmender Inzidenz¹. Durch den Untergang der dopaminergen Neuronen der Substantia nigra im Mesencephalon kommt es zur Störung im extapyramidalen motorischen System. Daraus resultierende Rigor, Tremor, Hypokinese und posturale Instabilität prägen diese Krankheit und werden Kardinalsymptome genannt. Eine Reihe von nichtmotorischen Symptomen wie autonome Dysregulation, veränderte sensorische Wahrnehmung, sowie kognitive und psychische Störungen werden im Zusammenhang mit Morbus Parkinson beobachtet²⁻⁴.

Schmerzen sind mit einer Prävalenz bis zu 70% von besonderer Bedeutung⁵. Es werden nozizeptive, muskuloskelettale, dystone, neuropathische und viszerale Schmerzen unterschieden. Zu den neuropathischen Schmerzen gehören zentrale und periphere neuropathische Schmerzen^{6,7}. Bei einem Teil der Patienten wurde von einem Zusammenhang mit der stärker betroffenen Seite, sowie von partieller Schmerzlinderung nach Anti-Parkinson-Medikation berichtet^{4,7,8}. Zur Schmerztherapie kommen neben den traditionellen Analgetika wie nichtsteroidalen Antirheumatika unter anderem Neuroleptika und Antidepressiva zum Einsatz. Medizinisches Cannabis hat in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen.

Das Endocannabinoid-System, sorgt für die Synthese und den Abbau der körpereigenen Cannabinoide. Endocannabinoid sind an zahlreichen neurogenen Prozessen wie Gedächtnis, Lernen, Motivation und Schmerzen beteiligt. Zwei wichtigste Vertreter dieser Gruppe – Anandamid (AEA) und 2-Arachidonylglycerol (2-AG) binden an Cannabinoid-Rezeptor 1 und 2 (CB1 und CB2) und üben dadurch einen modulierenden Effekt auf das nozizeptive System aus. Ihre Konzentration wird u.a. durch die Enzyme Fettsäureamid-Hydroxylase (FAAH), sowie Monoacylglycerin-Lipase (MAGL) reguliert.

In mehreren Studien beschriebene Schmerzlinderung durch Cannabis-Einnahme deutet darauf hin, dass eine Störung im Endocannabinoid-System zu erhöhter Schmerzprävalenz bei Morbus Parkinson beitragen könnte⁹⁻¹¹. Diese Annahme wird durch eine Tendenz zur Schmerzentwicklung bei Parkinson Patienten mit einem bekannten FAAH-Polymorphismus verstärkt¹².

Besonders wichtig in diesem Kontext ist, dass cannabingerge und dopaminerge Schaltkreise sich gegenseitig in belohnungsassoziierten Gehirnzentren beeinflussen und auf diesem Wege das Gefühl der Schmerzlinderung auslösen^{13,14}. Multiple bildgebende Studien belegen eine Beeinträchtigung des zentralen nozizeptiven Systems bei Morbus Parkinson. Mittels funktioneller Magnetresonanztomographie konnten Veränderungen in den absteigenden nozizeptiven Bahnen^{15,16}, sowie erhöhte Blut-Sauerstoff-Level-abhängige (BOLT - blood oxygenation level dependent) Signale im parietalen Kortex, Insula und Striatum festgestellt werden, die auf eine gestörte Schmerzverarbeitung bei Parkinson Patienten hindeuten¹⁷⁻²¹.

Über die zentralen Mechanismen hinaus, haben Schmerzen bei Parkinson-Krankheit wahrscheinlich einen Ursprung in der Schädigung der peripheren somatosensorischen und autonomen Neuronen, die zu sensorischen Defiziten, autonome Dysfunktionen und erhöhter Schmerzempfindlichkeit resultiert. Als Korrelat dazu wurden abnormale somatosensorisch evozierte Potenziale (SEP)^{19,22,23}, pathologische Ergebnisse in der quantitativen sensorischen Testung (QST)^{15,24-26} und eine Abnahme der Nervenfaserdichte beschrieben²⁶. Die Schädigung der sensorischen Nervenfasern gehen mit Ablagerungen von α -Synuclein einher^{27,28}. Die Ausbreitung von α -Synuclein könnten von dem sensorischen Nervensystem ihren Ausgang nehmen. Dies wurde für autonome Nerven im Tierexperiment gezeigt. Eine frühzeitige Diagnosestellung anhand der prämotorischen sensorischen Symptome würde möglicherweise eine vorzeitige progressionsverlangsamende Therapie ermöglichen.

Neben Endocannabinoiden sind vermutlich Ceramide und Glucosylceramide an der Pathogenese der PD beteiligt. Heterozygoten Mutationen des lipidabbauenden Enzyms Glucocerebrosidase 1 (GBA1), sind mit der früh einsetzenden und schnell progredienten sporadischen Verlaufsform der Parkinson-Krankheit assoziiert²⁹⁻³¹. Zahlreiche experimentelle Studien lassen vermuten, dass GBA1-Mutationen die Toxizität von α -Synuclein erhöhten³²⁻³⁴.

In Anbetracht der potentiellen therapeutischen Implikationen und der Bedeutung der Beteiligung des sensorischen Systems bei Morbus Parkinson, kombinierten wir quantitative sensorische Tests mit komplexen Analysen von Signallipiden, um den

Zusammenhang von PD- Schmerzen und sensorischem Verlust mit Lipidveränderungen zu untersuchen.

5.1 Darstellung der Publikation

5.1.1 Methoden, Zielsetzung und Design der Studie

Es handelt sich um eine internationale Fall-Kontroll-Studie, die aus zwei Teilen bestand. Im ersten explorativen Pilotteil wurde der Plasmaspiegel bioaktiver Lipide von israelischen Parkinson-Patienten, die eine erhöhte Prävalenz für GBA1-Mutationen aufweisen, mit einer gesunden Kontrollgruppe aus Deutschland verglichen. Die Studie umfasste 85 Männer und 43 Frauen, die an Morbus Parkinson litten (mittleres Alter \pm SD, 69 ± 25 Jahre; Bereich 45-87 Jahre) und 224 junge gesunde Kontrollen (72 Männer, 152 Frauen; 28 ± 8 Jahre; Bereich 18-56 Jahre). Bei der Patientengruppe wurde zusätzlich eine QST für thermische Parameter durchgeführt.

Die zweite Studie nutzte die Erfahrungen der explorativen Pilotstudie. Alle Messungen erfolgten in einem akkreditierten QST-Labor durch einen zertifizierten Untersucher. Die Lipide wurden mit HPLC-MS-MS nach SOP analysiert. Dieser Teil umfasste eine Kohorte von 50 Parkinson-Patienten (34 Männer: 68 ± 8 Jahre; Bereich, 50-79 Jahre; 16 Frauen: 64 ± 9 Jahre; Bereich, 51-79 Jahre) und 50 gleichaltrigen gesunden Probanden (25 Männer: 65 ± 9 Jahre; Bereich, 51-79 Jahre; 25 Frauen: 61 ± 7 Jahre; Bereich, 50-79 Jahre), die innerhalb eines Jahres rekrutiert und untersucht wurden. Die Geschlechterverteilung spiegelt eine höhere Prävalenz von Morbus Parkinson bei dem männlichen Geschlecht wider.

5.1.2 Schmerzbeurteilung

Zur Schmerzbeurteilung füllten alle Probanden einen angepassten Schmerzfragebogen aus. Die demographischen und klinischen Daten bezüglich Alter, Geschlecht, ethnischer Zugehörigkeit, Krankheitsdauer und Verlauf, Komorbiditäten sowie Medikation inklusive Analgetika wurden anhand des Fragebogens erfasst. Bei Anwesenheit von Schmerzen wurden die Probanden gebeten, genauere Informationen zu Dauer, Lokalisation, Ausstrahlung, Intensität und Qualität anzugeben. In der Patienten-Gruppe wurde unter anderem ein möglicher Bezug zu motorischen Symptomen, sowie eine Relation zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ermittelt. Während im ersten Teil der Studie ein McGill

Fragenbogen zum Einsatz kam, wurde für die deutsche Kohorte ein kombinierter Fragebogen aus Teilen der deutschen Fassung des "Brief Pain Inventory" und des "Pain Detect" zusammengestellt³⁵. Basierend auf dem Interview und dem Fragebogen wurden die Schmerzen in muskuloskelettale, zentrale oder radikuläre/neuropathische Schmerzen und dystone/dyskinetische Schmerzen eingeteilt.

5.1.3 Quantitative sensorische Testung

Zur objektiven Beurteilung der sensorischen Defizite haben wir in der zweiten Studie bei allen Studienteilnehmern eine quantitative sensorische Testung durchgeführt. Quantitative sensorische Testung ist ein wichtiges nichtinvasives Verfahren zur Diagnostik der Polyneuropathien. Die vom "Deutschen Forschungsverbund Neuropathischer Schmerz" (DFNS) optimierte Methode erlaubt eine Einschätzung der Funktionsfähigkeit sowohl von stark myelinisierten als auch marklosen Nervenfasern und nimmt bei der Untersuchung der Small-Fiber-Neuropathie einen besonderen Stellenwert ein³⁶⁻³⁸. QST besteht aus einer Reihe an Tests, die dazu dienen, Empfindungs- und Schmerzschwellen für thermische und mechanische Reize, sowie Druckschmerz- und Vibrationsempfindungsschwelle zu ermitteln. Die Testbatterie beinhaltet sieben Untersuchungen, die zur Messung von 13 Parametern eingesetzt werden.

Die Probanden wurden nach einem standardisierten Protokoll in dem zertifizierten QST-Labor instruiert und getestet. Zu Beginn wurde eine kurze Testdemonstration an der palmaren Seite des distalen Unterarmes durchgeführt. Während der QST-Sitzung wurde die Haut des Hand- oder Fußrückens getestet. Da die erste Studie keine signifikanten Seitenunterschiede gezeigt hatte, wurde im zweiten Teil die Untersuchung an den Hand- und Fußrücken der stärker betroffenen Seite durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe wurde die Seite randomisiert ausgewählt. Bei Patienten mit Reaktionsschwankungen wurde die QST während der ON Periode durchgeführt.

Zur Beurteilung der thermischen Reize verwendeten wir den NeuroSensory Analyzer (Medoc Advanced Medical Systems Ltd. Israel 2003) mit einer Kontaktfläche von 3 x 3 cm². Die Ausgangstemperatur betrug 32° C und wurde vom Probanden als neutral empfunden. Im Verlauf hat sich die Thermode mit einer Temperaturveränderung von 1 C°/s bis zu den Grenztemperaturen von 0° C bzw. 52° C erwärmt oder abgekühlt. Die

Teilnehmer wurden initial aufgefordert, eine Stoptaste zu drücken, sobald sie Kälte oder Wärme wahrgenommen haben (CDT – cold detection threshold; WDT – warm detection threshold). Im nächsten Test sollten sich die Probanden bei Beginn des Kälte- und Hitzeschmerzes die Maustaste betätigen (CPT – cold pain threshold; HPT – heat pain threshold). Nach dreimaliger Wiederholung wurde für jeden Test (CDT, WDT, CPT, HPT) ein Mittelwert berechnet. Die thermische Unterschiedsschwelle (TSL - thermal sensory limen) mit paradoxer Hitzeempfindung bei Kältestimulation (PHS - paradoxical heat sensation) ist ein weiterer Bestandteil der QST, bei dem die Kälte- und Wärmereize schnell nacheinander appliziert und die Anzahl angegebenen Hitzewahrnehmungen bei Temperaturabfall detektiert werden. TSL wird als Differenz zwischen den arithmetischen Mittelwerten der Wärme- und Kälteerkennungsschwellen (jeweils drei Messungen für beide Qualitäten) berechnet. Dieser Teil der QST ist für die Erforschung der Funktionsfähigkeit der A-Delta- und C-Fasern von besonderer Relevanz.

Zur Messung der mechanischen Detektionsschwellen verwendeten wir modifizierte von Frey-Filamente (Optihair₂-Set Marstock Nervtest, Deutschland). Die zwölf logarithmisch kalibrierten von Frey Filamente mit abgerundeter Spitze haben eine Kontaktfläche von 0,5 mm. Während der Untersuchung können somit die Kräfte im Bereich von 0,25 mN bis 512 mN ausgeübt werden. Die endgültige Schwelle wurde anhand einer modifizierten Grenzwertmethode (method of limits) berechnet. Die Schwelle wurde als ein geometrisches Mittel aus fünf Serien auf- und absteigender Reizintensitäten definiert. Diese Untersuchung gibt Aufschluss über die Schädigung der A-beta-Fasern.

Die mechanische Schmerzschwelle (MPT) wurde mittels Pinprick-Stimulation (MRC System, Deutschland) ermittelt. Sieben gewichtete Pinprick-Stimulatoren mit einem Kraftspektrum von 8 mN und 512 mN besitzen eine Kontaktfläche von 0,25 mm im Durchmesser. Der Gesamtwert wurde ähnlich wie bei MDT aus dem geometrischen Mittel der fünf Serien auf- und absteigender Reizintensitäten angewendet. MPT dient zur Beurteilung der Funktionalität insbesondere der A-Delta-Fasern.

Die Vibrationsdetektionsschwelle ist eine Untersuchung zur Untersuchung von "small fiber" Neuropathien. Sie untersucht die Funktionalität der A-Beta-Fasern und wurde mit der Rydel-Seiffer-Stimmgabel 128 Hz, 8/8 Skala durchgeführt. Die Stimmgabel wurde zunächst zum Vibrieren gebracht und im Anschluss auf den Knochenvorsprung -

Processus styloideus ulnae und Malleolus medialis - platziert. Die Probanden wurden aufgefordert sich zu melden, sobald sie keine Vibration mehr spürten. Als Schwelle wurde der arithmetische Mittelwert der drei gemessenen Werte angegeben.

Der letzte Test der QST dient zur Beurteilung der Druckschmerzschwelle (PTT). Dafür verwendeten wir ein Algometer, das eine Kontaktfläche von 1 cm² besitzt und Kräfte bis zu 2000 kPa mit einer handgeführten Intensitätssteigerung ermöglicht (FDN200, Wagner Pain Test, USA). Das Algometer wurde auf die Eminenz des –Thenarmuskels (Musculus abductor hallucis) gesetzt. Die endgültige Schwelle wurde als Durchschnitt von drei ermittelten Werten definiert. Die PPT zeigt die Störung der Tiefenschmerzempfindlichkeit, die wahrscheinlich durch A-Delta- und C-Fasern des Muskels vermittelt wird.

Aufgrund des Alters und des Zustandes unserer Patienten wurde die Prüfung der mechanischen Schmerzempfindlichkeit (MPS – mechanical pain sensitivity), dynamischen mechanischen Allodynie (ALL) und der Wind-up Ratio Test (WUR) ausgelassen. Somit bestand das Set aus neun Parametern für obere und untere Extremität.

5.1.4 Analyse der Fettsignalmoleküle

Die Blutproben wurden in K3-Ethylendiamintetraessigsäure-Röhrchen (Microvette Sarstedt) entnommen, auf Eis gelagert und innerhalb von 15-20 Minuten in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) bei 2000 g und 4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert. Die Plasma-Aliquots wurden sofort nach der Zentrifugation eingefroren und bei -80 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Bioaktive Lipide einschließlich Sphingolipide und Ceramide, Lysophosphatidsäuren, Endocannabinoide, Eicosanoide (Oxylipide) und Pterine wurden im Plasma mittels Flüssigchromatographie-Elektrospray-Ionisations-Tandem Massenspektrometrie analysiert. Die Analytik wurde im zertifizierten Labor des Instituts für Klinische Pharmakologie unter der Leitung von Dr. Dominik Thomas und Dr. Robert Gurke durchgeführt. Die analytischen Protokolle sind bei BioSciences mit der Zugriffsnummer S-BSST389 hinterlegt.

5.1.5 Datenanalyse und Statistik

Die QST-Daten wurden in Abhängigkeit vom Alter, vom Geschlecht und von der getesteten Stelle mit Referenzwerten einer Datenbank verglichen. Angesichts der

Tatsache, dass für Probanden über 70 Jahre keine Normwerte in der Datenbank vorliegen, kamen die Referenzwerte der 60-70-jährigen zum Einsatz. Alle Schwellenwerte (CPT und HPT ausgeschlossen) wurden nach QST-Auswertungsprotokoll logarithmisch transformiert und anschließend in die z-Scores umgewandelt. In der Publikation sind die QST-Ergebnisse in der Abbildung 1 dargestellt.

Die Ergebnisse des Schmerzfragebogens wurden nach Chi-Quadrat-Test analysiert und in Form von Säulendiagrammen abgebildet (Abb.1 E). Bei der statistischen Analyse der gemessenen Lipidkonzentrationen kamen SPSS 25, Origin Pro 2020 und GraphPad Prism 8.0 zum Einsatz. Die Auswertungen wurden von Prof. Dr. Irmgard Tegeder gemacht. Die Häufigkeitsverteilungen der Lipide wurden gemäß Gauß-Kurven, log-Gauß-Kurven oder der Summe von 2 Gauß-Kurven basierend auf den Best-Fit-Werten angepasst. Die Normalität der Verteilung wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test, dem Anderson-Darling-Test sowie Quantil-Quantil-Diagrammen. Die Varianzen wurden mit dem Levene-Test geprüft.

Für die multivariaten Analysen wurden die Lipiddaten (lineare Konzentrationen) auf den Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe normiert, da sich Lipide verschiedener Klassen um mehrere Größenordnungen unterscheiden. Die Verhältnisse wurden für weitere Analysen verwendet.

Die kanonische Diskriminanzanalyse (CanDisc) und Methode der kleinsten Quadrate wurden verwendet um die Dimensionalität zu reduzieren und die Faktoren zu identifizieren, die am besten zwischen den Gruppen unterscheiden können. Gruppenzugehörigkeit, Geschlecht, Alter, Body Mass Index (BMI), Schmerzintensität, Art des Schmerzes und Medikation wurden als unabhängige Faktoren betrachtet. CanDisc wurde verwendet um die Vorhersagbarkeit der Gruppenzugehörigkeit zu beurteilen.

Die Plasmakonzentrationen wurden zwischen den Gruppen mittels univariater oder 2-Wege-Varianzanalysen (ANOVA) oder t-Tests je nach Struktur und Verteilung der Daten verglichen. Im Falle von Verletzungen der Normalität und Log-Normalität wurden nichtparametrische Tests verwendet (Mann-Whitney U oder Kruskal-Wallis). Alter, Geschlecht, BMI und Angaben der visuellen Analogskala wurden als Kovariaten eingeführt, und bei anwesender Signifikanz, wurden weitere Analysen der

Gruppenunterschiede durchgeführt. Zum Beispiel wurden in 2-Wege-ANOVAs Gruppe × Geschlecht verglichen, Gruppe × Schmerz und Gruppe × Sensibilitätsverlust. Im Falle signifikanter Ergebnisse der ANOVAs wurden die Gruppen mit t-Tests miteinander verglichen. Die P-Werte wurden nach den Verfahren von Dunnett (versus 1 Kontrollgruppe) oder Šidák angepasst. Weitere Analysen bestanden aus χ^2 Statistiken für nominale Daten und lineare Regressionsanalysen. Das α -Niveau wurde für alle Vergleiche auf 0,05 festgelegt.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Ergebnisse der Schmerzevaluation

Vergleiche der demographischen Daten einschließlich Alter, Geschlecht, Krankheitsdauer und -schwere, Medikation, Analgetika und Schmerzbewertungen zeigen, dass die Schlüsselparameter in beiden Populationen sehr ähnlich waren. Das Durchschnittsalter in der deutschen Patientengruppe lag bei 66,8 Jahren und die Hoehn und Yahr-Skala bei 2,5. Die israelischen Patienten waren 69 Jahre alt und hatten einen mittleren Unified Parkinson's Disease Rating Scale (UPDRS) von 25. In Bezug auf die Geschlechtsverteilung lag die Männerquote bei zwei Drittel in beiden Populationen (34 Männer, 16 Frauen in der deutschen und 85 Männer, 43 Frauen in der israelischen Kohorte).

Nach Auswertung der Schmerzfragebögen kamen wir zu dem Ergebnis, dass Parkinson Patienten im Vergleich zu den altersgleichen Kontrollen deutlich häufiger unter Schmerzen leiden. Chronische erkrankungsassoziierte muskuloskelettale, neuropathische oder dyskinetische/dystonische Schmerzen traten bei 66% der israelischen Parkinson-Patienten. In der deutschen Studie erreichte der Wert 74%, war bei dem männlichen Anteil höher und fast doppelt so hoch wie in der altersgleichen Kontrollgruppe (40%).

Bezüglich des Schmerzmanagements fiel ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen auf: während 80% aller Kontrollprobanden bei Anwesenheit von chronischen Schmerzen eine analgetische Therapie erhielten, lag der Anteil in der Patientengruppe bei 50%. Die Schmerzmedikation umfasste neben den klassischen Medikamenten wie nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID) weitere Opioid- und Nichtopioid-Analgetika,

sowie Benzodiazepine, Antiepileptika und Antidepressiva. Bei den israelischen Patienten wurde zudem bei einigen Patienten medizinischer Cannabis eingesetzt (bei 15 Patienten). Diese Patienten unterschieden sich nicht von den anderen PD Patienten hinsichtlich der Endocannabinoide.

5.2.2 Ergebnisse der quantitativen sensorischen Testung

Bei der QST-Auswertung ließ sich ein Verlust der Kälte- und Wärmeempfindung bei einer erhöhten Rate an paradoxen Hitzeempfindungen und gestörte Vibrationswahrnehmung feststellen am Fuß. Dies war begleitet von einer mechanischen Schmerzüberempfindlichkeit an der Hand. Während die Veränderung der thermischen Parameter an den Füßen stärker zur Ausprägung kam, war der mechanische Wert besonders an Händen erhöht. Der sensorische Phänotyp der Parkinson-Patienten – Verlust der thermischen Empfindung in Kombination mit der erhöhten mechanischen Schmerzempfindlichkeit – stimmt mit den QST-Phänotypen von klein- oder gemischtfasrigen sensorischen Neuropathien überein. Diese Veränderung war bei männlichen Patienten im Vergleich zu weiblichen Patienten stärker ausgeprägt.

5.2.3 Ergebnisse der Lipidanalyse

Die Lipidanalyse ergab eine erniedrigte Konzentration der Endocannabinoide bei Parkinson-Patienten beider Populationen. Besonders ausgeprägt zeigte sich die Veränderung vom Anandamid-Spiegel im Vergleich zu den alters- und geschlechtsangepassten gesunden Kontrollprobanden. Weitere relevante Konzentrationsabsenkung ließen sich bei mehrfach ungesättigten Lysophosphatidsäuren (LPA18:2, LPA20:4) und bei Omega-Oxylipiden (Dihydroxyeicosatriensäure - DHET) feststellen. Im Gegensatz dazu waren die Plasmakonzentrationen von Glucosylceramiden (besonders GlcCer18:1 und GlcCer24:1) bei Parkinson Patienten erhöht.

Ein zusätzlicher Anstieg der nicht-glykosylierten Ceramide wurde nur bei israelischen Parkinson Patienten beobachtet. Eine mögliche Erklärung dafür wäre ein Anstieg der Ceramide mit zunehmendem Alter oder erhöhte Prävalenz von GBA1-Mutationen im Vergleich zur deutschen Kohorte.

5.2.4 Zusammenhang zwischen Lipidprofil, QST und Schmerz

Die Veränderungen in der Lipid-Homeostase, nämlich eine Reduktion vom Anandamid, DHET sowie LPA20:4 und Anstieg der Glucosylceramide (GlcCer), war bei Patienten mit sensorischem Verlust stärker ausgeprägt. Eine weitere Assoziation bestand zwischen Lipidveränderungen und Schmerzarten. So zeigten Parkinson-Patienten mit neuropathischen und dyskinetischen Schmerzen höhere GlcCer- und niedrigere AEA-Konzentration als Patienten ohne Schmerzen oder mit muskuloskelettalen Schmerzen. Unter Berücksichtigung der demographischen Daten waren die GlcCer-Werte bei Patienten mit dem höheren Hohn und Yahr Score besonders hoch. Dies erreicht jedoch nicht statistische Signifikanz. Niedrige LPA20:4 Konzentrationen waren signifikant mit den hohen Hohn & Yahr Scores assoziiert. Die Subgruppenanalyse zeigte einen Zusammenhang zwischen der Störung in der Lipid-Homeostase (insbesondere bei GlcCer, AEA und LPA) und Entwicklung von sensorischen Neuropathien bei Morbus Parkinson.

Diese Annahme wird weiter durch lineare Regressionsanalysen der Lipidkonzentrationen gegen den summierten QST-Score für sensorischen Verlust und für Schmerz unterstützt. In der Tat gab es eine lineare Beziehung zu den sensorischen Defiziten: je niedriger der AEA- oder LPA20:4-Wert und je höher die GlcCer-Konzentration waren, desto stärker war der sensorische Verlust ausgeprägt.

6. Diskussion

Die Schmerzwahrnehmung erfolgt auf verschiedenen Ebenen – es sind sensorisch-diskriminative, affektive und kognitive Dimensionen des Schmerzes bekannt. Folglich resultiert gestörte Verarbeitung der nozizeptiven Reize auf einer oder mehreren Ebenen in der veränderten Schmerzempfindung.

Zahlreiche Studien haben sich mit pathologischen Veränderungen der zentralen Schaltkreise bei Morbus Parkinson beschäftigt. Eine große Review Studie von Chudler et al. demonstriert unter Einsatz elektrophysiologischer, neuroanatomischer, sowie bildgebender Verfahren einen möglichen Einfluss der Basalganglien auf die Schmerzverarbeitung³⁹. Basalganglien scheinen alle oben genannten Schmerzdimensionen zu beeinflussen. Zudem haben sie einen schmerzmodulierenden

Effekt und nehmen somit eine besondere Stellung bei der Regulierung der nozizeptiven Information ein. Diese Annahme wurde in weiteren Studien unter Anwendung der somatosensorisch evozierten Potentiale (SEP)^{19,22–24,40}, sowie Blut-Sauerstoff-Level-abhängigen (BOLD) Signale in funktionellen Bildgebungsstudien bestätigt^{17–21}.

In unserer Studie haben wir somatosensorische Funktionsstörung als weitere mögliche Ursache für erhöhte Schmerzprävalenz bei Morbus Parkinson untersucht. Die Ergebnisse der QST zeigen einen Verlust der thermischen Empfindung mit erhöhter Rate an paradoxen Hitzeempfindungen und eine Überempfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen. Diese Befundkonstellation ist in Zusammenhang mit klein- oder gemischtfaserigen sensorischen Neuropathien bekannt. Somatosensorische oder autonome Neuropathien präsentieren sich klinisch oft als brennende und viszerale Schmerzen. Eine weitere nicht ausreichend erforschte Manifestation könnten zentralen Muskelschmerzen darstellen. Tatsächlich scheinen bestimmte Varianten der Fibromyalgie mit einer kleinfaserigen Polyneuropathie assoziiert zu sein^{41,42}. Folglich könnten sowohl der brennende neuropathische, als auch die muskuläre Schmerzen von der Polyneuropathie stammen.

Derzeit bleibt unbekannt, warum olfaktorische, somatosensorische und autonome sensorische Neuronen für die Veränderungen bei Morbus Parkinson besonders anfällig sind. Es wird angenommen, dass diese Vulnerabilität durch pathologische Proteinaggregate, ineffiziente Proteinabfallbeseitigung und dysfunktionale Mitochondrien zustande kommt^{43,44}. Besonders wichtig in diesem Kontext ist die Annahme, dass das periphere Nervensystem, sowie das olfaktorische System Ausgangstellen für die Ausbreitung von pathologischem α -Synuclein sein könnten^{27,45–47}.

Ein weiterer Schwerpunkt unserer Studie lag auf der Erforschung verschiedener Lipidsignalmoleküle. Es wurden erniedrigte Konzentrationen von Endocannabinoiden bei gleichzeitig erhöhten Plasmakonzentrationen der Glucosylceramide bei Parkinson-Patienten festgestellt. Diese Veränderung der Lipid-Homeostase korrelierte mit dem mittels QST gemessenen Empfindungsverlust, sowie mit der Schmerzintensitätsbewertung, letzteres nur mit erhöhten GlcCer. Plasmakonzentrationen sind deskriptiv und erlauben keine Schlussfolgerung hinsichtlich

der möglichen Kausalität. Unter Berücksichtigung der hohen Prävalenz von GBA1-Mutation sowie dem Vorliegen von GBA1 Aktivitätsmangel auch in Abwesenheit bekannter Mutationen, sowie dem klinischen Profit der Cannabiseinnahme bei Parkinson Patienten, erscheint die pathogene Rolle der Lipide bei der Entstehung der Polyneuropathie möglich.

Weitere Studien unterstützen diese Annahme: bei Nagetieren mit Methylphenidat MPP+ induzierter Parkinson-Krankheit zeigen die Cannabinoide einen neuroprotektiven Effekt⁴⁸. Der Verlust von Anandamid in dorsalen Wurzelganglien bei Verletzung des Ischiasnervs ist mit nozizeptiver Überempfindlichkeit verbunden, die auch bei Mäusen bei Fehlen des CB1 Rezeptors in somatosensorischen Neuronen auftritt⁴⁹⁻⁵¹. Die Ergebnisse in Tiermodellen lassen eine wichtige Funktion von Anandamid für die Integrität der sensorischen Neuronen vermuten.


Angesichts der Tatsache, dass eine herabgesetzte GBA1-Aktivität bei Parkinson Patienten unabhängig von der Anwesenheit der GBA1-Mutation nachgewiesen wurde⁵², trägt dieses Enzym oder seine Metaboliten möglicherweise zur Entwicklung der sensorischen Neuropathie bei. Die genauen pathophysiologischen Wege inwieweit die GlcCer die sensorischen Neuronen beeinflussen sind unklar. Die Anhäufung von GlcCer in den Lysosomen kann zu Defekten der lysosomalen Wanderung, zu einem Membranleck und möglicherweise zum Ausstoßen von GlcCer-beladenen Lysosomen führen. Letzteres würde hohe extrazelluläre GlcCer Konzentrationen im Plasma erklären^{53,54}. Es gibt Hinweise darauf, dass eine geringe Aktivität des GlcCer-metabolisierenden Enzyms, GBA1 die Toxizität von α -Synuclein erhöht^{30,32,55-59}. Unterstützend für diese Annahme ist die erhöhte Konzentration von Ceramiden und GlcCer in Riechkolben von Parkinson-Mäusen, die der Entwicklung von motorischen Dysfunktionen vorausgeht⁶⁰. Anhand dieser Befunde kann spekuliert werden, dass GlcCer nicht nur Marker, sondern funktionell relevante Faktoren für die Entwicklung und Progression von sensorischen Neuropathien und Schmerzen bei Morbus Parkinson sind.

Unsere Forschungsergebnisse sind für die zukünftige Optimierung der analgetischen Therapie bei Morbus Parkinson möglicherweise von Bedeutung. Denn sowohl der Verlust von Anandamid als auch die GlcCer-Akkumulation sind theoretisch medikamentös behandelbar. Im Falle des Endocannabinoid-Mangels können die

Patienten von der Behandlung mit medizinischem Cannabis profitieren. Zur GlcCer-Reduktion könnten die bewährten Therapiemaßnahmen der Gaucher Krankheit, nämlich Enzyersatztherapie oder Substratreduktion, eingesetzt werden, um den enzymatischen Abbau zu steigern oder die Bildung zu reduzieren. In diesem Zusammenhang könnte das bewährte Expektorans, Ambroxol als hilfreiche add-on Therapie von klinischem Nutzen sein. Es bewirkt eine Nachfaltung des GBA1 und fördert damit den lysosomalen Import. Klinische Studien bei PD zeigen bisher eine gute klinische Verträglichkeit. Ein Wirksamkeitsnachweis steht jedoch noch aus.

RESEARCH ARTICLE

High Glucosylceramides and Low Anandamide Contribute to Sensory Loss and Pain in Parkinson's Disease

Katharina Klatt-Schreiner,¹ Lucie Valek, PhD,¹ Jun-Suk Kang, MD,² Alexander Khlebtovsky, MD,^{3,4} Sandra Trautmann, PhD,¹ Lisa Hahnefeld,¹ Yannick Schreiber, BSc,⁴ Robert Gurke, PhD,¹ Dominique Thomas, PhD,¹ Annett Wilken-Schmitz,¹ Sabine Wicker, MD,⁵ Georg Auburger, MD,² Gerd Geisslinger, MD, PhD,^{1,6,7} Jörn Löttsch, MD, PhD,^{1,6,7} Waltraud Pfeilschifter, MD,² Ruth Djaldetti, MD,^{3,4} and Irmgard Tegeder, MD^{1*} 

¹Institute of Clinical Pharmacology, Goethe-University, Medical Faculty, Frankfurt, Germany

²Department of Neurology, Goethe-University Hospital Frankfurt, Germany

³Department of Neurology, Rabin Medical Center, Petach Tiqva, Israel

⁴Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

⁵Occupational Health Service, Goethe-University Hospital, Frankfurt, Germany

⁶Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Branch Translational Medicine, Frankfurt, Germany

⁷Fraunhofer Cluster of Excellence for immune mediated diseases (CIMD)

ABSTRACT: Background: Parkinson's disease (PD) causes chronic pain in two-thirds of patients, in part originating from sensory neuropathies. The aim of the present study was to describe the phenotype of PD-associated sensory neuropathy and to evaluate its associations with lipid allostasis, the latter motivated by recent genetic studies associating mutations of glucocerebrosidase with PD onset and severity. Glucocerebrosidase catalyzes the metabolism of glucosylceramides.

Methods: We used quantitative sensory tests, pain ratings, and questionnaires and analyzed plasma levels of multiple bioactive lipid species using targeted lipidomic analyses. The study comprised 2 sets of patients and healthy controls: the first 128 Israeli PD patients and 224 young German healthy controls for exploration, the second 50/50 German PD patients and matched healthy controls for deeper analyses.

Results: The data showed a 70% prevalence of PD pain and sensory neuropathies with a predominant phenotype

of thermal sensory loss plus mechanical hypersensitivity. Multivariate analyses of lipids revealed major differences between PD patients and healthy controls, mainly originating from glucosylceramides and endocannabinoids. Glucosylceramides were increased, whereas anandamide and lysophosphatidic acid 20:4 were reduced, stronger in patients with ongoing pain and with a linear relationship with pain intensity and sensory losses, particularly for glucosylceramide 18:1 and glucosylceramide 24:1.

Conclusions: Our data suggest that PD-associated sensory neuropathies and PD pain are in part caused by accumulations of glucosylceramides, raising the intriguing possibility of reducing PD pain and sensory loss by glucocerebrosidase substituting or refolding approaches. © 2020 The Authors. *Movement Disorders* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of International Parkinson and Movement Disorder Society.

Key Words: endocannabinoids; lipidomic analysis; pain; quantitative sensory testing; sensory neuropathy

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

*Correspondence to: Prof. Irmgard Tegeder, Goethe-University of Frankfurt, Medical Faculty, Dept. of Clinical Pharmacology, Theodor Stern Kai 7, Bd. 74, 4th Fl, 60590 Frankfurt am Main, Germany; E-mail: tegeder@em.uni-frankfurt.de

Relevant conflicts of interest/financial disclosures: The authors declare no financial or other competing interests. The funding organizations had no role in data acquisition, analysis, or decision to publish the results.

Funding agencies: The study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (CRC1039, A03 to I.T.; CRC1039, Z01 to G. G.; CRC1080, A03 to I.T.) and the Fraunhofer Cluster of Excellence for immune-mediated diseases (CIMD).

Received: 15 February 2020; **Revised:** 19 May 2020; **Accepted:** 8 June 2020

Published online 11 July 2020 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/mds.28186

Parkinson's disease (PD) is a chronic progressive neurodegenerative disorder with a predominant loss of dopaminergic neurons in the midbrain, resulting essentially in motor dysfunctions. However, PD also causes a number nonmotor and premotor phenomena including autonomic, sensory, mental, and psychological symptoms.¹⁻³ Pain is the most common and primary nonmotor manifestation.⁴ It manifests as musculoskeletal, dyskinetic, dystonic, radicular, or central neuropathic and visceral pain,^{5,6} and about two-thirds of PD patients experience pain related to the disease,^{4,7,8} some responding to antiparkinsonian medication, but others suffering from persistent pain.

Some relief is often provided by cannabis,⁹⁻¹¹ pointing to putative dysfunctions of the endogenous cannabinoid system,¹⁰ supported by associations of PD pain with polymorphisms of fatty acid amide hydrolase (FAAH), a key enzyme of anandamide metabolism.¹² Importantly, cannabinergic and dopaminergic circuits regulate each other in reward-associated brain centers¹³ and likely contribute to the feeling of pain relief.^{14,15} Functional magnetic resonance brain imaging studies have shown alterations of inhibitory pain control in PD^{16,17} and increased bold signals in parietal cortex, insula, and striatum contributing to heightened pain processing in PD.¹⁸⁻²²

Above these central mechanisms, PD pain likely originates from damage of peripheral somatosensory and autonomic neurons, leading to sensory deficits but also heightened pain sensitivity²³⁻²⁵ with abnormal somatosensory evoked potentials,^{19,26,27} pathological quantitative sensory tests (QSTs),^{8,16,28} and loss of epidermal nerve fiber density. Sensory fiber damage concurs with depositions of α -synuclein,^{23-25,29} and it has been suggested that α -synuclein spreading may originate from the sensory nervous system,^{25,30,31} giving rise to the intriguing idea that early diagnosis of premotor sensory loss may allow for motor-preserving, progression-slowing treatments in the future.

Above endocannabinoids, recent research has strengthened the idea of pathogenic lipid allostasis owing to the discovery of heterozygous mutations of the lipid-degrading enzyme glucocerebrosidase (GBA1) in association with early-onset and rapidly progressive sporadic PD.³²⁻³⁵ Importantly, *in vitro* models revealed that mutant GBA1 increases the toxicity of α -synuclein.³⁶⁻³⁸

Given the putative therapeutic implications and the importance of the involvement of the sensory system in PD, we combined quantitative sensory testing with complex analyses of signaling lipids using targeted lipidomic analyses, including endocannabinoids, sphingolipids, ceramides, glycerophospholipids, and oxylipids to evaluate the contribution of lipid allostasis in the etiopathology of PD-associated pain and sensory loss.

Methods

Study Objectives and Design

The first and second parts of the study were done successively and included 2 separate populations of PD patients, one from Israel, where GBA1 mutations are highly prevalent³⁹ and one from Frankfurt, Germany, and 2 sets of healthy controls both recruited in Frankfurt.

The first exploratory pilot part compared plasma levels of bioactive lipids of Israeli PD patients (85 men, 43 women; mean age \pm SD, 69 ± 25 years; range, 45–87 years) with 224 young healthy controls (72 men, 152 women; 28 ± 8 years; range, 18–56 years). Samples of PD patients and controls were analyzed in successive analytical sessions. QSTs for thermal parameters were performed in PD patients only. The normalization of QSTs to age and sex⁴⁰ pointed to sensory losses.

The second study used the experiences of the exploratory pilot study and addressed its shortcomings in terms of age differences, QST settings, and preanalytical procedures. The second part compared sensory functions according to standardized QSTs in an accredited QST laboratory by a certified investigator, and lipids were studied more extensively with up-to-date technology in a quality management-regulated laboratory. This part comprised 50 PD patients (34 men: 68 ± 8 years; range, 50–79 years; 16 women: 64 ± 9 years; range, 51–79 years) and 50 age-matched healthy controls (25 men: 65 ± 9 years; range, 51–79 years; 25 women: 61 ± 7 years; range, 50–79 years), who were recruited consecutively within 1 year. The sex distribution reflects a higher prevalence of PD in males. The sample size was estimated on endocannabinoid results of cohort 1 using a power of 80% and α error of 0.05. The samples were collected, preprocessed, and analyzed according to standard operating procedures. The primary statistical analyses are based on the optimized second part of the study.

The studies were approved by the respective institutional ethics committees, and all patients and controls signed an informed consent form to participate in the study. Data acquisition and blood sample collection adhered to the Declaration of Helsinki. Detailed information about patient recruitment and assessment of pain and sensory functions are provided as the supplementary file Supplementary Methods_Pain and QST. Demographic data are provided in Supplementary Tables 1A–D (Excel file).

Pain Assessment and Quantitative Sensory Testing

Patients were interviewed using a structured questionnaire. Items included demographic and clinical data including age, sex, ethnicity, disease duration and

course, comorbidities, and medication including analgesics. Patients were asked if they experienced pain and if yes, to describe the location, distribution, intensity (on a scale of 0–10, where zero is no pain and 10 is extreme pain) during rest and during movement, quality, duration (hours per day), and time of onset in relation to the motor symptoms, and first diagnosis of PD. The patients also filled the short McGill questionnaire (Israel) or the Brief Pain Inventory (Germany) for evaluation of pain intensity and the Pain Detect questionnaire (Germany) for detection of neuropathic pain.⁴¹ Based on interview and questionnaires, pain was categorized as musculoskeletal, central, or radicular/neuropathic pain and dystonic/dyskinetic pain. Participants with 1 or more of these types were considered positive for PD-related pain.^{8,12,42}

Quantitative sensory tests (QSTs)^{43,44} were performed to assess somatosensory manifestations of PD including small-fiber neuropathies.⁴⁵ Subjects were instructed and tested according to standardized protocols in a comfortable position in a quiet room. During QST sessions, the skin of the dorsum of the hand or foot of the right or left side was tested. Because the first study did not reveal significant side differences, subsequent QST studies in the Frankfurt population were done on the hand and foot dorsum of the most affected side. If there was no side difference, the side was randomly chosen as in the control group. For patients with response fluctuations, QST was assessed during the ON period.

The standardized QST battery according to the German Research Network on Neuropathic Pain protocol⁴⁰ begins with the determination of thermal thresholds for perception and then for pain, followed by mechanical thresholds and vibration detection. The QST procedures can be chronologically listed as follows. Cold and warm detection thresholds (CDT, WDT), number of paradoxical heat sensations (PHSs) during testing of thermal sensory limen (TSL), cold and heat pain thresholds (CPT, HPT), mechanical detection, and pain thresholds, vibration detection threshold (VDT), and pressure pain threshold.^{40,46} Owing to the age and condition of our patients, testing of dynamic mechanical allodynia and windup ratio were left out. Hence, the set consisted in each nine parameters for hand and foot. Detailed descriptions of the stimuli are provided in Supplementary Methods — Pain and QST.

Analysis of Lipid-Signaling Molecules

Blood samples were collected in K₃-ethylenediaminetetraacetic acid tubes (Microvette Sarstedt), kept on ice, and centrifuged in a tabletop centrifuge (Eppendorf) at 2000g and 4°C for 10 minutes within 15–20 minutes. Plasma aliquots were

immediately frozen after centrifugation and kept at –80°C until analysis.

Bioactive lipids including sphingolipids and ceramides, lysophosphatidic acids, endocannabinoids, eicosanoids (oxylipids), and pterins were analyzed in plasma by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry as described in detail in reference 47. The analytical methods were optimized on the basis of methods reported in our previous studies.^{48–52} Detailed analytical protocols are provided in Supplementary Analytical Protocols, which have been deposited at BioSciences with the accession S-BSST389 and are an updated version of the protocols in reference 47.

Data Analysis and Statistics

Lipid concentrations are presented as scatterplots with mean ± standard deviation (SD) or box-scatter plots, in which the box is the interquartile range, the whiskers show minimum to maximum, and the line is the median. Data were analyzed with SPSS 25, Origin Pro 2020, and GraphPad Prism 8.0. The frequency distributions of lipids were fitted according to Gauss curves, log-Gauss curves, or the sum of 2 Gauss curves, based on the best-fit values. Normality of distribution was assessed with the Shapiro-Wilk test and Anderson-Darling test and quantile-quantile plots, and variances with the Levene's test. For Volcano plot analyses, lipid concentrations were log₂-transformed.

QST data were normalized to the respective age, site, and sex-dependent reference values using a reference database.⁵³ Thresholds are log-transformed, except for CPT and heat pain threshold (HPT), and then transformed to *z* scores. Raw QST thresholds are provided as Supplementary Table 2 (supplementary Excel file). Thresholds of patients and controls >70 years for whom reference data are not available were normalized to the reference values of the 60- to 70-year class. Volcano plots compared the *z* score differences between patient and control groups versus the –log₁₀*P* value of the *t* test.

For multivariate analyses, lipid data (linear concentrations) were normalized to the mean of the healthy control group because lipids of different classes differ by several orders of magnitude. The ratios were used for further analyses. Canonical discriminant analysis (CanDisc) and partial least-squares analysis were used to reduce the dimensionality and identify the factors, which discriminated the best between groups. Group (HCs versus PD patients), sex, age, body mass index (BMI), pain intensity, type of pain, and medication were considered independent factors. CanDisc was used to assess the predictability of group membership. It was performed without and with bootstrapping, the latter

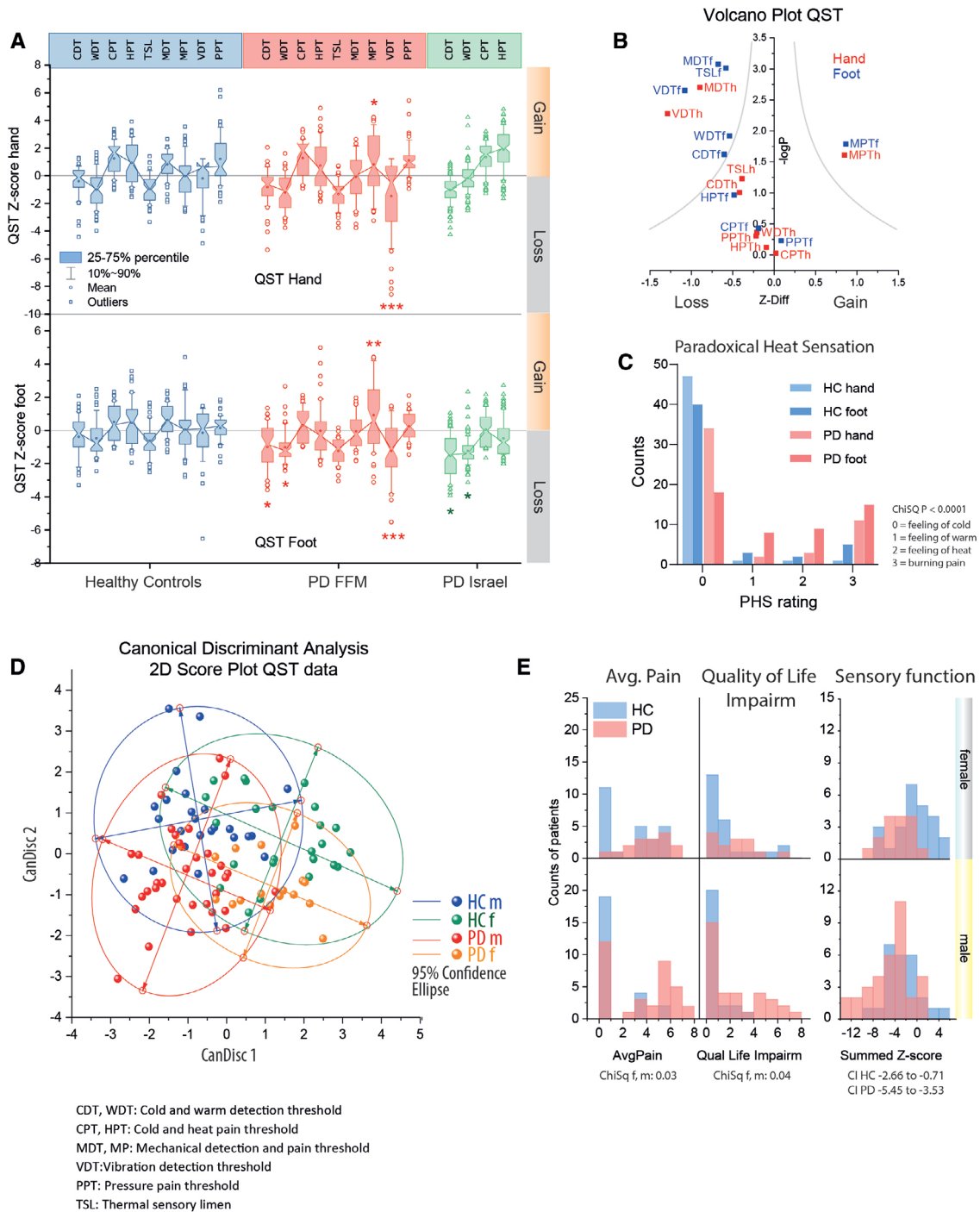


FIG. 1. Quantitative sensory tests of PD patients and healthy controls. **(A)** Notched box-plot z scores of QST results of 50 healthy controls, 50 PD patients from Germany, and 128 PD patients from Israel. The QST results were normalized with QST reference data for age class and sex. Non-normalized thresholds are presented in Supplementary Table 2. The notched box shows the interquartile range, the line is the median, the whiskers show the 10%–90% percentile, and the dots are outliers. Z scores were submitted to 2-way ANOVA for QST-parameter \times group for hand and foot separately. Groups were subsequently compared per *t* tests for each QST parameter using an adjustment of alpha according to Šidák. Asterisks indicate significant differences between groups (adjusted $^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$). **(B)** Volcano plot showing the z-score difference of QST data (x axis) versus the negative logarithm of the *P* value (y axis) comparing 50 PD patients with 50 healthy controls. **(C)** Frequency distribution of paradoxical heat in 50 PD patients versus 50 healthy controls showing a strong increase of paradoxical heat pain (score 3) in PD patients on cold stimulation of the foot. Frequencies were compared with chi-square statistics, $P < 0.0001$. **(D)** Canonical discriminant analysis of QST z scores. The 2-D scatter plot with 95% CI ellipses shows the scores (CanDisc) for the first 2 discriminant factors. The dots represent 50 healthy controls (25 male, 25 female) and 50 PD patients (34 male, 16 female) from Germany. **(E)** Frequency distribution of ratings for average pain intensity and quality of life (QLife) impairment (ordinal VAS from 0 to 10: 0 = no pain/no QLife impairment; 10 = extreme pain/extreme QLife impairment) and for sensory functions, obtained as a summed QST z value in 50 PD patients versus 50 healthy controls. Chi-square statistics for VAS pain and quality of life (QLife), and confidence intervals (CI) of a Gaussian fit for sensory loss using combined female and male data. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

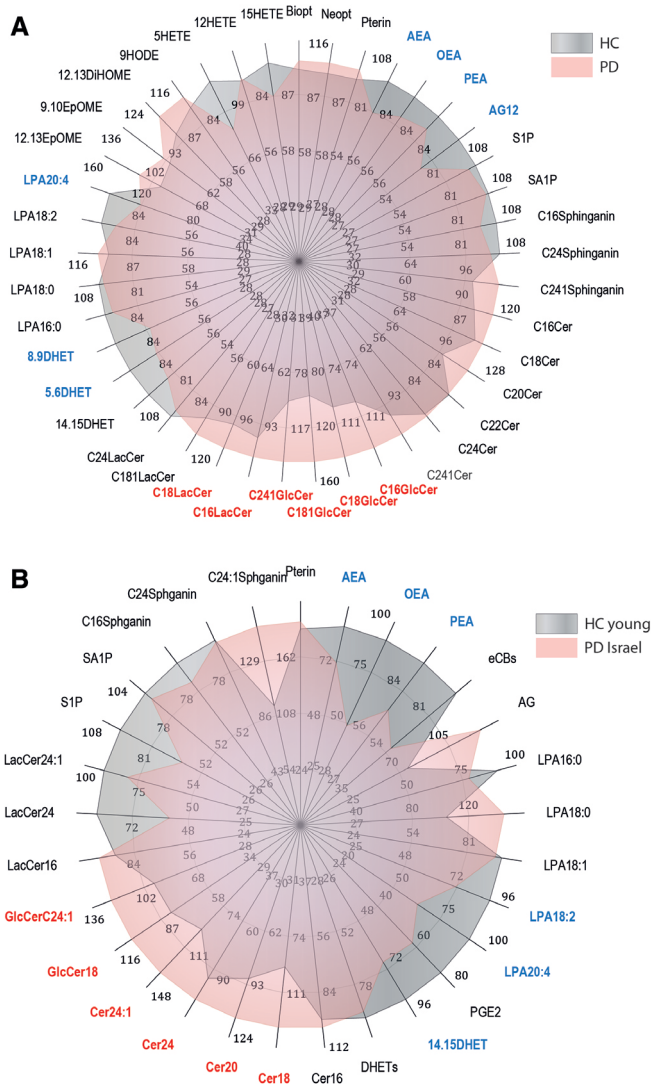


FIG. 2. Polar plots of plasma lipids. (A) Polar plots show the means of normalized lipids (percentages of the mean of the respective healthy control group) of targeted lipid analyses in 50 German PD patients versus 50 age-matched German healthy controls (HCs). (B) Polar plots show the means of normalized lipids (percentages of the mean of the respective healthy control group) of 128 Israeli PD patients versus 224 young German healthy controls. Increased lipids are highlighted in red, reduced lipids in blue. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

using a stratified random-sampling approach considering sex and age and 100 iterations.

Plasma concentrations were compared between groups using univariate or 2-way analyses of variance (ANOVA) or *t* tests according to the data subgroup structure and distribution. In case of violations of normality and log-normality, nonparametric tests were used (Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis). Age, sex, BMI, and visual analogue scale (VAS) ratings for pain intensities (from 0 = no pain to 100 = extreme pain) were introduced as covariates, and if significant, further analyses of group differences were performed. For

example, 2-way ANOVAs compared group \times sex, group \times pain, and group \times sensory loss. In case of significant results of ANOVAs, groups were mutually compared using *t* tests. The *P* values were adjusted according to the procedures of Dunnett (versus 1 control group) or Šidák. Further analyses consisted of χ^2 statistics for nominal data and linear regression analyses. The α level was set at 0.05 for all comparisons, and asterisks in the figures refer to multiplicity-adjusted *P* values.

Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in the article and its supplementary information files or have been deposited to BioStudies, which are available via the accession number S-BSST389.

Results

Similar Frequency of Chronic Pain in Israeli and German PD Patients

Comparisons of demographic data including age, sex, disease duration and severity, medication, analgesics, and pain ratings (Supplementary Tables 1A–D) show that key parameters are very similar in both PD populations. The average age in the German PD group was 66.8 years, and the Hoehn and Yahr scale was 2.5. Israeli patients were 69 years old and had a mean UPDRS of 25. Two-thirds of PD patients were male (34 men, 16 women German PD; 85 men, 43 women Israeli PD). Chronic PD-associated musculoskeletal, neuropathic, or dyskinetic/dystonic pain was prevalent in 74% of German and 66% of Israeli PD patients. Age-matched healthy controls with a mean age of 63 years reported chronic pain in 40%. Half the PD patients (51%) with chronic pain received analgesic medications, whereas 80% of the controls with pain got analgesics. Pain medication included opioid and nonopioid analgesics, benzodiazepines for muscle pain, pregabalin and similar antiepileptic agents, antidepressants, and medical cannabis, the latter only in Israeli patients (medications summarized in Supplementary Table 1B; Association of Medication with Lipids in Supplementary Table 4).

Sensory Loss in PD Patients

The predominant QST phenotype of PD patients was a loss of thermal cold and warm sensation and vibration detection, particularly of the feet accompanied by mechanical pain hypersensitivity, which was stronger on hands than feet (Fig. 1A,B; descriptive QST results in Supplementary Table 2). The sensory phenotype — loss of thermal sensation plus mechanical hypersensitivity — agrees with QST phenotypes of small- or mixed-fiber sensory neuropathies according

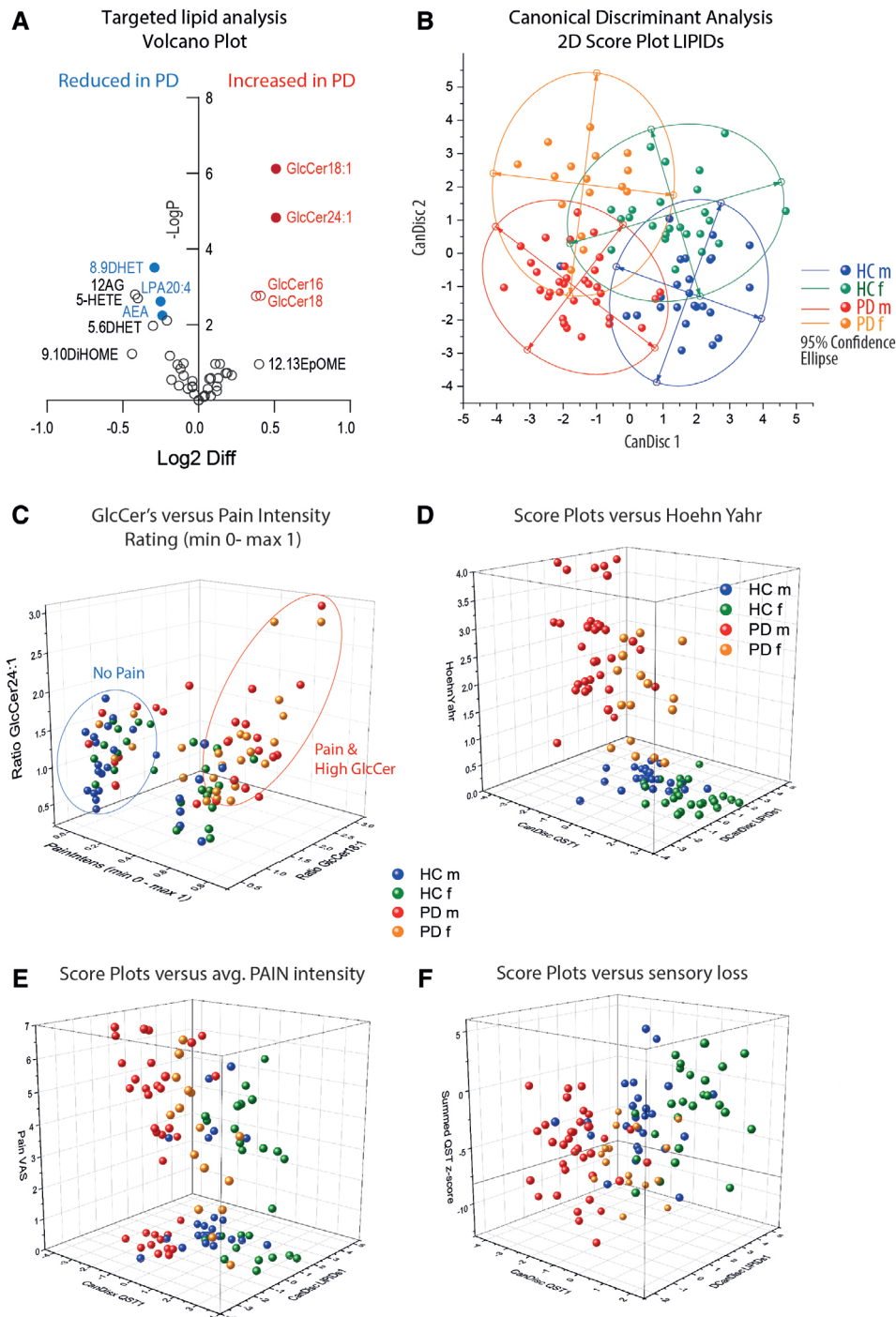


FIG. 3. Volcano plots of plasma lipids and multivariate analyses of lipids versus pains and PD scores. **(A)** Volcano plots showing the log₂ difference of lipid concentrations (x axis) versus the negative log₁₀ of the *P* value (y axis) comparing 50 PD patients versus 50 healthy controls. Lipids reduced or increased in PD appear on the left or right side of the y axis, respectively. A difference of $-\log P > 2$ was considered significant. **(B)** Score plot of canonical discriminant analysis using plasma lipids as input. The 2-dimensional scatterplot with 95% CI ellipse shows the scores (CanDisc) for 2 discriminant factors. The dots represent 50 healthy controls (25 male, 25 female) and 50 PD patients (34 male, 16 female) from Germany. Normalized lipid ratios were used as input. **(C)** Three-dimensional (3-D) scatterplot of pain intensity ratings (from no pain = 0 to extreme pain = 1) versus the most prominent glucosylceramides, Glc18:1 and Glc24:1, transformed to ratios versus the mean of controls. **(D–F)** 3-D scatterplots of the first discriminant factors for QST (x axis) and for plasma lipids (z axis) versus the Hoehn-Yahr score, VAS pain intensity, and sensory loss z score, each on the y axis. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

to Vollert et al.⁵⁴ The loss of thermal sensation was accompanied by PHS and paradoxical heat pain on cold stimulation of the feet (Fig. 1C). Based on the

QST data, canonical discriminant analyses separated PD patients from controls and men from women, however with overlapping confidence intervals

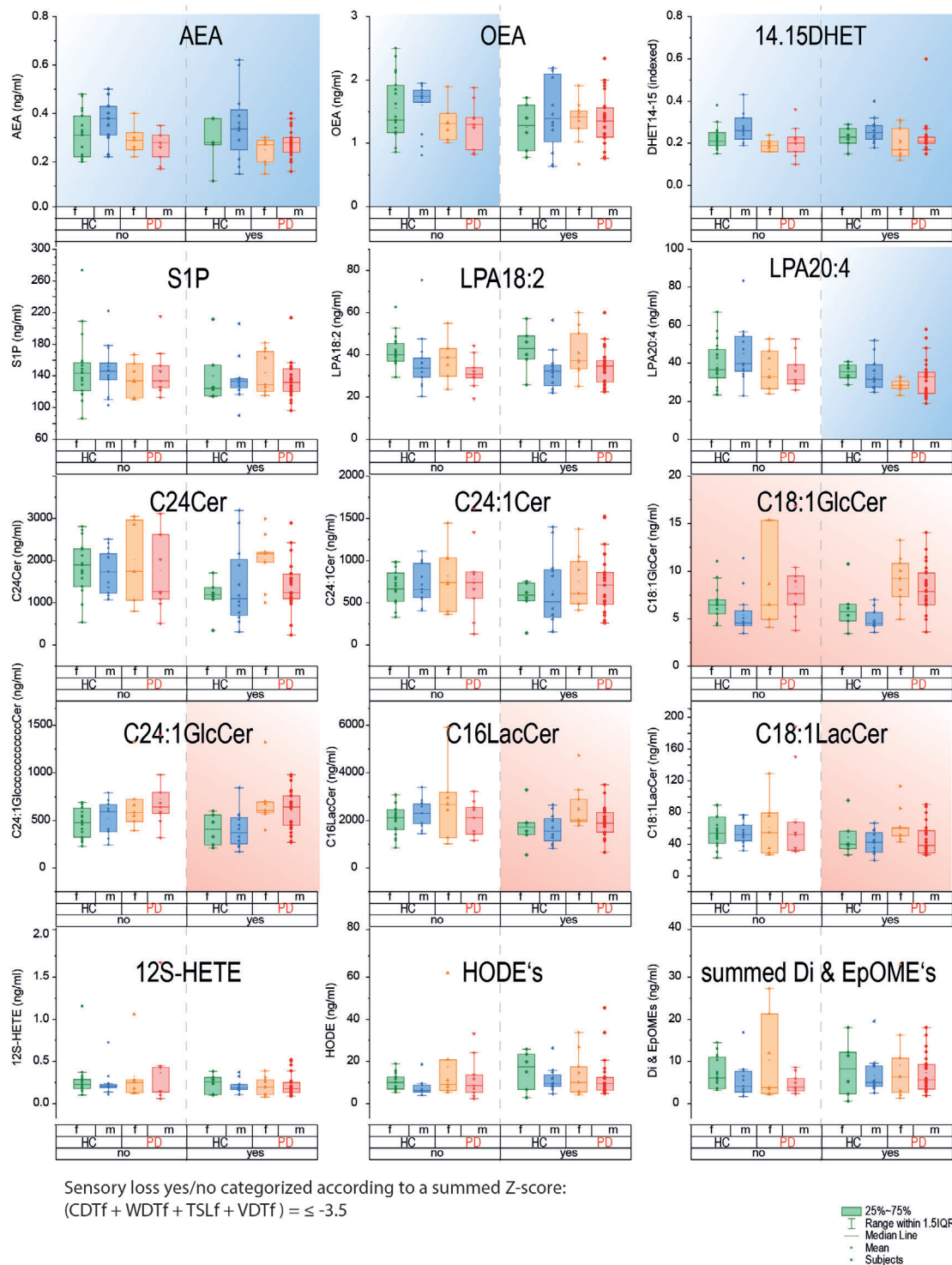


FIG. 4. Grouped box/scatterplots of plasma lipids according to sensory loss. Subjects were categorized as having or not having sensory loss based on a sum of QST z scores. Sensory loss was defined as $CDTf + WDTf + TSLf + VDTf \leq -3$. The boxes show the interquartile range, the line is the median, the whiskers show $1.5 \times IQR$, the dots are individual results of 50 healthy controls (HCs) and 50 PD patients. Graphs showing lipids, which were significantly reduced in PD are highlighted in blue, increased lipids in red (2-way ANOVA group \times sex; subsequent *t* test for corresponding groups, $P < 0.05$). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

(Fig. 1D). A left shift of the frequency distribution of summed QST z scores revealed the sensory loss, and a right shift of the frequency distributions of VAS pain ratings revealed more pain, both stronger in

male PD patients than in female PD patients (Fig. 1E). Further analyses of the QST data and distributions of QST z scores are provided in Supplementary Figures 1 and 2.

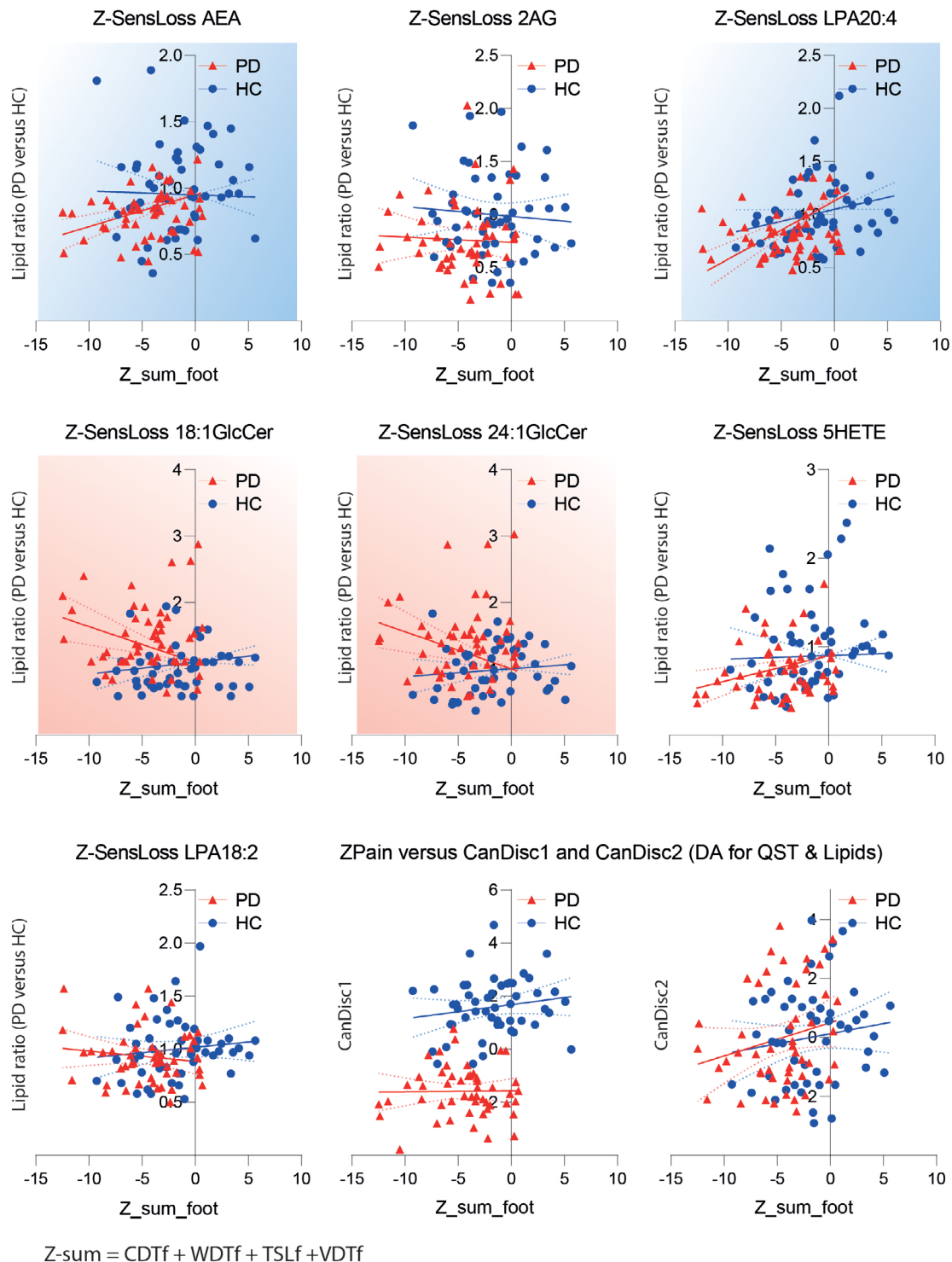


FIG. 5. Scatterplots and linear regression analyses of sensory loss versus plasma lipids. The QST z score representing sensory loss of the feet was calculated as the sum of the QST scores for CDT, WDT, TSL, and VDT and was plotted versus the lipid ratios (versus mean of HCs) for candidate lipids that showed the strongest regulation in PD patients. The bottom last 2 graphs show the z score versus the scores of canonical discriminant analysis. The line shows the linear regression line, the dotted lines show the 95% CI. A significant association of sensory loss with plasma lipid ratios was detected for the color-coded lipids, with blue indicating that low lipids were associated with strong sensory loss (the lower, the stronger the loss), red indicating the inverse (the higher the lipid, the stronger the sensory loss). Significance required that 95% CIs of the slopes of the regression lines did not overlap and that the slope in PD was significantly nonzero (F test). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Anandamide Deficiency and Glucosylceramide Accumulation in PD

Motivated by the association of PD pain with FAAH polymorphisms and by the associations of PD incidence, disease onset, and course with GBA1 mutations, we analyzed plasma lipidomic profiles, which are presented as polar plots (Fig. 2A,B, German and Israeli patients, respectively). Detailed raw and transformed data are presented as Supplementary Figures 3 and 4, and descriptive lipid statistics are shown in Supplementary Table 3 (Excel file). PD patients had reduced plasma levels of anandamide compared with age- and sex-matched healthy controls. All endocannabinoids tended to be reduced. In contrast, glucosylceramides (GlcCers) were strongly increased in PD patients. In addition, PD patients had low levels of polyunsaturated lysophosphatidic acids (LPA18:2, LPA20:4) and of omega oxylipids (dihydroxyicosatrienoic acid [DHET] species). The changes of the lipid profile were consistent in both populations of PD patients (Fig. 2A,B and Supplementary Figs. 3 and 4). An additional increase in non-glycosylated ceramides was only observed in Israeli PD patients compared with young healthy controls, likely owing to raising plasma ceramide levels on aging⁴⁷ or owing to a higher prevalence of GBA1 mutations in Israel. The most robust and reproducible alterations were a loss of anandamide, loss of lysophosphatidic acid, LPA20:4 and increase of all glucosylceramides, and these candidate lipids were also revealed in Volcano plots (Fig. 3A). Canonical discriminant analysis using lipids as input clearly separated PD patients from healthy controls (Fig. 3B), and in particular, high levels of GlcCers were associated with higher pain intensity ratings (Fig. 3C). Three-dimensional (3-D) plots of Can-Disc scores versus Hoehn & Yahr (Fig. 3D) or with summed QST parameters (Fig. 3E,F) suggested an association of Hoehn & Yahr with sensory loss, and of lipid allostasis with pain and with sensory loss (Fig. 3E,F). Corresponding 3-D plots of the Israeli PD population are shown in Supplementary Figure 5. Analysis of medication subgroups receiving or not receiving anti-parkinsonian medication did not reveal significant effects for specific drugs or the number of different drugs (Supplementary Table 4, Excel file). Nine patients receiving 4 or 5 different drugs had particularly high GlcCer18:1 levels (significant at $P < 0.05$), associated with the highest Hoehn & Yahr scores, hence pointing to serious disease courses.

Associations of Lipid Profile Changes With Pain and Sensory Loss

To assess further the relevance of specific lipids for pain, pain type, and sensory loss, we used a binominal categorization of patients with/without pain or with/

without sensory loss, the latter based on summed QST z scores. The observed lipid changes (GlcCer increase; anandamide (AEA), DHET, and LPA20:4 reductions) appear to be stronger in patients with sensory loss (Figs. 4 and 5), but occur in patients with and without pain, with some differences between male and female patients (Supplemental Fig. 6), and the lipid alterations tend to depend on the type of pain (Supplemental Fig. 7). Patients with neuropathic pain and dyskinetic pain had higher GlcCer and lower AEA than patients without pain or patients with musculoskeletal pain. The subgroup analysis points to a pathophysiologic role, particularly of high GlcCer and low AEA and low LPA20:4, for the development of PD-associated sensory neuropathies. This conclusion is further supported by linear regression analyses of lipid concentrations versus summed QST scores, CDTf + WDTf + TSLf + VDTf for sensory loss (Fig. 5; “f” for foot) and HPTf + MPTh + MPTf for pain (Supplementary Fig. 8; “h” for hand). Indeed, there was a linear relationship with sensory loss: the lower the AEA or LPA20:4 and the higher the GlcCer, the stronger was the sensory loss (low QST z score; Fig. 5). There was no such association with the summed QST score for pain (Supplementary Fig. 8).

Discussion

The encoding of noxious stimulus intensity and unpleasantness consists in sensory-discriminative, affective, and cognitive dimensions of pain, and numerous studies have investigated possible causes for pain in PD, mostly searching for alterations of central circuits. Chudler et al suggested that the basal ganglia constitute a gate for regulation of nociceptive information processing.⁵⁵ Indeed, abnormal pain processing in PD was confirmed by several electrophysiology studies measuring somatosensory-evoked potentials.^{19,26-28,56} or blood-oxygen-level-dependent (BOLD) signals in functional imaging studies.¹⁸⁻²² We show here that PD also causes somatosensory dysfunction, mainly loss of thermal sensation coupled with mechanical hypersensitivity, pointing to sensory PD-associated polyneuropathy, in agreement with previous reports.^{27,57} The predominant QST phenotype was loss of thermal sensation with paradoxical heat pain. Somatosensory or autonomic neuropathies often cause burning and visceral pain, irrespective of sensory losses, and they contribute to muscle pain, likely including PD-associated back pain. Indeed, central muscle pain syndromes like fibromyalgia were proposed to arise from small-fiber neuropathies in subsets of patients,^{58,59} supporting the view that musculoskeletal pain not only originates from rigidity but is contributed by alterations of somatosensory input from the periphery. It is presently unknown why sensory neurons including olfactory,

somatosensory, and autonomic sensory neurons are particularly vulnerable to the pathophysiology of PD, which is believed to arise from pathological protein aggregates, inefficient protein waste removal, and dysfunctional mitochondria. It is important to note that the peripheral nervous and the olfactory systems have been suggested as starting points for the spreading of α -synuclein.^{25,60-62}

Our lipidomic studies reveal that QST readouts of sensory loss and pain intensity ratings are associated with low levels of endocannabinoids and elevated levels of glucosylceramides, to name the most prominent lipid derangements. These associations do not establish causality, but in combination with the known clinical benefit of cannabis^{9-11,63} and the high prevalence of GBA1 mutations in PD,^{34,64,65} and the reproducibility in 2 very different cohorts argue for a pathogenic role of these lipids for PD-associated sensory neuropathies and pain. Indeed, cannabinoids are neuroprotective in models of MPP+ -evoked Parkinson's disease in rodents,⁶⁶ and loss of anandamide in dorsal root ganglia on sciatic nerve injury is associated with nociceptive hypersensitivity,^{67,68} which also occurs in mice deficient of the cannabinoid-1 receptor specifically in somatosensory neurons.⁶⁹ The data point to a prominent function of anandamide in sensory neurons.

From a mechanistic viewpoint, it is presently unknown how high levels of glucosylceramides affect sensory neurons, but there is strong evidence that low activity of the GlcCer-metabolizing enzyme GBA1 increases the toxicity of α -synuclein.^{34,38,70-74} Importantly, low GBA1 activity has been observed in PD patients carrying or not carrying GBA1 mutations,⁷⁵ suggesting that a loss of GBA1 activity is highly prevalent in PD and possibly contributes to the development or progression to PD-associated sensory neuropathy.⁷⁴ Indeed, we found similarly elevated levels of glucosylceramides in both our patient populations, although known GBA1 mutations are frequent in Jews^{76,77} but rare in German PD patients. Accumulation of glucosylceramides in lysosomes may result in defects of lysosomal trafficking^{78,79} membrane leaks and possibly expelling of GlcCer-laden lysosomes, which would explain high extracellular levels in plasma. We previously showed in PD mice that ceramides and glucosylceramides are strongly increased in the olfactory bulb,⁸⁰ that is, a site from which α -synuclein spreading may originate.^{30,31,81,82} Pathologically high levels already occurred at the age of about 6 months when these mice were still asymptomatic in terms of PD-associated motor dysfunctions.⁸⁰ Based on the functional GBA1 evidence provided in a number of in vitro studies, it may be speculated that glucosylceramides are not only markers of but functionally relevant factors in the development and progression

of PD-associated sensory neuropathies and PD-associated pain.

Our first exploratory study had some limitations in terms of ages and differences in preanalytical sample handling and the availability of deuterated analytical standards. Absolute lipid levels were therefore not all directly comparable between the Israeli and the Frankfurt PD populations. However, the major findings for the key lipid candidates and QST alterations were consistent and reproducible irrespective of the site where and the time when the patients were recruited. Hence, we concluded that anandamide loss and glucosylceramide accumulations are robust lipid manifestations of the disease. The similarity of the PD-associated QST phenomena with sensory neuropathies in metabolic diseases suggests that glucosylceramides may have a broader pathogenic role in the metabolic damage of sensory neurons, supported by studies showing a glycosphingolipid-dependent increase in insulin resistance in diabetes⁸³ and of obesity-evoked inflammation.⁸⁴ Importantly, both anandamide loss and glucosylceramide accumulation are theoretically amenable to available medication, anandamide via cannabis and glucosylceramides via GBA1 refolding, enzyme replacement, or substrate depletion. Hence, it is conceivable that patients with PD-associated sensory losses and pain would benefit from Gaucher-directed treatments.

In summary, we have shown that both PD patients suffering and not suffering from chronic pain have QST alterations pointing to sensory neuropathies with loss of thermal sensation and mechanical hypersensitivity, which are associated with lipid derangements, most prominently with loss of anandamide and accumulation of glucosylceramides, supporting the recent concept of a GBA1-directed treatments. ■

Acknowledgments: The authors thank all patients and controls for participating in the study.

References

1. Wasner G, Deuschl G. Pains in Parkinson disease—many syndromes under one umbrella. *Nat Rev Neurol* 2012;8(5):284–294.
2. Snider SR, Fahn S, Isgreen WP, Cote LJ. Primary sensory symptoms in parkinsonism. *Neurology* 1976;26(5):423–429.
3. Koller WC. Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology* 1984;34(7):957–959.
4. Defazio G, Berardelli A, Fabbrini G, et al. Pain as a nonmotor symptom of Parkinson disease: evidence from a case-control study. *Arch Neurol* 2008;65(9):1191–1194.
5. Beiske AG, Loge JH, Ronningen A, Svensson E. Pain in Parkinson's disease: prevalence and characteristics. *Pain* 2009;141(1–2):173–177.
6. Yust-Katz S, Hershkovitz R, Gurevich T, Djaldetti R. Pain in extrapyramidal neurodegenerative diseases. *Clin J Pain* 2017;33(7):635–639.

7. Goetz CG, Tanner CM, Levy M, Wilson RS, Garron DC. Pain in Parkinson's disease. *Mov Disord* 1986;1(1):45–49.
8. Djaldetti R, Shifrin A, Rogowski Z, Sprecher E, Melamed E, Yarnitsky D. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. *Neurology* 2004;62(12):2171–2175.
9. Balash Y, Bar-Lev Schleider L, Korczyn AD, et al. Medical cannabis in Parkinson disease: real-life patients' experience. *Clin Neuropharmacol* 2017;40(6):268–272.
10. Shohet A, Khlebtovsky A, Roizen N, Roditi Y, Djaldetti R. Effect of medical cannabis on thermal quantitative measurements of pain in patients with Parkinson's disease. *Eur J Pain* 2017;21(3):486–493.
11. Venderova K, Ruzicka E, Vorisek V, Visnovsky P. Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Mov Disord* 2004;19(9):1102–1106.
12. Greenbaum L, Tegeder I, Barhum Y, Melamed E, Roditi Y, Djaldetti R. Contribution of genetic variants to pain susceptibility in Parkinson disease. *Eur J Pain* 2012;16(9):1243–1250.
13. Pecina M, Zubieta JK. Molecular mechanisms of placebo responses in humans. *Mol Psychiatry* 2015;20(4):416–423.
14. Leknes S, Brooks JC, Wiech K, Tracey I. Pain relief as an opponent process: a psychophysical investigation. *Eur J Neurosci* 2008;28(4):794–801.
15. Leknes S, Lee M, Berna C, Andersson J, Tracey I. Relief as a reward: hedonic and neural responses to safety from pain. *PLoS One* 2011;6(4):e17870.
16. Mylius V, Engau I, Teepker M, et al. Pain sensitivity and descending inhibition of pain in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80(1):24–28.
17. Forkmann K, Grashorn W, Schmidt K, Frundt O, Buhmann C, Bingel U. Altered neural responses to heat pain in drug-naive patients with Parkinson disease. *Pain* 2017;158(8):1408–1416.
18. Boecker H, Ceballos-Baumann A, Bartenstein P, et al. Sensory processing in Parkinson's and Huntington's disease: investigations with 3D H(2)(15)O-PET. *Brain* 1999;122(Pt 9):1651–1665.
19. Luo C, Song W, Chen Q, et al. Reduced functional connectivity in early-stage drug-naive Parkinson's disease: a resting-state fMRI study. *Neurobiol Aging* 2014;35(2):431–441.
20. Tan Y, Tan J, Luo C, et al. Altered brain activation in early drug-naive Parkinson's disease during heat pain stimuli: an fMRI study. *Parkinsons Dis* 2015;2015:273019.
21. Aschermann Z, Nagy F, Perlaki G, et al. 'Wind-up' in Parkinson's disease: A functional magnetic resonance imaging study. *Eur J Pain* 2015;19(9):1288–1297.
22. Brefel-Courbon C, Payoux P, Thalamas C, et al. Effect of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: a clinical and positron emission tomography study. *Mov Disord* 2005;20(12):1557–1563.
23. Nolano M, Provitera V, Estraneo A, et al. Sensory deficit in Parkinson's disease: evidence of a cutaneous denervation. *Brain* 2008;131(Pt 7):1903–1911.
24. Donadio V, Incensi A, Leta V, et al. Skin nerve alpha-synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology* 2014;82(15):1362–1369.
25. Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. Alpha-synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology* 2013;81(18):1604–1610.
26. Tinazzi M, Del Vesco C, Defazio G, et al. Abnormal processing of the nociceptive input in Parkinson's disease: a study with CO₂ laser evoked potentials. *Pain* 2008;136(1–2):117–124.
27. Lin CH, Chao CC, Wu SW, et al. Pathophysiology of small-fiber sensory system in Parkinson's disease: skin innervation and contact heat evoked potential. *Medicine (Baltimore)* 2016;95(10):e3058.
28. Schestatsky P, Kumru H, Valls-Sole J, et al. Neurophysiologic study of central pain in patients with Parkinson disease. *Neurology* 2007;69(23):2162–2169.
29. Lin CH, Wu RM, Chang HY, Chiang YT, Lin HH. Preceding pain symptoms and Parkinson's disease: a nationwide population-based cohort study. *Eur J Neurol* 2013;20(10):1398–1404.
30. Ubeda-Banon I, Saiz-Sanchez D, de la Rosa-Prieto C, Martinez-Marcos A. Alpha-synuclein in the olfactory system in Parkinson's disease: role of neural connections on spreading pathology. *Brain Struct Funct* 2014;219(5):1513–1526.
31. Rey NL, Steiner JA, Maroof N, et al. Widespread transneuronal propagation of alpha-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J Exp Med* 2016;213(9):1759–1778.
32. Clark LN, Ross BM, Wang Y, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology* 2007;69(12):1270–1277.
33. Sidransky E, Nalls MA, Aasly JO, et al. Multicenter analysis of glucocerebrosidase mutations in Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2009;361(17):1651–1661.
34. Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased alpha-synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain* 2014;137(Pt 3):834–848.
35. Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, et al. Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Mol Neurodegener* 2015;10:15.
36. Mazzulli JR, Xu YH, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and alpha-synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell* 2011;146(1):37–52.
37. Zunke F, Moise AC, Belur NR, et al. Reversible conformational conversion of alpha-synuclein into toxic assemblies by glucosylceramide. *Neuron* 2018;97(1):92–107.e110.
38. Kim S, Yun SP, Lee S, et al. GBA1 deficiency negatively affects physiological alpha-synuclein tetramers and related multimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115(4):798–803.
39. Alcalay RN, Dinur T, Quinn T, et al. Comparison of Parkinson risk in Ashkenazi Jewish patients with Gaucher disease and GBA heterozygotes. *JAMA Neurol* 2014;71(6):752–757.
40. Rolke R, Baron R, Maier C, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain* 2006;123(3):231–243.
41. Vollert J, Kramer M, Barroso A, et al. Symptom profiles in the painDETECT Questionnaire in patients with peripheral neuropathic pain stratified according to sensory loss in quantitative sensory testing. *Pain* 2016;157(8):1810–1818.
42. Djaldetti R, Yust-Katz S, Kolianov V, Melamed E, Dabby R. The effect of duloxetine on primary pain symptoms in Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol* 2007;30(4):201–205.
43. Vollert J, Attal N, Baron R, et al. Quantitative sensory testing using DFNS protocol in Europe: an evaluation of heterogeneity across multiple centers in patients with peripheral neuropathic pain and healthy subjects. *Pain* 2016;157(3):750–758.
44. Vollert J, Mainka T, Baron R, et al. Quality assurance for Quantitative Sensory Testing laboratories: development and validation of an automated evaluation tool for the analysis of declared healthy samples. *Pain* 2015;156(12):2423–2430.
45. Maier C, Baron R, Tolle TR, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 2010;150(3):439–450.
46. Heldestad V, Linder J, Sellersjo L, Nordh E. Reproducibility and influence of test modality order on thermal perception and thermal pain thresholds in quantitative sensory testing. *Clin Neurophysiol* 2010;121(11):1878–1885.
47. Brunkhorst-Kanaan N, Klatt-Schreiner K, Hackel J, et al. Targeted lipidomics reveal derangement of ceramides in major depression and bipolar disorder. *Metabolism* 2019;95:65–76.
48. Lotsch J, Schiffmann S, Schmitz K, et al. Machine-learning based lipid mediator serum concentration patterns allow identification of multiple sclerosis patients with high accuracy. *Sci Rep* 2018;8(1):14884.
49. Schmitz K, Brunkhorst R, de Bruin N, et al. Dysregulation of lysophosphatidic acids in multiple sclerosis and autoimmune encephalomyelitis. *Acta Neuropathol Commun* 2017;5(1):42.
50. Zschiebsch K, Fischer C, Pickert G, et al. Tetrahydrobiopterin attenuates DSS-evoked colitis in mice by rebalancing redox and lipid signaling. *J Crohns Colitis* 2016;10(8):965–978.

51. Brachtendorf S, Wanger RA, Birod K, et al. Chemosensitivity of human colon cancer cells is influenced by a p53-dependent enhancement of ceramide synthase 5 and induction of autophagy. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* 2018;1863(10):1214–1227.
52. Kern K, Pierre S, Schreiber Y, et al. CD200 selectively upregulates prostaglandin E2 and D2 synthesis in LPS-treated bone marrow-derived macrophages. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2017;133:53–59.
53. Pfau DB, Krumova EK, Treede RD, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): reference data for the trunk and application in patients with chronic postherpetic neuralgia. *Pain* 2014;155(5):1002–1015.
54. Vollert J, Maier C, Attal N, et al. Stratifying patients with peripheral neuropathic pain based on sensory profiles: algorithm and sample size recommendations. *Pain* 2017;158(8):1446–1455.
55. Chudler EH, Dong WK. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain* 1995;60(1):3–38.
56. Tinazzi M, Recchia S, Simonetto S, et al. Hyperalgesia and laser evoked potentials alterations in hemiparkinson: evidence for an abnormal nociceptive processing. *J Neurol Sci* 2009;276(1–2):153–158.
57. Gierthmuhlen J, Schumacher S, Deuschl G, et al. Somatosensory function in asymptomatic Parkin-mutation carriers. *Eur J Neurol* 2010;17(3):513–517.
58. Hurtig IM, Raak RI, Kendall SA, Gerdle B, Wahren LK. Quantitative sensory testing in fibromyalgia patients and in healthy subjects: identification of subgroups. *Clin J Pain* 2001;17(4):316–322.
59. Kosek E, Ekholm J, Hansson P. Sensory dysfunction in fibromyalgia patients with implications for pathogenic mechanisms. *Pain* 1996;68(2–3):375–383.
60. Kuo YM, Li Z, Jiao Y, et al. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Hum Mol Genet* 2010;19(9):1633–1650.
61. Djaldetti R, Lev N, Melamed E. Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Mov Disord* 2009;24(6):793–800.
62. Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat Rev Neurol* 2012;8(6):329–339.
63. Lotan I, Treves TA, Roditi Y, Djaldetti R. Cannabis (medical marijuana) treatment for motor and non-motor symptoms of Parkinson disease: an open-label observational study. *Clin Neuropharmacol* 2014;37(2):41–44.
64. Aflaki E, Westbroek W, Sidransky E. The complicated relationship between Gaucher disease and parkinsonism: insights from a rare disease. *Neuron* 2017;93(4):737–746.
65. Blanz J, Saftig P. Parkinson's disease: acid-glucocerebrosidase activity and alpha-synuclein clearance. *J Neurochem* 2016;139(Suppl 1):198–215.
66. Santos NA, Martins NM, Sisti FM, et al. The neuroprotection of cannabidiol against MPP(+)-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritegenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. *Toxicol In Vitro* 2015;30(1 Pt B):231–240.
67. Bishay P, Schmidt H, Marian C, et al. R-flurbiprofen reduces neuropathic pain in rodents by restoring endogenous cannabinoids. *PLoS One* 2010;5(5):e10628.
68. Bishay P, Haussler A, Lim HY, et al. Anandamide deficiency and heightened neuropathic pain in aged mice. *Neuropharmacology* 2013;71:204–215.
69. Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nat Neurosci* 2007;10(7):870–879.
70. Abul Khair SB, Dhanushkodi NR, Ardah MT, Chen W, Yang Y, Haque ME. Silencing of glucocerebrosidase gene in drosophila enhances the aggregation of Parkinson's disease associated alpha-synuclein mutant A53T and affects locomotor activity. *Front Neurosci* 2018;12:81.
71. Suzuki M, Sango K, Wada K, Nagai Y. Pathological role of lipid interaction with alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Neurochem Int* 2018;119:97–106.
72. Tayebi N, Parisiadou L, Berhe B, et al. Glucocerebrosidase haploinsufficiency in A53T alpha-synuclein mice impacts disease onset and course. *Mol Genet Metab* 2017;122(4):198–208.
73. Suzuki M, Fujikake N, Takeuchi T, et al. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant alpha-synuclein and aggravates neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Hum Mol Genet* 2015;24(23):6675–6686.
74. Beavan M, McNeill A, Proukakis C, Hughes DA, Mehta A, Schapira AH. Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurol* 2015;72(2):201–208.
75. Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain* 2015;138(Pt 9):2648–2658.
76. Shiner T, Mirelman A, Gana Weisz M, et al. High frequency of GBA gene mutations in dementia with Lewy bodies among Ashkenazi Jews. *JAMA Neurol* 2016;73(12):1448–1453.
77. Dagan E, Schlesinger I, Kurolap A, et al. LRRK2, GBA and SMPD1 founder mutations and Parkinson's disease in Ashkenazi Jews. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2016;42(1–2):1–6.
78. Kinghorn KJ, Asghari AM, Castillo-Quan JI. The emerging role of autophagic-lysosomal dysfunction in Gaucher disease and Parkinson's disease. *Neural Regen Res* 2017;12(3):380–384.
79. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AH. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum Mol Genet* 2016;25(16):3432–3445.
80. Torres-Odio S, Key J, Hoepken HH, et al. Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2017;14(1):154.
81. Danzer KM, Kranich LR, Ruf WP, et al. Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 2012;7:42.
82. Rey NL, George S, Steiner JA, et al. Spread of aggregates after olfactory bulb injection of alpha-synuclein fibrils is associated with early neuronal loss and is reduced long term. *Acta Neuropathol* 2018;135(1):65–83.
83. Aerts JM, Boot RG, van Eijk M, et al. Glycosphingolipids and insulin resistance. *Adv Exp Med Biol* 2011;721:99–119.
84. Bikman BT. A role for sphingolipids in the pathophysiology of obesity-induced inflammation. *Cell Mol Life Sci* 2012;69(13):2135–2146.

Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

8. Darstellung des eigenen Anteils

In der Studie "High glucosylceramides and low anandamide contribute to sensory loss and pain in Parkinson's Disease" umfasste mein Aufgabenbereich:

- Anpassung des Schmerzfragebogens
- Patienten- und Probandenrekrutierung für den 2. Teil
- Erhebung der demographischen Daten
- Aufklärung über den Studienablauf
- Klinisch neurologische Untersuchung
- Quantitative sensorische Testung
- Blutentnahme
- Zentrifugation und Vorbereitung der Blutproben zur weiteren Analyse
- Erstellen der Analysenaufträge
- Dokumentation der Patientendaten
- Erstellen und Eintragen der demographischen und QST Daten in eine Exceltabelle
- Umwandlung der QST Schwellen in z-Scores

9. Literaturverzeichnis

- 1 Savica R, Grossardt BR, Bower JH, Ahlskog JE, Rocca WA. Time Trends in the Incidence of Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 2016;73(8):981-989.
doi:10.1001/jamaneurol.2016.0947.
- 2 Wasner G, Deuschl G. Pains in Parkinson disease--many syndromes under one umbrella. *Nature Reviews Neurology.* 2012;8(5):284-294.
doi:10.1038/nrneurol.2012.54.
- 3 Snider SR, Fahn S, Isgreen WP, Cote LJ. Primary sensory symptoms in parkinsonism. *Neurology.* 1976;26(5):423-429. doi:10.1212/wnl.26.5.423.
- 4 Koller WC. Sensory symptoms in Parkinson's disease. *Neurology.* 1984;34(7):957-959.
doi:10.1212/wnl.34.7.957.
- 5 Defazio G, Berardelli A, Fabbrini G, et al. Pain as a nonmotor symptom of Parkinson disease: evidence from a case-control study. *Arch Neurol.* 2008;65(9):1191-1194.
doi:10.1001/archneurol.2008.2.
- 6 Beiske AG, Loge JH, Rønningen A, Svensson E. Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. *Pain.* 2009;141(1-2):173-177. doi:10.1016/j.pain.2008.12.004.
- 7 Yust-Katz S, HersHKovitz R, Gurevich T, Djaldetti R. Pain in Extrapiramidal Neurodegenerative Diseases. *Clin J Pain.* 2017;33(7):635-639.
doi:10.1097/AJP.0000000000000437.
- 8 Defazio G, Berardelli A, Fabbrini G, et al. Pain as a nonmotor symptom of Parkinson disease: evidence from a case-control study. *Arch Neurol.* 2008;65(9):1191-1194.
doi:10.1001/archneurol.2008.2.
- 9 Balash Y, Bar-Lev Schleider L, Korczyn AD, et al. Medical Cannabis in Parkinson Disease: Real-Life Patients' Experience. *Clin Neuropharmacol.* 2017;40(6):268-272.
doi:10.1097/WNF.0000000000000246.
- 10 Shohet A, KhlebtoVsky A, Roizen N, Roditi Y, Djaldetti R. Effect of medical cannabis on thermal quantitative measurements of pain in patients with Parkinson's disease. *Eur J Pain.* 2017;21(3):486-493. doi:10.1002/ejp.942.

- 11 Venderová K, Růžicka E, Voríšek V, Visnovský P. Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Mov Disord*. 2004;19(9):1102-1106. doi:10.1002/mds.20111.
- 12 Greenbaum L, Tegeder I, Barhum Y, Melamed E, Roditi Y, Djaldetti R. Contribution of genetic variants to pain susceptibility in Parkinson disease. *Eur J Pain*. 2012;16(9):1243-1250. doi:10.1002/j.1532-2149.2012.00134.x.
- 13 Leknes S, Lee M, Berna C, Andersson J, Tracey I. Relief as a reward: hedonic and neural responses to safety from pain. *PLoS One*. 2011;6(4):e17870. doi:10.1371/journal.pone.0017870.
- 14 Leknes S, Brooks JCW, Wiech K, Tracey I. Pain relief as an opponent process: a psychophysical investigation. *The European journal of neuroscience*. 2008;28(4):794-801. doi:10.1111/j.1460-9568.2008.06380.x.
- 15 Mylius V, Engau I, Teepker M, et al. Pain sensitivity and descending inhibition of pain in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80(1):24-28. doi:10.1136/jnnp.2008.145995.
- 16 Forkmann K, Grashorn W, Schmidt K, Fründt O, Buhmann C, Bingel U. Altered neural responses to heat pain in drug-naive patients with Parkinson disease. *Pain*. 2017;158(8):1408-1416. doi:10.1097/j.pain.0000000000000923.
- 17 Aschermann Z, Nagy F, Perlaki G, et al. 'Wind-up' in Parkinson's disease: A functional magnetic resonance imaging study. *Eur J Pain*. 2015;19(9):1288-1297. doi:10.1002/ejp.659.
- 18 Tan Y, Tan J, Luo C, et al. Altered Brain Activation in Early Drug-Naive Parkinson's Disease during Heat Pain Stimuli: An fMRI Study. *Parkinsons Dis*. 2015;2015:273019. doi:10.1155/2015/273019.
- 19 Luo C, Song W, Chen Q, et al. Reduced functional connectivity in early-stage drug-naive Parkinson's disease: a resting-state fMRI study. *Neurobiology of Aging*. 2014;35(2):431-441. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2013.08.018.
- 20 Brefel-Courbon C, Payoux P, Thalamas C, et al. Effect of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: a clinical and positron emission tomography study. *Mov Disord*. 2005;20(12):1557-1563. doi:10.1002/mds.20629.

- 21 Boecker H, Ceballos-Baumann A, Bartenstein P, et al. Sensory processing in Parkinson's and Huntington's disease: investigations with 3D H²(15)O-PET. *Brain*. 1999;122 (Pt 9):1651-1665. doi:10.1093/brain/122.9.1651.
- 22 Lin C-H, Chao C-C, Wu S-W, et al. Pathophysiology of Small-Fiber Sensory System in Parkinson's Disease: Skin Innervation and Contact Heat Evoked Potential. *Medicine*. 2016;95(10):e3058. doi:10.1097/MD.0000000000003058.
- 23 Tinazzi M, Del Vesco C, Defazio G, et al. Abnormal processing of the nociceptive input in Parkinson's disease: a study with CO₂ laser evoked potentials. *Pain*. 2008;136(1-2):117-124. doi:10.1016/j.pain.2007.06.022.
- 24 Schestatsky P, Kumru H, Valls-Solé J, et al. Neurophysiologic study of central pain in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69(23):2162-2169. doi:10.1212/01.wnl.0000295669.12443.d3.
- 25 Djaldetti R, Shifrin A, Rogowski Z, Sprecher E, Melamed E, Yarnitsky D. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. *Neurology*. 2004;62(12):2171-2175. doi:10.1212/01.WNL.0000130455.38550.9D.
- 26 Nolano M, Provitera V, Estraneo A, et al. Sensory deficit in Parkinson's disease: evidence of a cutaneous denervation. *Brain*. 2008;131(Pt 7):1903-1911. doi:10.1093/brain/awn102.
- 27 Wang N, Gibbons CH, Lafo J, Freeman R. α -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. *Neurology*. 2013;81(18):1604-1610. doi:10.1212/WNL.0b013e3182a9f449.
- 28 Donadio V, Incensi A, Leta V, et al. Skin nerve α -synuclein deposits: a biomarker for idiopathic Parkinson disease. *Neurology*. 2014;82(15):1362-1369. doi:10.1212/WNL.0000000000000316.
- 29 Chiasserini D, Paciotti S, Eusebi P, et al. Selective loss of glucocerebrosidase activity in sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Molecular Neurodegeneration*. 2015;10(1):15. doi:10.1186/s13024-015-0010-2.
- 30 Murphy KE, Gysbers AM, Abbott SK, et al. Reduced glucocerebrosidase is associated with increased α -synuclein in sporadic Parkinson's disease. *Brain*. 2014;137(Pt 3):834-848. doi:10.1093/brain/awt367.
- 31 Clark LN, Ross BM, Wang Y, et al. Mutations in the glucocerebrosidase gene are associated with early-onset Parkinson disease. *Neurology*. 2007;69(12):1270-1277. doi:10.1212/01.wnl.0000276989.17578.02.

- 32** Kim S, Yun SP, Lee S, et al. GBA1 deficiency negatively affects physiological α -synuclein tetramers and related multimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018;115(4):798-803. doi:10.1073/pnas.1700465115.
- 33** Zunke F, Moise AC, Belur NR, et al. Reversible Conformational Conversion of α -Synuclein into Toxic Assemblies by Glucosylceramide. *Neuron*. 2018;97(1):92-107.e10. doi:10.1016/j.neuron.2017.12.012.
- 34** Mazzulli JR, Xu Y-H, Sun Y, et al. Gaucher disease glucocerebrosidase and α -synuclein form a bidirectional pathogenic loop in synucleinopathies. *Cell*. 2011;146(1):37-52. doi:10.1016/j.cell.2011.06.001.
- 35** Vollert J, Kramer M, Barroso A, et al. Symptom profiles in the painDETECT Questionnaire in patients with peripheral neuropathic pain stratified according to sensory loss in quantitative sensory testing. *Pain*. 2016;157(8):1810-1818. doi:10.1097/j.pain.0000000000000588.
- 36** Vollert J, Mainka T, Baron R, et al. Quality assurance for Quantitative Sensory Testing laboratories: development and validation of an automated evaluation tool for the analysis of declared healthy samples. *Pain*. 2015;156(12):2423-2430. doi:10.1097/j.pain.0000000000000300.
- 37** Vollert J, Attal N, Baron R, et al. Quantitative sensory testing using DFNS protocol in Europe: an evaluation of heterogeneity across multiple centers in patients with peripheral neuropathic pain and healthy subjects. *Pain*. 2016;157(3):750-758. doi:10.1097/j.pain.0000000000000433.
- 38** Rolke R, Baron R, Maier C, et al. Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values. *Pain*. 2006;123(3):231-243. doi:10.1016/j.pain.2006.01.041.
- 39** Chudler EH, Dong WK. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain*. 1995;60(1):3-38. doi:10.1016/0304-3959(94)00172-B.
- 40** Tinazzi M, Recchia S, Simonetto S, et al. Hyperalgesia and laser evoked potentials alterations in hemiparkinson: evidence for an abnormal nociceptive processing. *Journal of the Neurological Sciences*. 2009;276(1-2):153-158. doi:10.1016/j.jns.2008.09.023.
- 41** Hurtig IM, Raak RI, Kendall SA, Gerdle B, Wahren LK. Quantitative sensory testing in fibromyalgia patients and in healthy subjects: identification of subgroups. *Clin J Pain*. 2001;17(4):316-322. doi:10.1097/00002508-200112000-00005.

- 42 Kosek E, Ekholm J, Hansson P. Sensory dysfunction in fibromyalgia patients with implications for pathogenic mechanisms. *Pain*. 1996;68(2):375-383. doi:10.1016/S0304-3959(96)03188-0.
- 43 Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*. 2016;139 Suppl 1:216-231. doi:10.1111/jnc.13731.
- 44 Grünewald A, Kumar KR, Sue CM. New insights into the complex role of mitochondria in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol*. 2019;177:73-93. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.09.003.
- 45 Doty RL. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8(6):329-339. doi:10.1038/nrneurol.2012.80.
- 46 Djaldetti R, Lev N, Melamed E. Lesions outside the CNS in Parkinson's disease. *Movement Disorders*. 2009;24(6):793-800. doi:10.1002/mds.22172.
- 47 Kuo Y-M, Li Z, Jiao Y, et al. Extensive enteric nervous system abnormalities in mice transgenic for artificial chromosomes containing Parkinson disease-associated alpha-synuclein gene mutations precede central nervous system changes. *Human Molecular Genetics*. 2010;19(9):1633-1650. doi:10.1093/hmg/ddq038.
- 48 Santos NAG, Martins NM, Sisti FM, et al. The neuroprotection of cannabidiol against MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells involves trkA receptors, upregulation of axonal and synaptic proteins, neuritogenesis, and might be relevant to Parkinson's disease. *Toxicol In Vitro*. 2015;30(1 Pt B):231-240. doi:10.1016/j.tiv.2015.11.004.
- 49 Agarwal N, Pacher P, Tegeder I, et al. Cannabinoids mediate analgesia largely via peripheral type 1 cannabinoid receptors in nociceptors. *Nature Neuroscience*. 2007;10(7):870-879. doi:10.1038/nn1916.
- 50 Bishay P, Schmidt H, Marian C, et al. R-flurbiprofen reduces neuropathic pain in rodents by restoring endogenous cannabinoids. *PLoS One*. 2010;5(5):e10628. doi:10.1371/journal.pone.0010628.
- 51 Bishay P, Häussler A, Lim H-Y, et al. Anandamide deficiency and heightened neuropathic pain in aged mice. *Neuropharmacology*. 2013;71:204-215. doi:10.1016/j.neuropharm.2013.03.021.
- 52 Alcalay RN, Levy OA, Waters CC, et al. Glucocerebrosidase activity in Parkinson's disease with and without GBA mutations. *Brain*. 2015;138(Pt 9):2648-2658. doi:10.1093/brain/awv179.

- 53** Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AHV. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(16):3432-3445. doi:10.1093/hmg/ddw185.
- 54** Kinghorn KJ, Asghari AM, Castillo-Quan JI. The emerging role of autophagic-lysosomal dysfunction in Gaucher disease and Parkinson's disease. *Neural Regeneration Research*. 2017;12(3):380-384. doi:10.4103/1673-5374.202934.
- 55** Beavan M, McNeill A, Proukakis C, Hughes DA, Mehta A, Schapira AHV. Evolution of prodromal clinical markers of Parkinson disease in a GBA mutation-positive cohort. *JAMA Neurol*. 2015;72(2):201-208. doi:10.1001/jamaneurol.2014.2950.
- 56** Suzuki M, Fujikake N, Takeuchi T, et al. Glucocerebrosidase deficiency accelerates the accumulation of proteinase K-resistant α -synuclein and aggravates neurodegeneration in a Drosophila model of Parkinson's disease. *Human Molecular Genetics*. 2015;24(23):6675-6686. doi:10.1093/hmg/ddv372.
- 57** Tayebi N, Parisiadou L, Berhe B, et al. Glucocerebrosidase haploinsufficiency in A53T α -synuclein mice impacts disease onset and course. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2017;122(4):198-208. doi:10.1016/j.ymgme.2017.11.001.
- 58** Suzuki M, Sango K, Wada K, Nagai Y. Pathological role of lipid interaction with α -synuclein in Parkinson's disease. *Neurochemistry International*. 2018;119:97-106. doi:10.1016/j.neuint.2017.12.014.
- 59** Abul Khair SB, Dhanushkodi NR, Ardah MT, Chen W, Yang Y, Haque ME. Silencing of Glucocerebrosidase Gene in Drosophila Enhances the Aggregation of Parkinson's Disease Associated α -Synuclein Mutant A53T and Affects Locomotor Activity. *Frontiers in Neuroscience*. 2018;12:81. doi:10.3389/fnins.2018.00081.
- 60** Torres-Odio S, Key J, Hoepken H-H, et al. Progression of pathology in PINK1-deficient mouse brain from splicing via ubiquitination, ER stress, and mitophagy changes to neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation*. 2017;14(1):154. doi:10.1186/s12974-017-0928-0.

11. Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Endocannabinoide und andere Lipidmediatoren bei Morbus Parkinson-assozierten Schmerzen: Untersuchung mittels Quantitativer Sensorischer Testung (QST)

in dem Institut für klinische Pharmakologie Klinikum der Goethe-Universität Frankfurt unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Irmgard Tegeder ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Katharina Klatt-Schreiner, Lucie Valek, PhD, Jun-Suk Kang, MD, Alexander Khlebtovsky, MD, Sandra Trautmann, PhD, Lisa Hahnefeld, Yannick Schreiber, BSc, Robert Gurke, PhD, Dominique Thomas, PhD, Annett Wilken-Schmitz, Sabine Wicker, MD, Georg Auburger, MD, Gerd Geisslinger, MD, PhD, Jörn Lötsch, MD, PhD, Waltraud Pfeilschifter, MD, Ruth Djaldetti, MD, and Irmgard Tegeder, MD

High Glucosylceramides and Low Anandamide Contribute to Sensory Loss and Pain in Parkinson's Disease

Movement Disorders Volume 35, Issue 10, Pages 1822-1833. Published: 11 July 2020

(Ort, Datum)

(Unterschrift)