

Aus der

Klinik für Neurologie, Direktor: Prof. Dr. Dr. W. H. Oertel

Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Effekte einer Langzeit-Therapie mit
Pramipexol oder Levodopa auf die [¹²³I]FP-
CIT SPECT in einem Mausmodell der
Parkinson-Krankheit**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Lukas Maurer

aus Illingen

Marburg 2015

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Schäfer

Referent: Prof. Dr. med. G. U. Höglinger

1. Korreferent: Prof. Dr. med. D. Oliver

2. Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. J. W. Bartsch

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom und die funktionelle Bildgebung.....	6
1.2 Funktionelle Bildgebung mit Single-Photon-Emissions-Tomographie.....	7
1.2.1 Funktionsprinzip	7
1.2.2 Multi-Pinhole-SPECT.....	8
1.2.3 [¹²³ I]FP-CIT SPECT - DaTSCAN	10
1.2.4 Dopamintransporter Bildgebung bei der Diagnose der Parkinson-Krankheit.....	11
1.2.5 Funktionelle Bildgebung als Surrogat-Marker für Neurodegeneration ...	12
1.3 6-Hydroxydopamin Modell	14
1.3.1 Wirkmechanismus.....	14
1.3.2 Übersicht 6-OHDA Modelle.....	16
1.4 Medikamentöse Therapie.....	17
1.4.1 Levodopa.....	17
1.4.2 Pramipexol.....	18
1.5 Aufbau und Zielsetzung des vorliegenden Experiments	21
2. Material und Methoden	23
Versuchstiere	23
2.1 23	23
2.2 Stereotaktischen bilateralen Läsion der Substantia nigra pars compacta	23
2.3 Spezifikationen der Levodopa- und Pramipexol-Therapie.....	24
2.4 Durchführung der seriellen [¹²³ I]FP-CIT SPECT Untersuchungen.....	25
2.5 Gewebegewinnung und Aufarbeitung	27
2.6 Immunhistologische Untersuchung	27
2.7 Statistische Analyse	28
3. Ergebnisse	29
3.1 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf die striatale [¹²³ I]FP-CIT-Bindung.....	30
3.2 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf die Anzahl dopaminerger Zellen in der Substantia nigra	32
3.3 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf dopaminerge Fasern im Striatum	34
3.4 Korrelationen der striatalen FP-CIT Bindung mit präsynaptischen Markern	36
4. Diskussion	38
4.1 Bilaterale Läsion der dopaminergen nigrostriatalen Projektion	38

4.2 Einfluss von Levodopa und Pramipexol auf nigrale dopaminerge Neurone	39
4.3 Einfluss von LD und PPX auf striatale dopaminerge Fasern	40
4.4 Einfluss von LD und PPX auf die striatale [¹²³ I]FP-CIT Bindung	41
5. Ausblick	44
5.1 Übertragbarkeit auf die humane Anwendung des FP-CIT SPECT	44
5.2 Schlussfolgerung.....	46
6. Publikation	48
6.1 Zusammenfassung	48
6.2 Abstract.....	49
7. Danksagung.....	51
8. Verzeichnis akademischer Lehrer.....	52
9. Abkürzungsverzeichnis	53
10. Literaturverzeichnis	55

1. Einleitung

1.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom und die funktionelle Bildgebung

Das idiopathische Parkinson-Syndrom, auch als Parkinson-Krankheit bezeichnet, ist die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung weltweit. Sie betrifft Schätzungen zufolge 0,3% der Allgemeinbevölkerung bei einer Prävalenz von 1-2% in der Gruppe der über 60-Jährigen (de Lau and Breteler, 2006). Sie ist klinisch charakterisiert durch ein akinetisch-rigides Syndrom, ausgelöst durch einen verminderten Dopaminspiegel im Striatum (Bernheimer et al., 1973). Die motorischen Kardinalsymptome sind Bradykinesie, Rigidität, Ruhetremor und posturale Instabilität. Zusätzlich treten bei betroffenen Patienten im Krankheitsverlauf verschiedene nicht-motorische Symptome auf, wie autonome Dysfunktion, Demenz, psychiatrische Erkrankungen und Veränderungen des Schlaf/Wach-Rhythmus (Thanvi et al., 2003). Die neuronalen Populationen dopaminerger Zellen in der Substantia nigra pars compacta (SNc) und ihre Projektionen ins Striatum (Str) degenerieren zunehmend im Verlauf der Parkinson-Krankheit (Hirsch et al., 1988). Dieser neurodegenerative Prozess ist gekennzeichnet durch die Akkumulation von Proteinkomplexen in den betroffenen Neuronen, genannt Lewy-Körperchen. Neben dem dopaminergen System sind auch cholinerge, adrenerge und serotonerge Neurone betroffen sowie auch neuronale Populationen im Bereich der Medulla oblongata, des Rückenmarks und des autonomen Nervensystems (Forno, 1996). Die Behandlung dieser Patienten mit Levodopa (LD), einer Vorstufe des Dopamins, oder Dopamin-Rezeptor-Agonisten führt zu einer signifikanten Besserung der motorischen Beeinträchtigung der Erkrankten. Zwar stehen heutzutage effektive medikamentöse Therapien sowie auch interventionelle Verfahren wie die tiefe Hirnstimulation zur symptomatischen Behandlung betroffener Patienten zur Verfügung, das Fortschreiten des zugrunde liegenden neurodegenerativen Prozesses kann jedoch derzeit nicht aufgehalten werden. Dementsprechend ist ein zentrales Ziel der heutigen Parkinson-Forschung die Suche nach krankheitsmodifizierenden bzw. neuroprotektiven Therapien. Insbesondere im Hinblick auf klinische Studien ergibt sich hieraus ein großer Bedarf für eine adäquate in vivo Darstellung des Dopamin-Systems sowie dessen Beurteilung im zeitlichen Verlauf. In diesem Kontext wurden im Laufe der letzten Jahre zunehmend Verfahren der funktionellen Bildgebung als Surrogat-Parameter zur

Abbildung des Ausmaßes und zeitlichen Fortschreitens der Neurodegeneration verwendet. In diesen Untersuchungen wurden unterschiedliche Radioliganden zur Darstellung des nigrostriatalen Systems genutzt um mittels Single-Photon-Emissions-Tomographie (SPECT) oder Positronen-Emissions-Tomographie (PET) den Einfluss von LD (Fahn et al., 2004) und verschiedenen Dopaminagonisten (Oertel et al., 2006; ParkinsonStudyGroup, 2002; Whone et al., 2003) auf den Krankheitsverlauf zu beurteilen. In wie fern die hierbei gewonnenen Ergebnisse als Beleg für einen, den Krankheitsverlauf modifizierenden, Einfluss der verwendeten Medikamente gewertet werden können, ist weiterhin Gegenstand kontroverser Diskussionen (Morrish, 2003; Pavese et al., 2009). Im vorliegenden Experiment wurde in einem Tiermodell der Parkinson-Krankheit eine chronische Therapie der Versuchstiere mit LD und dem Dopaminagonisten Pramipexol (PPX) vorgenommen, um mögliche Effekte mittels serieller [^{123}I]FP-CIT SPECT Untersuchungen zu evaluieren.

1.2 Funktionelle Bildgebung mit Single-Photon-Emissions-Tomographie

1.2.1 Funktionsprinzip

Die Single-Photon-Emissions-Tomographie (SPECT) zählt zu den Verfahren der funktionellen Bildgebung und ist heutzutage eine weit verbreitete Methode zur in vivo Darstellung unterschiedlicher Zielstrukturen in verschiedenen Bereichen der Medizin.

Das Funktionsprinzip basiert auf der Verwendung sogenannter Radiopharmaka. Hierbei handelt es sich um radioaktiv markierte Tracer-Substanzen, die im lebenden Organismus am Metabolismus teilnehmen und somit je nach Beschaffenheit der jeweiligen Tracer-Substanz eine Beurteilung verschiedener Organe zulassen. Zur Markierung werden unterschiedliche radioaktive Isotope wie z.B. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ oder ^{123}I verwendet. Die Kombination aus Radionuklid und Ligand wird als Radiopharmakon bezeichnet. Beim Zerfall des verwendeten radioaktiven Isotops werden Gammaquanten emittiert, die von einem oder mehreren Detektoren registriert werden und das Ausgangssignal für die SPECT Untersuchung darstellen. Die ausgesendete elektromagnetische Strahlung wird von sogenannten Gammakameras detektiert. In diesen befinden sich Szintillationskristalle, die die aufgenommene Energie

in Form von Lichtimpulsen wieder abgeben. Der Gammakamera vorgeschaltet befindet sich ein Kollimator, durch den die einfallende Strahlung gefiltert wird. Durch die räumliche Anordnung des Kollimators können lediglich senkrecht einfallende Gammaquanten passieren und die Szintillationskristalle der Gammakamera erreichen. Die ausgesendeten Lichtimpulse werden an einen Photomultiplier (Sekundärelektronenvervielfacher) weitergeleitet, der diese in ein elektrisches Signal umwandelt. Die Gammakamera rotiert während der Durchführung um das Untersuchungsobjekt, so dass verschiedene Projektionen aufgenommen werden. Aus diesen Projektionen wird in der Folge ein dreidimensionales Modell des Untersuchungsobjektes rekonstruiert. Hierbei werden Algorithmen verwendet, die analog zu Computer- und Magnetresonanz-Tomographien die räumliche Aktivitätsverteilung berechnen und als Schnittbild oder dreidimensionale Rekonstruktion wiedergegeben werden.

1.2.2 Multi-Pinhole-SPECT

Konventionelle SPECT Kameras für die klinische Anwendung sind mit Parallel-Loch-Kollimatoren ausgestattet und bieten in der Regel eine räumliche Auflösung von 5 - 15 mm bei entsprechend großem Beobachtungsfeld und hoher Sensitivität. Diese begrenzte räumliche Auflösung ist nicht ausreichend zur Darstellung sehr kleiner Zielstrukturen, wie beispielsweise die Abbildung von Hirnstrukturen in Versuchstieren wie Maus oder Ratte. Vor dem Hintergrund der enormen Bedeutung dieser Versuchstiermodelle in der präklinischen neurowissenschaftlichen Forschung besteht ein großes Interesse an Methoden zur in vivo Darstellung neuronaler Strukturen und deren Beurteilung im zeitlichen Verlauf. In diesem Kontext kommen sogenannte Mikro-SPECT Techniken zum Einsatz mit deren Hilfe eine deutlich höhere räumliche Auflösung, derzeit in Bereichen von 0,3 – 2 mm, zu Lasten eines entsprechend kleineren Beobachtungsfeldes und einer verminderten Sensitivität erreicht werden können (Nuyts et al., 2009).

Es gibt verschiedene technische Realisierungen für die Anwendung von Mikro-SPECT Techniken, von speziell konstruierten Kleintier-SPECT-Systemen bis zur Bestückung konventioneller Gammakameras mit Pinhole Kollimatoren. Für die hier dargestellten Experimente wurde eine Zwei-Kopf Gamma Kamera verwendet und mit einem Multi-

Pinhole Kollimator ausgerüstet (Schramm et al., 2003). Mit dieser Konzeption ist eine Darstellung des Mäusegehirns mit einer räumlichen Auflösung von 1 - 2 mm möglich (Alvarez-Fischer et al., 2007).

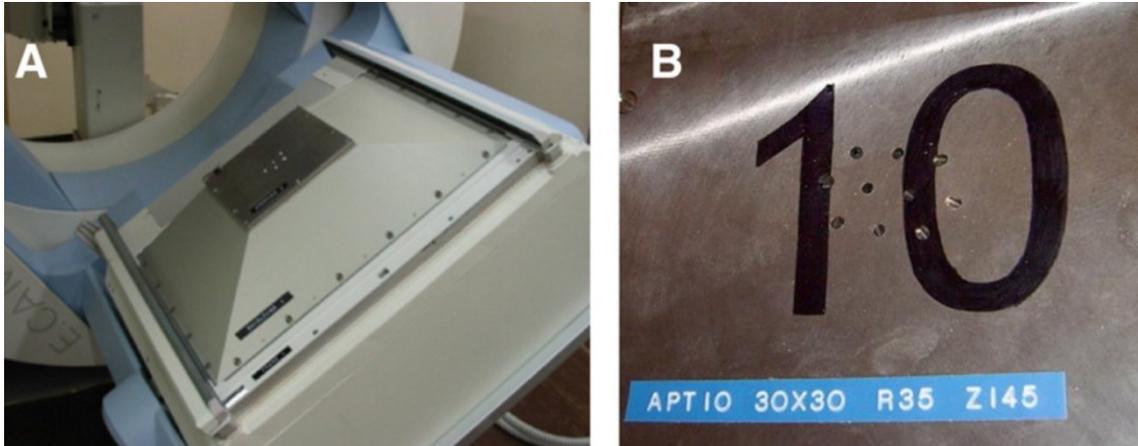


Abbildung 1: A: Gamma-Kamera bestückt mit Pinhole Kollimator; B: 10 Pinhole Kollimator

Das Grundprinzip der Mikro-SPECT Anwendung ist die Verwendung von Pinhole Kollimatoren statt Parallelloch-Kollimatoren. Analog zur Funktionsweise einer Lochblende in der Optik wird durch die Verwendung von Pinhole Kollimatoren eine umgedrehte, vergrößerte Projektion des emittierenden Gammaquantenmusters erzeugt. Die Größe der Projektion ist dabei abhängig von der Entfernung zwischen Objekt und Pinhole Kollimator sowie der Entfernung zwischen Kollimator und Gammakamera. Der entscheidende Nachteil dieses Verfahren ist neben dem eingeschränkten Beobachtungsfeld vor allem der Sensitivitätsverlust. Der Anteil an emittierter Gammastrahlung, der den Detektor erreicht und somit zur Signalverarbeitung genutzt werden kann, ist naturgemäß durch die Verwendung von Pinhole Kollimatoren gegenüber Parallelloch Kollimatoren deutlich herabgesetzt. Um diesen Nachteil zu kompensieren, werden sogenannte Multi-Pinhole/Multi-Plexing Ansätze angewendet (Beekman and Have, 2007). Bei den hier verwendeten Multi-Pinhole Kollimatoren befinden sich mehrere „Lochblenden“ in genau definierten Abständen und Winkeln auf einem Kollimator (Vogel et al., 1978). Hierbei entstehen mehrere sich zum Teil überlappende Projektionen des untersuchten Objektes (Multi-Plexing), die als Grundlage der weiteren Signalverarbeitung dienen. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht in der deutlich höheren Sensitivität im Vergleich zu einem einfachen Pinhole Kollimator. Allerdings ist die eindeutige Rekonstruktion der einzelnen Projektionen

erschwert. Heutzutage werden in erster Linie iterative Verfahren eingesetzt, mit deren Hilfe aus den verschiedenen Einzelprojektionen eine dreidimensionale Rekonstruktion erzeugt werden kann (Schramm et al., 2003).

1.2.3 [¹²³I]FP-CIT SPECT - DaTSCAN

Bei dem in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten [¹²³I]FP-CIT SPECT wurde der kommerziell erhältliche Radiotracer DaTSCAN (GE Healthcare Limited) verwendet. Der Radioligand FP-CIT (N-omega-fluoropropyl-2beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)tropan) ist ein Kokain-Analogon mit der chemischen Grundstruktur eines Phenyltropan und somit ein klassisches Substrat des Dopamintransporters (DAT). FP-CIT wird zur Verwendung als Radiopharmakon mit dem Radionuklid ¹²³Iod gekoppelt, das eine Halbwertszeit von 13 Stunden hat und beim Zerfall Gammastrahlung mit einer Energie von 159 keV freisetzt.

Da der DAT spezifisch auf dopaminergen Neuronen und deren Axonen exprimiert wird, kann die nigrostriatale dopaminerge Projektion durch Markierung dieses präsynaptischen Transportproteins abgebildet werden (Heiss and Hilker, 2004; Nirenberg et al., 1996). [¹²³I]FP-CIT kann als Substrat des DAT daher zur in vivo Darstellung der dopaminergen Innervation des Striatums benutzt werden (Abi-Dargham et al., 1996; Booij et al., 1997; Scheffel et al., 1997).

Bei der Substanz handelt es sich um eine Weiterentwicklung von beta-CIT (2Beta-carbomethoxy-3beta-(4-iodophenyl)tropan), die sich durch eine günstigere Pharmakokinetik (Kuikka et al., 1995) und höhere Selektivität für den DAT auszeichnet (Abi-Dargham et al., 1996). Eine stabile Plateauphase wird nach 1 – 3 Stunden erreicht, so dass mit Durchführung der Untersuchung drei Stunden nach Injektion des Radiopharmakons begonnen werden kann. Zuvor erhalten Patienten Natriumperchlorat zur Blockierung der Iod Aufnahme in die Schilddrüse, um Überlagerungsphänomene zu vermeiden. Typischerweise wird bei der klinischen Anwendung von [¹²³I]FP-CIT eine Dosis von 185 MBq verabreicht, was einer Strahlenbelastung für den Patienten von 2,3 - 4,4 mSv entspricht (Djang et al., 2012). Die Auswertung der Untersuchung erfolgt mittels visueller Beurteilung des SPECT-Signals, analysiert werden striatale Signaldichte, -muster und -symmetrie. Des Weiteren kann eine semiquantitative

Auswertung durch Kalkulation des Verhältnisses von spezifischer zu nicht-spezifischer Anreicherung vorgenommen werden. Hierfür werden entsprechende Vorlagen verwendet, sogenannte Regions of Interest (ROI) oder Volumes of Interest (VOI), mit denen die Signaldichte im Striatum im Vergleich zum Zerebellum als Referenzregion beurteilt wird (Booij et al., 1998).

1.2.4 Dopamintransporter Bildgebung bei der Diagnose der Parkinson-Krankheit

Die [¹²³I]FP-CIT SPECT Untersuchung wurde im Jahr 2000 in der Europäischen Union und 2011 in den USA zur klinischen Anwendung zugelassen. Primär handelt es sich beim idiopathischen Parkinson-Syndrom um eine klinische Diagnose und SPECT Untersuchungen sind nicht grundsätzlich Bestandteil der Routinediagnostik. Der DaTSCAN wird aktuell zur Darstellung eines funktionellen Dopamin-Defizits bei klinisch unsicherem Parkinson-Syndrom eingesetzt (Scherfler et al., 2007; Vlaar et al., 2007). Die in vivo Darstellung des dopaminergen Defizits dient hier zur Abgrenzung des idiopathischen Parkinson-Syndroms von vaskulär bedingten oder medikamentös induzierten Parkinson-Syndromen. Des Weiteren besteht die Indikation zur Durchführung bei Patienten mit klinisch unklaren Parkinson-Syndromen als unterstützende Maßnahme zur Differenzierung zwischen essentiellen Tremor und Parkinson-Syndromen, die auf die idiopathische Parkinson-Krankheit, Multisystematrophie oder progressive supranukleäre Blickparese zurückzuführen sind. Zusätzlich wird das Verfahren bei Patienten als unterstützende Maßnahme zur Differenzierung zwischen einer möglichen Lewy-Körperchen-Demenz und der Alzheimer-Krankheit genutzt (Darcourt et al., 2010).

Kontrovers diskutiert wird aktuell die Eignung des Verfahrens zur Etablierung einer frühen Diagnose des neurodegenerativen Prozesses bei der Parkinson-Krankheit (Booij et al., 1997; Filippi et al., 2005; Marek et al., 1996), sowie zur Beurteilung des Krankheitsstadiums betroffener Patienten (Benamer et al., 2000; Marek et al., 2001).

1.2.5 Funktionelle Bildgebung als Surrogat-Marker für Neurodegeneration

Verschiedene Verfahren der funktionellen Bildgebung zur Darstellung des Dopamin-Systems finden derzeit neben der Anwendung zur Unterstützung der Diagnose des idiopathischen Parkinson-Syndroms auch Verwendung zur Darstellung der Progression der Erkrankung im zeitlichen Verlauf (Benamer et al., 2000; Schapira, 2002; Winogrodzka et al., 2003).

Hiervon ausgehend wurden verschiedene klinische Studien durchgeführt, die eine funktionelle Bildgebung mittels SPECT oder PET als Surrogat-Parameter möglicher krankheitsmodifizierender Effekte verschiedener medikamentöser Therapien evaluierten. Prominente Beispiele hierfür sind die CALM-PD Studie „Comparison Of The Agonist Pramipexole With Levodopa On Motor Complications Of PD“ (ParkinsonStudyGroup, 2002), die REAL-PET Studie – „Requip As Early Therapy Versus Levodopa And PET“ (Whone et al., 2003), die PELMOPET Studie – „Pergolid Versus Levodopa Monotherapy And PET“ (Oertel et al., 2006), sowie die ELLDOPA Studie – „Early Versus Later Levodopa Therapy In PD“ Studie (Fahn et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen wurden kontrovers diskutiert, insbesondere die Frage, in wie weit die z.T. beobachteten Veränderungen in der funktionellen Bildgebung des Dopamin-Systems als Ausdruck einer Modifikation des neurodegenerativen Prozesses zu verstehen sind (Ahlskog, 2003; Morrish, 2002).

Die Untersuchung der verschiedenen, zur Therapie des Morbus Parkinson verwendeten, Medikamente im Hinblick auf ein mögliches neuroprotektives / Krankheitsmodifizierendes Potential, stellt einen Schwerpunkt in der aktuellen Parkinson-Forschung dar. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich nigrostriatale Fasern unter bestimmten Umständen von partiellen Schädigungen erholen können (Stanic et al., 2003b) und dass dopaminerge Substanzen auf unterschiedlichen Ebenen einen Einfluss auf diesen Prozess haben können. Beispiele für medikamentös beeinflussbarer Prozesse sind unter anderem das Aussprossen axonaler Ausläufer aus den verbleibenden Neuronen in der Substantia nigra pars compacta (Murer et al., 1998), ein erhöhter Schutz dopaminerger Neurone vor Neurotoxinen (Lee et al., 2008) sowie die Stimulation der adulten Neurogenese (Hoglinger et al., 2004). Vor diesem Hintergrund drängt sich die Frage auf, ob derartige Phänomene auch bei betroffenen Patienten von Bedeutung sind und wie diese im Rahmen klinischer Untersuchungen

analysiert werden können. Die Frage, ob die mittels funktioneller Bildgebung erhobenen Daten in diesem Zusammenhang als adäquate Surrogat-Parameter zur Beurteilung des Ausmaßes der Neurodegeneration im zeitlichen Verlauf genutzt werden kann, ist weiterhin nicht abschließend geklärt. Insbesondere die z.T. beobachtete Diskrepanz zwischen einer besseren klinischen Kontrolle der Parkinson-Symptomatik bei gleichzeitig größerem Ausmaß der „Neurodegeneration“ bemessen anhand des Signalverhaltens in der funktionellen Bildgebung, schränkt die Interpretierbarkeit der erhobenen Daten ein (Holloway et al., 2004). Ein weiterer Kritikpunkt ist in dem Fehlen einer adäquaten Placebo-Gruppe zu sehen, die einen direkten Vergleich der beobachteten Veränderungen zum Spontanverlauf der Erkrankung ermöglichen würde, aber aufgrund offensichtlicher Einschränkungen in einer klinischen Langzeituntersuchung nicht realisiert werden kann. Darüber hinaus muss die Möglichkeit einer direkten und möglicherweise divergenten Beeinflussung des SPECT oder PET Signals durch eine dauerhafte dopaminerge Medikation in Abgrenzung zu einer tatsächlichen Modulation des neurodegenerativen Prozesses ausgeschlossen werden. In diesem Kontext gibt es vielfältige Belege für direkte pharmakologische Interaktionen unterschiedlicher Substanzen mit der Radiotracer Anreicherung (Booij and Kemp, 2008). Im Hinblick auf die Frage einer direkten Wirkung einer dopaminergen Therapie auf die funktionelle Darstellung des DAT gibt es unterschiedliche Ergebnisse. So erbrachten Studien zur subchronischen Anwendung von Levodopa keine Belege für eine direkte Beeinflussung des [¹²³I]FP-CIT SPECT Signals (Schillaci et al., 2005; Winogrodzka et al., 2001). Untersuchung des Dopaminagonisten Pramipexol (PPX) erbrachten divergente Befunde. In einigen Studien konnten keine Effekte nachgewiesen werden (Ahlskog et al., 1999), in anderen hingegen zeigte sich eine signifikante Abnahme der striatalen DAT Bindung (Guttman et al., 2001). Insgesamt gibt es vor allem im Hinblick auf mögliche Langzeitregulationseffekte einer Dopaminsubstitutionstherapie und deren Bedeutung für die funktionelle Bildgebung nur begrenzt gesicherte Erkenntnisse, so dass der Beweis für eine Eignung dieser Verfahren als Surrogat-Parameter noch aussteht und somit die Interpretierbarkeit der erhobenen Daten als Ausdruck einer tatsächlichen Neuroprotektion oder Krankheitsmodifikation weiterhin in Frage steht.

Vor diesem Hintergrund bestehen bei der Interpretation der Ergebnisse der [¹²³I]β-CIT Studie CALM-PD mehrere Möglichkeiten. In der Studie wurde ein Rückgang des

striatalen SPECT Signals bei Patienten, die mit Levodopa behandelt wurden auf ein signifikant niedrigeres Niveau beobachtet als bei Patienten, die mit PPX behandelt wurden (ParkinsonStudyGroup, 2002). Mehrere Mechanismen kommen als mögliche Erklärung für diesen Unterschied in Betracht: 1.) neurotoxische Wirkung von LD auf dopaminerge Neurone, 2.) neuroprotektive Wirkung von PPX gegen die fortschreitende axonale Degeneration, 3.) PPX-induzierte Regeneration der geschädigten Axone oder 4.) divergente Medikamenten-induzierte Regulation der DAT-Dichte oder -Affinität.

In der CALM-PD Studie konnte keine Unterscheidung zwischen den möglichen zugrunde liegenden biologischen Phänomenen getroffen werden, da keine Placebo-Gruppe untersucht werden konnte, um die Ergebnisse mit einem nicht therapierten, spontanen Krankheitsverlauf zu vergleichen. Darüber hinaus konnte keine histopathologische Untersuchung des Hirngewebes vorgenommen werden, so dass die vorhandenen SPECT Ergebnisse nicht mit neuroanatomischen Daten verglichen werden konnten.

Insbesondere diese Einschränkungen machen eine Interpretation derartig konzipierter klinischer Studien im Hinblick auf mögliche krankheitsmodifizierende Effekte einer Dopamin-Therapie schwierig, so dass eine Transferierung ins Tiermodell mit entsprechender Erweiterung der experimentellen Möglichkeiten sinnvoll erscheint. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden entsprechend dieser Zielsetzung nach dem in Kapitel 1.5 skizzierten Aufbau konzipiert.

1.3 6-Hydroxydopamin Modell

1.3.1 Wirkmechanismus

Bei dem Neurotoxin 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) handelt es sich um ein Dopamin-Analogon mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe. Erstmals isoliert wurde es 1959 von Senoh und Witkop (Senoh et al., 1959). In den 60er Jahren konnte seine biologische Wirksamkeit als Neurotoxin zur selektiven chemischen Denervierung belegt werden. Eine systemische Applikation führt zur Destruktion peripherer, adrenerger

Nervenendigungen (Porter et al., 1963; Thoenen and Tranzer, 1973), mittels intrazerebraler Injektion kann es zu einer selektiven, lokalen Destruktion katecholaminerger Neurone angewendet werden (Ungerstedt, 1968).

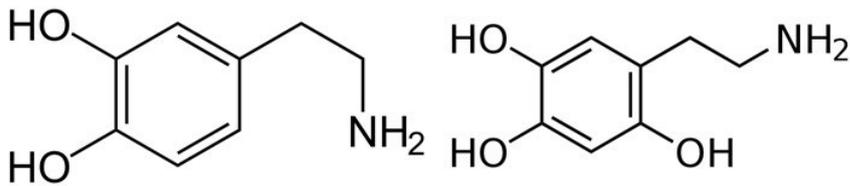


Abbildung 2: Dopamin und 6-Hydroxydopamin

Heutzutage stellt das 6-OHDA Modell eines der am häufigsten genutzten Modelle in der tierexperimentellen Parkinson-Forschung dar. Das Neurotoxin kann ebenso wie Dopamin die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und muss daher direkt intrazerebral injiziert werden. Aufgrund der strukturellen Homologie zu Dopamin und Noradrenalin wird 6-OHDA über membranständige Transporter vorwiegend in diese katecholaminergen Neurone aufgenommen (Jonsson and Sachs, 1971; Luthman et al., 1989). Eine weitere Steigerung der selektiven Wirkung auf dopaminerge Neurone wird durch die direkte Injektion in entsprechend lokalisierte Hirnareale erreicht sowie durch den Einsatz von Desipramin, einem potenten Noradrenalin-Transporter-Blocker, der die Aufnahme in die noradrenergen Neurone und Fortsätze vermindert (Bove et al., 2005; Jonsson, 1980). Heutzutage gilt die Anwendung von 6-OHDA in Tiermodellen für die Parkinson-Krankheit als hocheffektive Methode zur Induktion eines dopaminergen Defizits.

Der Wirkmechanismus von 6-OHDA beruht auf der Akkumulation des Dopaminanalogons in DAT exprimierenden Zellen im Bereich der stereotaktischen Injektion. Dort führt 6-OHDA zu einem teils nekrotischen, teils apoptotischen Zelluntergang. Für die zytotoxische Wirkung scheint oxidativer Stress eine wesentliche Ursache zu sein. 6-OHDA wird durch die Monoaminoxidase deaminiert und unterliegt darüber hinaus einer nicht-enzymatischen Auto-Oxidation, einem Prozess, der in Gegenwart von Eisen deutlich verstärkt werden kann (Blum et al., 2001). Die

Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Wasserstoffperoxid, Superoxidradikale, Hydroxylradikale) wurde in den 70er Jahren (Heikkila and Cohen, 1971; Sachs et al., 1975) belegt. Darüber hinaus bewirkt 6-OHDA eine Inhibition des Antioxidationssystems (Kumar et al., 1995), führt zu einer mitochondrialen Komplex I und IV Inhibition (Glinka et al., 1997) und hat eine genotoxische Wirkung (Bruchelt et al., 1991; Gee et al., 1992).

1.3.2 Übersicht 6-OHDA Modelle

Je nach Zielsetzung kommen unterschiedliche 6-OHDA Modelle zum Einsatz. Zielpunkte der Injektionen sind Substantia nigra pars compacta (SNc), mediales Vorderhirnbündel (medial forebrain bundle, MFB) oder Striatum (caudate-putamen, CPu) (Perese et al., 1989). Akute und relativ ausgeprägte striatale Läsionen entstehen nach Injektionen in die SNc oder das MFB (Deumens et al., 2002). In diesen Modellen kommt es zum Untergang der dopaminergen Neurone innerhalb weniger Tage. Dem gegenüber kann eine Injektion in den CPu zur Induktion eines moderateren Zelluntergangs in der SNc, der über mehrere Wochen fortschreitet, genutzt werden (Sauer and Oertel, 1994). Sowohl uni- als auch bilaterale Läsionen der Zielstrukturen sind möglich. Eine bilaterale Anwendung hat den Vorteil eine größere Ähnlichkeit zum dopaminergen Defizit bei der Parkinson-Krankheit herzustellen, ist allerdings in der Durchführung schwieriger und mit einer erhöhten Mortalität verbunden. Diese ist im Wesentlichen darauf zurückzuführen, dass die Versuchstiere nach dem Eingriff eine passagere Aphagie und Adipsie entwickeln (Ungerstedt, 1971). Daher ist eine aufwendigere Pflege der Tiere in der direkt postoperativen Versuchsphase notwendig (Cenci et al., 2002). Diese Komplikationen treten bei unilateraler Läsion deutlich seltener auf. Darüber hinaus bieten diese „Hemiparkinson“-Modelle die Möglichkeit, das Ausmaß des asymmetrischen Dopamindefizits mittels Untersuchung des Rotationsverhaltens der Tiere in vivo abzuschätzen und in der histologischen Analyse einen direkten Vergleich zwischen lädiertem und intaktem Dopamin-System anzustellen.

1.4 Medikamentöse Therapie

1.4.1 Levodopa

Levodopa (LD) ist die Abkürzung für L-3,4-Di-Hydroxyphenylalanin, eine natürliche Aminosäure, die durch Hydroxylierung von L-Thyrosin entsteht. Aus LD entsteht nach Decarboxylierung durch die AADC (Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase) der Neurotransmitter Dopamin. LD selbst ist im Gegensatz zu Dopamin in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und kann daher systemisch appliziert werden. Die Anwendung erfolgt in Kombination mit der Gabe von peripheren Decarboxylase Inhibitoren. Hierdurch wird die periphere Umwandlung von LD in Dopamin unterdrückt, um unerwünschte Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen und orthostatische Hypotension zu vermeiden. Da diese in erster Linie durch die dopaminerge Stimulation der Area postrema ausgelöst werden, einem Stammhirnareal, das nicht durch eine vollständig ausgebildete Blut-Hirn-Schranke geschützt ist.

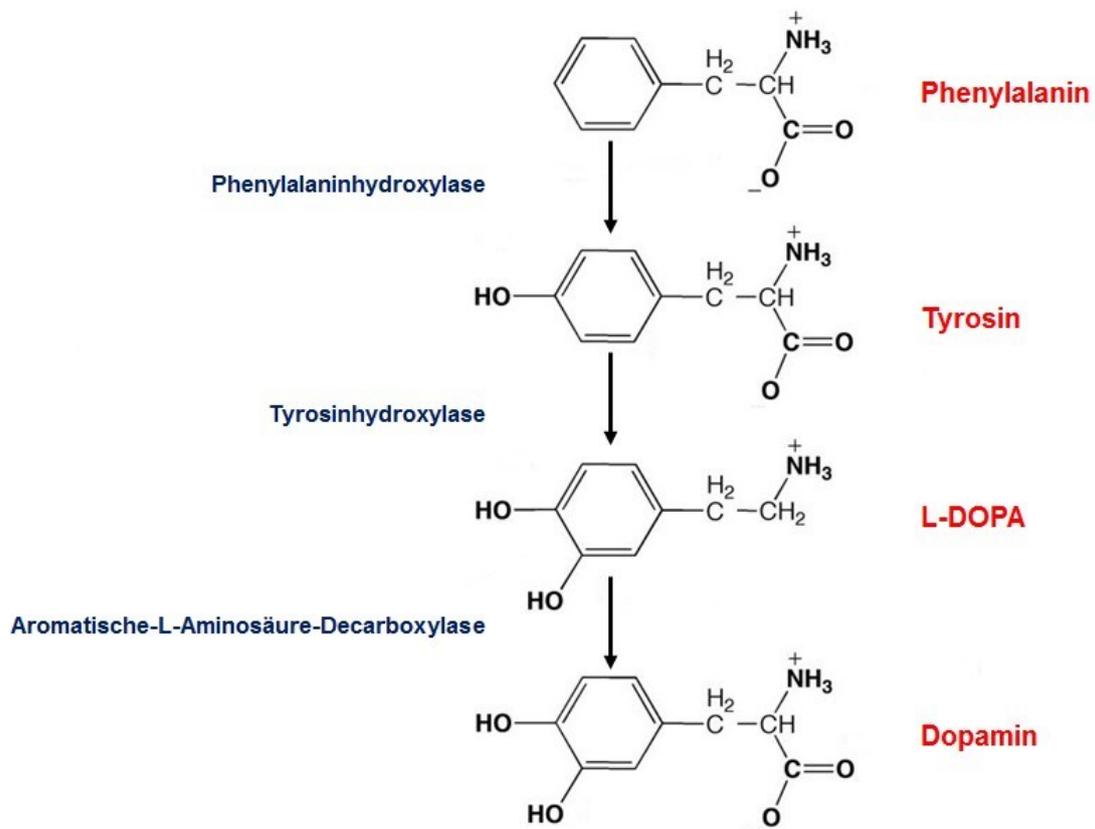


Abbildung 3: Dopamin Biosynthese

LD wurde erstmalig 1910 isoliert. In der Folge entdeckte man, dass das biologisch inaktive LD durch Decarboxylierung in das biologisch aktive Dopamin umgewandelt wird, dessen Vorkommen im Gehirn von Säugetieren und Menschen erstmalig 1957 von Kathleen Montagu untersucht wurde (Montagu, 1957). Der spätere Nobelpreisträger Arvid Carlsson konnte erstmalig zeigen, dass die Gabe von LD im Tiermodell dazu verwendet werden kann, die Effekte von Reserpin zu antagonisieren, einem Medikament zu dessen bekanntem Nebenwirkungsspektrum das Auslösen parkinsonoider, extrapyramidal motorischen Störungen gehören (Carlsson et al., 1957). Wenige Jahre später gelang der Nachweis des Vorliegens eines Dopaminmangels in Gehirnen von Patienten, die an der Parkinson-Krankheit leiden (Ehringer and Hornykiewicz, 1960), gefolgt von den ersten erfolgreichen Versuchen mit der Anwendung von LD zur Therapie betroffener Patienten im Jahr 1962 durch Hornykiewicz und Birkmayer (Birkmayer and Hornykiewicz, 1962).

Heutzutage gilt die Therapie mit LD als Gold-Standard in der Behandlung von Parkinson-Patienten. Die Substanz besitzt die höchste Effektivität im Hinblick auf die motorische Symptomkontrolle (Jankovic, 2002). Darüber hinaus ist eine eindeutige Verbesserung der Lebensqualität nachgewiesen sowie eine Verlängerung der Lebenszeit von Parkinson-Patienten seit Einführung der Therapie (Hoehn, 1992). Zwar bleibt die Wirksamkeit der Therapie auch bei chronischer Anwendung über Jahre hinweg erhalten, jedoch kommt es bei vielen Patienten mit fortschreitender Erkrankungs- bzw. Therapiedauer zu typischen Nebenwirkungen insbesondere Wirkungsfluktuationen, Dyskinesien und neuropsychiatrischen Nebeneffekten (Obeso et al., 2000).

1.4.2 Pramipexol

Bei Pramipexol (PPX) handelt es sich um einen synthetischen Non-Ergot Dopamin Agonisten, der 1997 für die Behandlung der Parkinson-Krankheit zugelassen wurde und heute eines der meist genutzten Medikamente dieser Substanzklasse darstellt. Pharmakologisch zeichnet sich PPX durch eine vorwiegende Wirkung auf die Dopamin-2-Rezeptor Familie mit höchster Affinität für den Dopamin-3-Rezeptor aus (Piercey, 1998). Die Bioverfügbarkeit nach oralen Applikation liegt bei 90%, die Halbwertszeit beträgt 9 - 12 Stunden. Maximale Plasmaspiegel werden zwei Stunden nach

Anwendung erreicht. Die Elimination erfolgt primär renal, eine relevante hepatische Metabolisierung findet nicht statt (Antonini et al., 2010).

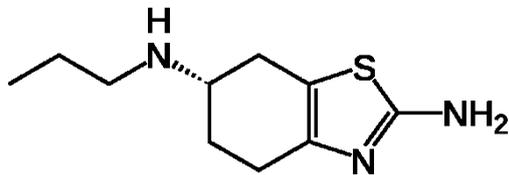


Abbildung 4: Pramipexol

Aktuell ist PPX zur Behandlung der Parkinson-Krankheit sowie des Restless-Legs-Syndroms zugelassen. Zur Behandlung von Parkinson-Patienten wird es als Monotherapie, meist bei Patienten die jünger als 75 Jahre sind, oder in Kombination mit LD angewendet (Eggert K; Oertel W, 2012). Standardmäßig erfolgt eine einschleichende Aufdosierung mit 3-mal täglicher Gabe des Medikaments, alternativ steht eine „extended-release“ Präparation zur Verfügung bei der eine 1-mal tägliche Anwendung erfolgt. Insbesondere in der Frühphase der Parkinson-Krankheit kommt eine Monotherapie mit PPX in Frage. Eindeutige Wirknachweise konnten in mehreren multizentrischen Placebo-kontrollierten Studien dargestellt werden (Hubble et al., 1995; Parkinson Study, 1997; Shannon et al., 1997). Ein wesentliches Ziel der Anwendung von PPX als Monotherapie in der Frühphase bzw. im Verlauf als Kombinationstherapie mit LD besteht in der Verzögerung des Auftretens von motorischen Komplikationen im Kontext einer chronischen LD Therapie. In der CALM-PD Studie konnte gezeigt werden, dass durch die Anwendung dieses Therapieschemas das Auftreten von Motorkomplikationen im Vergleich zu einer initialen LD Therapie signifikant gesenkt werden kann (Parkinson Study, 2000; Parkinson Study Group, 2009). Ausgehend von der aktuellen Datenlage wird die Anwendung von PPX insbesondere bei jüngeren Patienten in der Frühphase der Erkrankung bei geringer bis moderater Symptomausprägung empfohlen, wobei Patienten mit einer stärker ausgeprägten Symptomatik LD, aufgrund der höheren Effektivität im Hinblick auf die Symptomkontrolle, erhalten sollten (Olanow et al., 2009). Eine Besonderheit ist in der Anwendung bei Parkinson-Patienten mit begleitender depressiver Erkrankung zu sehen. Hier ist eine zusätzlich antidepressive Wirkung mit Verbesserung der Lebensqualität für

PPX belegt (Barone et al., 2010). Das antidepressive Wirkungspotential der Substanz wird im Zusammenhang mit der hohen Dopamin-3-Rezeptor Affinität vermutet. Verschiedene Studien haben sich mit der Untersuchung eines möglichen neuroprotektiven bzw. krankheitsmodifizierenden Potentials von PPX auseinandergesetzt. Eine Vielzahl von in-vitro Erhebungen zeigte neuroprotektive Effekte von PPX durch unterschiedliche Mechanismen, wie antioxidative Wirkung (Le et al., 2000), eine Verminderung des Dopamin-Umsatzes (Carter and Muller, 1991) sowie den Schutz von Neuronen vor glutamaterger Neurotoxizität (Carvey et al., 2001). Um die klinische Relevanz dieser Ergebnisse zu untersuchen, wurden umfangreiche klinische Studien wie CALM-PD eingeleitet. Hier zeigte sich in einem Seitenarm der Studie bei Patienten, die initial mit PPX behandelt worden waren, ein geringerer Verlust der striatalen [¹²³I]β-CIT Aufnahme in der SPECT Messung als bei Patienten mit initialer LD Therapie (ParkinsonStudyGroup, 2002). Die Interpretation dieses Surrogat-Markers für die Degeneration dopaminerger Zellen als Ausdruck einer Neuroprotektion, in Abgrenzung zu möglichen medikamentös-induzierten Regulationsphänomenen, ist allerdings insbesondere aufgrund des Fehlens einer Kontrollgruppe und der Möglichkeit einer histologischen Beurteilung stark umstritten (Ahlskog, 2003). In der späteren INSPECT Studie (Investigating The Effect Of Short-term Treatment With Pramipexole Or Levodopa On Beta-CIT And Spect Imaging) zeigten sich keine kurzfristigen Änderung des [¹²³I]β-CIT Signal, so dass sich hier keine Hinweise für das Bestehen kurzfristiger Regulationsphänomen als Ursache für die unterschiedlichen SPECT Signale in CALM-PD fanden (Jennings et al., 2006). Nach den Daten der PROUD Studie (Pramipexole On Underlying Disease) zeigten sich in einem „delayed-start“ Design keine Unterschiede nach 15 Monaten Therapiedauer. Hier wurden zwei Patientengruppen in einem frühen Krankheitsstadium miteinander verglichen, eine Gruppe wurde sofort mit PPX behandelt, die andere Gruppe erhielt für 6-9 Monate eine Placebo-Therapie. In einer zweiten Phase erhielten alle Patienten eine PPX Monotherapie (Schapira et al., 2010). Die Auswertung dieser Studie erbrachte keine Hinweise für einen neuroprotektiven Effekt einer PPX Therapie. Nach 15 Monaten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Hinblick auf die Symptomausprägung der Parkinson-Krankheit in beiden Gruppen. Darüber hinaus wurden in einer Subpopulation der Patienten [¹²³I]FP-CIT SPECT Untersuchungen zu Beginn und nach 15 Monaten durchgeführt. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe, die unmittelbar mit PPX behandelt worden war und den

Patienten, die erst nach 9 Monaten von Placebo-Therapie auf PPX umgesetzt wurden (Schapira et al., 2013).

1.5 Aufbau und Zielsetzung des vorliegenden Experiments

Um die Fragestellung möglicher Krankheits-modifizierender Effekte einer chronischen LD- und PPX-Therapie in Analogie zur klinischen CALM-PD Studie experimentell untersuchen zu können, wählten wir ein Mausmodell der Parkinson-Krankheit. Zur Induzierung einer selektiven Degeneration der dopaminergen nigrostriatalen Projektion führten wir eine stereotaktische Injektion des Neurotoxins 6-OHDA bilateral in die SNc durch. Im Anschluss an den Eingriff wurden die Tiere für vier Wochen ohne weitere Intervention beobachtet. Das Ziel der Einhaltung dieses Zeitintervalls bestand darin, dass sich der induzierte neurodegenerative Prozess stabilisieren konnte und eine fortgeschrittene Läsion des Dopamin-Systems als Ausgangspunkt für die vorgenommenen Untersuchungen vorlag (Alvarez-Fischer et al., 2008). Im Anschluss daran erhielten die Tiere über einen Zeitraum von 20 Wochen über das Trinkwasser LD, PPX oder Placebo. Die Gruppe der Kontrolltiere wurde scheinoperiert (NaCl Injektion) und parallel mit LD, PPX oder Wasser (Placebo) behandelt. Die Entscheidungsgrundlage für die Wahl dieses zeitlichen Ablaufes bestand in der Zielsetzung dieses Experimentes, die primär nicht darin bestand, das neuroprotektive Potential von PPX im Verlauf einer akuten, Toxin-induzierten Neurodegeneration darzustellen, da dies bereits in unterschiedlichen, vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden konnte (Izumi et al., 2007; Joyce et al., 2004; Li et al., 2010; Zou et al., 1999). Das Ziel dieses Experimentes bestand hingegen darin, die Fragen zu untersuchen, ob 1.) LD oder PPX unterschiedliche Effekte auf die dopaminerge Innervation in Tieren mit einer intakten gegenüber einer geschädigten nigrostriatalen dopaminergen Projektion haben, und ob 2.) die [¹²³I]FP-CIT SPECT-Untersuchung es ermöglichen würde, derartige Veränderungen in vivo zu messen. Daher wurden die Versuchstiere vor Beginn, während und zum Ende der Therapiephase einem [¹²³I]FP-CIT SPECTs unterzogen (Alvarez-Fischer et al., 2007). Im Anschluss daran wurden die Tiere getötet, so dass eine immunhistologische Analyse des nigrostriatalen Systems

erfolgen konnte, um Korrelationen zwischen den erhobenen in vivo Daten mit den Ergebnissen einer direkten histologischen Beurteilung zu untersuchen.

Der zeitliche Ablauf des Experimentes ist in **Abbildung 5** dargestellt.

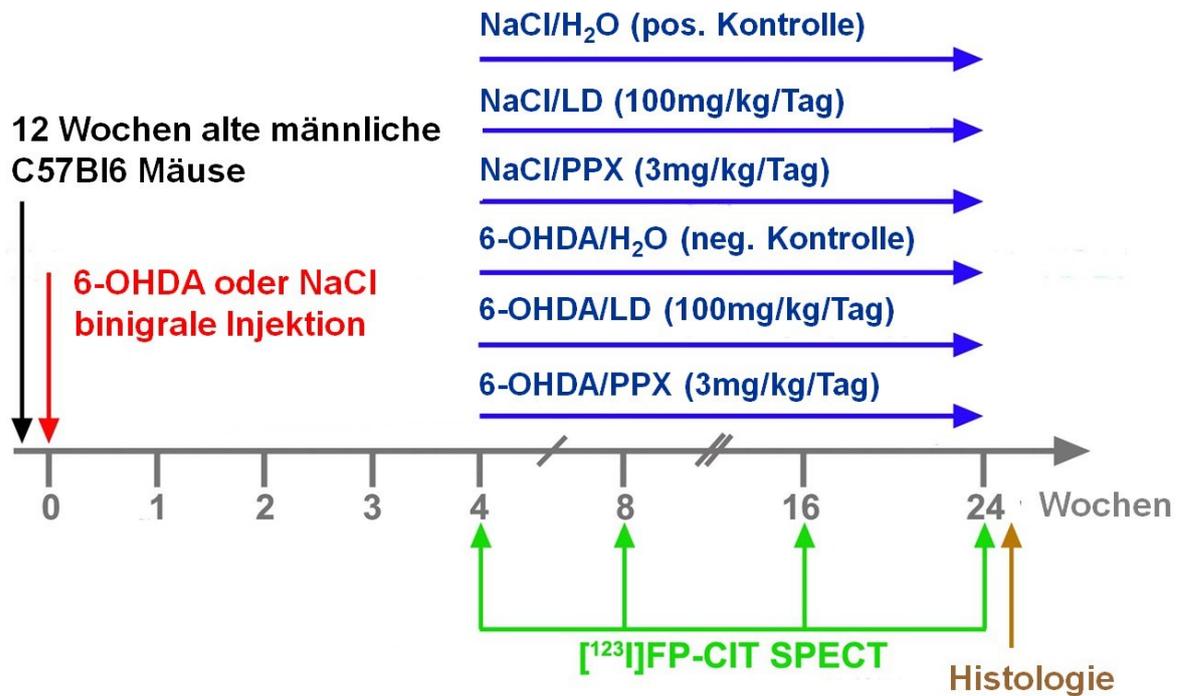


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf des Gesamtexperimentes

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuchsdurchführung wurden zwölf Wochen alte, männliche C57Bl6 Mäuse mit einem Ausgangsgewicht zwischen 20 und 25 g verwendet (Charles River, Sulzfeld). Die Versuchstiere wurden in Temperatur-kontrollierten ($23\pm 1^\circ\text{C}$) Räumen mit einem 12:12 Stunden Tag / Nacht Rhythmus und freiem Zugang zu Futter und Trinkwasser entsprechend der europäischen Versuchstierhaltungsdirektive gehalten (EU Council Directive 86/609/EEC).

Alle Tierversuche wurden entsprechend der in Deutschland geltenden tierschutzrechtlichen Bestimmungen nach Genehmigung durch die Abteilung für Veterinärwesen des Regierungspräsidiums Gießen durchgeführt.

2.2 Stereotaktischen bilateralen Läsion der Substantia nigra pars compacta

Zur Etablierung eines Dopamin-Defizits in den verwendeten C57Bl6 Mäusen induzierten wir eine bilaterale Läsion der SNc durch eine direkte Injektion der Neurotoxins 6-OHDA. Die Auswahl dieses Tiermodells wurde aufgrund mehrerer Aspekte getroffen. Ein Ziel bestand darin, eine möglichst große Homologie zum Dopamin-Defizit einer klinisch manifesten Parkinson-Krankheit herzustellen. Des Weiteren bestand unsere Zielsetzung darin, eine Läsion zu setzen bei der das Ausmaß der Degeneration über 70% der dopaminergen Neurone betritt, um für die Untersuchung im Langzeitmodell eine stabile Läsion zu induzieren, die im Verlauf des Experiments keine spontane Regeneration zeigt, wie es für weniger ausgeprägte und unilaterale Läsionen beschrieben ist (Stanic et al., 2003a).

Vor Applikation des Neurotoxins erhielt jedes Versuchstier eine intraperitoneale Injektion mit Desipramin (25mg/kg Körpergewicht (KG); Sigma Aldrich, München), um die noradrenergen Fasern im Injektionsgebiet gegenüber der 6-OHDA Wirkung zu schützen. 30 Minuten nach Injektion wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion

von Ketamin (10ml/kg KG 1% Ketamin-Lösung, Bela-Pharm, Vechta) und Xylazin (10ml/kg KG 0,2% Xylazin Lösung, Bayer Health Care, Leverkusen) anästhesiert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe, die mittels entsprechender Reflexprüfung kontrolliert wurde, erfolgte das Einspannen des jeweiligen Versuchstieres in einen stereotaktischen Rahmen (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Nachdem Präparation und Trepanation der Schädeldecke abgeschlossen wurden, erhielten die Tiere eine Injektion von 2µl 6-OHDA-Lösung (Sigma Aldrich; 2µg/µl in 0,9% NaCl Lösung mit 0,2% Ascorbinsäure als Antioxidans) oder 2µl isotonische Kochsalzlösung (Schein-Operation) in die linke und rechte SNc. Hierzu wurden folgende Zielkoordinaten angesteuert: Sagittalachse 2,9 mm posterior zu Bregma, Horizontalachse 0,8 mm lateral zu Bregma, Longitudinalachse 4,5 mm ventral zum Niveau der Dura mater (Referenz-Maushirnatlas: Franklin & Paxinos, 1997). Die Applikation von 6-OHDA bzw. NaCl Lösung wurde über eine Mikropumpe gesteuert (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) und erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 0,5 µl/min. Nachdem der Injektionsvorgang abgeschlossen war, wurde die Injektionskanüle (33 Gauge, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) für weitere fünf Minuten im Zielareal belassen, um eine vollständige Diffusion des applizierten Neurotoxins ins Hirngewebe zu ermöglichen. Anschließend wurde die Kanüle langsam zurückgezogen und die Wunde verschlossen. Nach Beendigung der Prozedur wurden die Tiere für zwölf Stunden in Einzelhaltung gesetzt. Bis zur vollständigen Auflösung der Narkosewirkung erfolgte eine externe Wärmezufuhr mittels Rotlichtlampe unter engmaschiger Überwachung der Körpertemperatur.

2.3 Spezifikationen der Levodopa- und Pramipexol-Therapie

Im Anschluss an die Durchführung der stereotaktischen Läsion erfolgte eine vierwöchige Beobachtungsphase, in der die Versuchstiere keiner medikamentösen Behandlung unterzogen wurden. Im Verlauf dieser Zeitspanne konnte die Degeneration im nigrostriatalen System ein stabiles Niveau erreichen (Alvarez-Fischer et al., 2008). Nach Abschluss dieser Periode erhielten die Versuchstiere über einen Zeitraum von 20 Wochen über Tag (07:00 – 19:00 Uhr) keinen Zugang zu Trinkwasser. In der Nachtphase (19:00 – 07:00 Uhr), der Aktivitätsphase der Tiere, hatten diese freien

Zugang zu Trinkwasser. Die Medikamentenapplikation erfolgte über den Zusatz von PPX bzw. LD zum Trinkwasser, in einer Dosierung von 0,03 mg/ml PPX(Sigma Aldrich) und 1 mg/ml LD mit zusätzlich 0,25 mg/ml Benserazid (Sigma Aldrich) oder keinem Zusatz in den jeweiligen Kontrollgruppen. Die hierdurch erzeugte zirkadiane Rhythmik der Medikamentenaufnahme wurde gewählt, um zeitliche Dynamik und Fluktuationen der erreichten Plasmakonzentration bei der Medikamenteneinnahme in der klinischen Anwendung abzubilden. Die Trinkwasserlösungen wurden jeden zweiten Tag erneuert, um Inaktivierung und Abbauphänomenen vorzubeugen. Bei einer, in Vorversuchen ermittelten, durchschnittlichen und im Verlauf weitestgehend konstanten Trinkmenge von 3 ml/Tag, erhielten die Mäuse bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 30 g im Schnitt eine Dosis von 3 mg/kg KG PPX oder 100 mg/kg KG LD. Die genannten Dosierungen wurden aufgrund bereits veröffentlichter Daten zur biologischen Wirksamkeit der genannten Substanzen in Mäusen gewählt (Hoglinger et al., 2004; Winner et al., 2009).

2.4 Durchführung der seriellen [¹²³I]FP-CIT SPECT Untersuchungen

Die [¹²³I]FP-CIT SPECT-Untersuchungen wurden sequenziell zu unterschiedlichen Zeitpunkten entsprechend des in **Abbildung 5** dargestellten Versuchsablaufs durchgeführt. Die erste Datenerhebung erfolgte zur Bestimmung des Ausgangsniveaus vier Wochen nach Durchführung des operativen Eingriffs und vor Beginn der medikamentösen Therapie. Im Anschluss wurden Folgeuntersuchungen zur Verlaufsbeurteilung vier, zwölf und zwanzig Wochen nach Beginn der Medikamentengabe durchgeführt, um Auftreten und zeitlichen Verlauf eventueller Therapieeffekte zu charakterisieren. Versuchstiere aus der NaCl/LD und NaCl/PPX Gruppe wurden aufgrund der limitierten Untersuchungskapazitäten lediglich einmal am Ende der Therapiephase untersucht. Bei jeder Versuchsdurchführung wurde den Tieren 20 MBq [¹²³I]FP-CIT (spezifische Aktivität zum Injektionszeitpunkt 132-317 GBq/μmol) in die Schwanzvene injiziert (Alvarez-Fischer et al., 2007). Die Datenerfassung startete zwei Stunden nach Injektion, da aufgrund der pharmakokinetischen Eigenschaften des FP-CIT-Tracers zu diesem Zeitpunkt von einem stabilen Verteilungsvolumen ausgegangen werden kann. Aufgrund zunehmender

Vernarbung der Schwanzvenen bei einigen Tieren nach wiederholter Punktion, war nicht bei allen Tieren zu jedem Messzeitpunkt eine Applikation des Radiopharmakons und somit eine Durchführung der SPECT-Untersuchung möglich. Die Versuchstiere wurden 15 Minuten vor Beginn der Tomographie anästhesiert (10 ml/kg KG 1% Ketamin und 0,2% Xylazin). Die Datenerfassung erfolgte mittels einer rotierenden Zwei-Kopf Gamma Kamera (E.CAM, Siemens Medical Solutions, IL, USA) mit einer Projektionsfläche von 533 x 387 mm. Die Gamma Kamera wurde zuvor mit einem 10-Pinhole Kollimator ausgerüstet (**Abbildung 1**). Für eine Aufnahmeserie wurden 60 Projektionen mit jeweils 60.000 Counts (registrierte Einzelsignale) auf eine 128 x 128 Matrix im „Step and Shot“ Modus aufgenommen. Der Rotationsradius betrug 35 mm und es wurde ein Hardware-Zoom von 1,45 benutzt. Das Energieniveau wurde auf 159 keV gesetzt mit einer zulässigen Abweichung von 15%. Die dreidimensionalen Datensätze wurden aus den verschiedenen Projektionen mittels Verwendung eines multiplikativen Iterationsalgorithmus (OSEM) rekonstruiert, der speziell für die Verwendung eines Pinhole SPECTs konzipiert wurde (HiSPECT, Scivis wissenschaftliche Bildverarbeitung, Göttingen). Der rekonstruierte dreidimensionale DICOM Datensatz wurde anschließend auf eine Matrix mit 64 x 64 x 128 isotropen 0,4 mm Voxeln skaliert. Vor Beginn der Datenanalyse wurden die jeweiligen SPECT-Aufnahmen mit einer Magnetresonanz-Tomographie-Vorlage des Mäusegehirns (Brookhaven C57Bl6 mouse brain MRI template) fusioniert (Ma et al., 2008). Hierfür wurde das Fusionstool Pmod 2.95 Software Packet verwendet (Pmod, Zürich, Schweiz). Anschließend wurden aus den Aufnahmen des jeweiligen Tieres zu den verschiedenen Zeitpunkten nach vier, acht, sechzehn und vierundzwanzig Wochen der Durchschnittswert mittels SPM2 (Statistical Parametric Mapping 2, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College, London, Großbritannien) ermittelt. Die einzelnen Aufnahmen wurden automatisch zu diesem Mittelwert ko-registriert unter Verwendung der „co-register“ Funktion des SPM2 Programms. Die durchschnittliche Radioaktivitätskonzentration der anhand der MRT-Vorlage vordefinierten Zielregionen (Volume Of Interest, VOI), wurde mittels der VOI-Funktion des Software Paketes Pmod 2.95 ausgelesen. Das Bindungspotential BP_{ND} als Zielparameter wurde als $BP_{ND}=(C_{Region}/C_{Reference})-1$ berechnet, wobei $C_{Reference}$ der Radioaktivitätskonzentration im Zerebellum entspricht, einer Gehirnregion mit stabiler, basaler Radioligandenbindung als Referenzregion. Die Darstellungen der parametrischen durchschnittlichen Bindungspotentiale BP_{ND} wurden für die verschiedenen Gruppen

mittels Pmod 2.95 erzeugt. Für die statistische Auswertung wurden abschließend die [¹²³I]FP-CIT BP_{ND} Werte zum durchschnittlichen Ausgangswert der NaCl/H₂O Gruppe normalisiert.

2.5 Gewebegewinnung und Aufarbeitung

Am Ende der Therapiephase wurden die Versuchstiere mit 100 mg/kg KG Pentobarbital (Sigma Aldrich) getötet und anschließend transkardial perfundiert, um eine entsprechende histologische Aufarbeitung des Hirngewebes zu ermöglichen. Hierfür wurden nach transkardialer Punktion des linken Ventrikels und Eröffnung des rechten Vorhofs 50 ml isotonische Kochsalzlösung infundiert, gefolgt von 100 ml 4% Paraformaldehyd-Lösung (Sigma Aldrich). Nach Dekapitation der Versuchstiere wurden die Hirne vorsichtig vom Schädel abgelöst und anschließend für weitere 24 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Zur Vorbeugung von Gefrierartefakten wurde das Gewebe danach für 48 Stunden in einer 30% Sucrose/Phosphat-Puffer-Lösung inkubiert und danach auf Trockeneis schockgefroren. Unter Verwendung eines Kryomikrotoms wurden von den Hirnen in den Bereichen von Striatum bis Substantia nigra 30 µm dicke koronare Schnitte angefertigt. Diese wurden in zehn parallelen Serien in „Antifreeze“ Puffer gesammelt (30% Ethylenglycol, 30% Glycerin) und bei -20°C gelagert.

2.6 Immunhistologische Untersuchung

Die frei schwimmenden Schnitte wurden mit 3% Triton X-100 in 0,1M Phosphat-Puffer (PB)-Lösung vorbereitet (Sigma Aldrich). Nicht-spezifische Epitope und die endogene Peroxidase wurden mit 5% Standard Pferde Serum (NHS; Sigma-Aldrich; gelöst in 0.1 M PB) und 30% H₂O₂/Methanol Lösung blockiert (Sigma Aldrich). Nach mehreren Waschschritten in 0,1 molarer PB-Lösung, wurden die Gewebeschnitte mit den Primärantikörpern (gelöst in 0.1 molare PB mit 1% NHS) für 14 Stunden bei 4°C inkubiert. Hierfür wurden folgenden Primärantikörper verwendet: Hase polyklonal (P40101-0; Pel-Freez Biologicals, Rogers, AR, USA; 1/1000) und Schaf polyklonal

anti-Tyrosinhydroxylase (TH; AB1542; Chemicon International, Temecula, CA, USA; 1/500), Ratte monoklonal anti-Dopamintransporter (DAT; MAB369; Chemicon International; 1/1000). Die Bindung der Primärantikörper wurde visualisiert durch Verwendung von biotinylierten Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg; 1/200) in Verbindung mit einer Standard Avidin-Biotin-Peroxidase Technik und anschließender Anfärbung mit 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma-Aldrich) und Zusatz von Nickel Ammonium Sulfat (Fluka, Buchs, Schweiz).

2.7 Statistische Analyse

Zur statistischen Datenanalyse wurde das Software Packet Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) verwendet. Die gezeigten Daten werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Angewendet wurde ein Two-way Analysis Of Variance (ANOVA) Test gefolgt von einem post-hoc Least Significant Difference (LSD) Test. Werte für p kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

Die verschiedenen Versuchsgruppen wurden entsprechend der in **Abbildung 5** dargestellten Aufteilung in Abhängigkeit der vorgenommenen stereotaktischen Injektion und der anschließenden medikamentösen Behandlung in folgende Gruppen eingeteilt: NaCl/H₂O, NaCl/LD, NaCl/PPX, 6-OHDA/H₂O, 6-OHDA/LD und 6-OHDA/PPX. Von 35 bzw. 43 Versuchstieren, die initial operiert wurden und eine intranigrale Injektion mit NaCl bzw. 6-OHDA erhielten, überlebten 34 bzw. 36 die vierwöchige Stabilisierungsphase. In der darauf folgenden 20 Wochen andauernden Therapiephase bestand bei den Tieren mit Läsion des dopaminergen Systems nur eine geringe Restmortalität. Ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit der zugeführten medikamentösen Therapie ergab sich nicht ($p = 0,3$). Die Anzahl der Versuchstiere, die für den kompletten Versuchsdurchlauf zur Verfügung standen und somit in die Analyse miteinbezogen werden konnten, ist in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: Anzahl der Versuchstiere zum jeweiligen Versuchszeitpunkt

Anzahl (n)	Therapie -beginn	SPECT				Histologie
		4	8	16	24	
Wochen nach Läsion						24
NaCl/H₂O	14	14	8	5	14	14
NaCl/LD	10	-	-	-	8	8
NaCl/PPX	10	-	-	-	9	9
6-OHDA/H₂O	10	10	6	6	7	7
6-OHDA/LD	13	13	7	4	5	5
6-OHDA/PPX	13	13	8	7	8	8

Abkürzungen: H₂O: Trinkwasser ohne Medikamentenzusatz; LD: Trinkwasser im Levodopa/Benserazid Zusatz; n: Anzahl der Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt; NaCl: bilaterale nigrale Injektion mit isotonomischer Kochsalzlösung; 6-OHDA: bilaterale nigrale Injektion mit 6-OHDA; PPX: Trinkwasser mit Pramipexol; SPECT: [¹²³I]FP-CIT-Single-Photon-Emissionstomographie

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

3.1 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf die striatale [¹²³I]FP-CIT-Bindung

Repräsentative parametrische Darstellungen der [¹²³I]FP-CIT Bindung BP_{ND} am Ende der Versuchsdurchführung (24 Wochen nach stereotaktischer Läsion, d.h. 20 Wochen nach Beginn der medikamentösen Therapie), sind für die jeweiligen Gruppen in **Abbildung 6A** dargestellt. Über den Zeitraum von 20 Wochen hinweg zeigte sich bei dem Vergleich der entsprechenden Datenpaare der unterschiedlichen Versuchsdurchläufe ein leichter Anstieg der [¹²³I]FP-CIT Bindung in der NaCl/H₂O Gruppe ($p < 0,01$). Bei linearer Korrektur dieser systematischen Zunahme, ergab sich eine Test-Re-Test-Variabilität von $9 \pm 0,7\%$ für die 127 Paare wiederholter SPECT-Messungen mit einer Streuung zwischen 7% und 10% in den vier Versuchsgruppen, bei denen serielle SPECT-Untersuchungen durchgeführt wurden (NaCl/H₂O, 6-OHDA/H₂O, 6-OHDA/LD und 6-OHDA/PPX). Eine Two-way ANOVA Varianzanalyse zeigte für die Gruppen der mit 6-OHDA lädierten Tiere zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der FP-CIT Bindung unabhängig der verabreichten Medikation. Ausgehend von den Ergebnissen der funktionellen DAT-Bildgebung zeigte sich somit das Ausmaß der Läsion der nigrostriatalen Fasern als konstant. Vier Wochen nach Durchführung der stereotaktischen Läsion, unmittelbar vor Beginn der medikamentösen Therapiephase, zeigten die operierten Tiere erwartungsgemäß eine deutliche Abnahme der striatalen [¹²³I]FP-CIT Bindung (6-OHDA/H₂O: $-67.0 \pm 3.0\%$; 6-OHDA/LD: $-65.2 \pm 2.6\%$; 6-OHDA/PPX: $-64.3 \pm 2.8\%$; $p < 0.001$ im Vergleich zu NaCl/H₂O Mäusen; **Abbildung 6B**). Nach Ablauf der 20 wöchigen Therapiephase zeigte sich weder für LD noch für PPX ein signifikanter Einfluss auf die striatale [¹²³I]FP-CIT Bindung der lädierten Tiere (6-OHDA/H₂O: $-70.0 \pm 3.9\%$; 6-OHDA/LD: $-66.8 \pm 5.3\%$; 6-OHDA/PPX: $-63.7 \pm 4.6\%$; **Abbildung 6B & C**). Es ergaben sich an dieser Stelle keinerlei Hinweise auf Veränderungen durch die Anwendung von PPX oder LD im Vergleich zur Placebogabe. Im Gegensatz dazu bestand in der Gruppe der scheinlädierten Tiere (NaCl Injektion) eine signifikante Reduktion der [¹²³I]FP-CIT Bindung nach Behandlung mit LD ($-20.7 \pm 5.0\%$) und PPX ($-14.0 \pm 4.6\%$) im Vergleich zu der nicht medikamentös behandelten Kontrollgruppe ($p < 0.01$; **Abbildung 6D**).

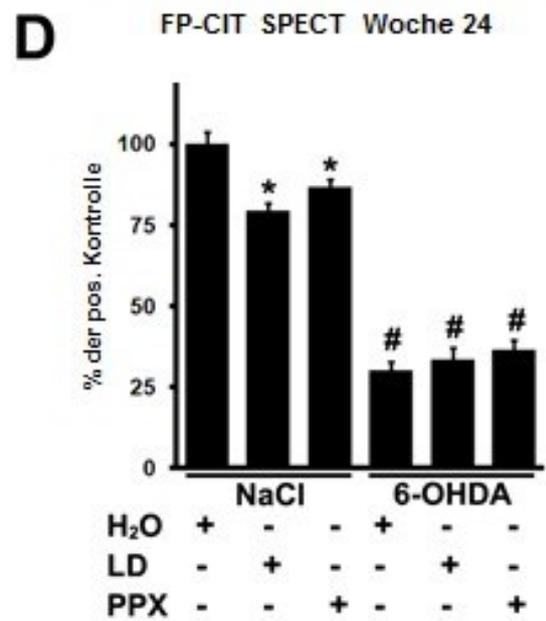
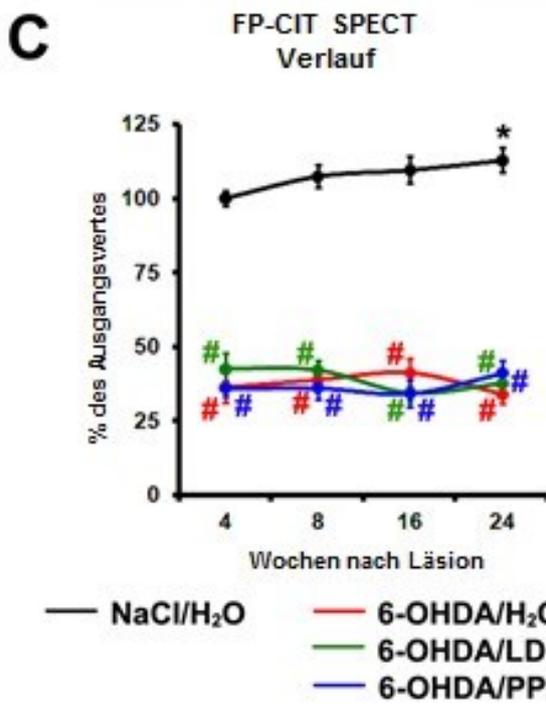
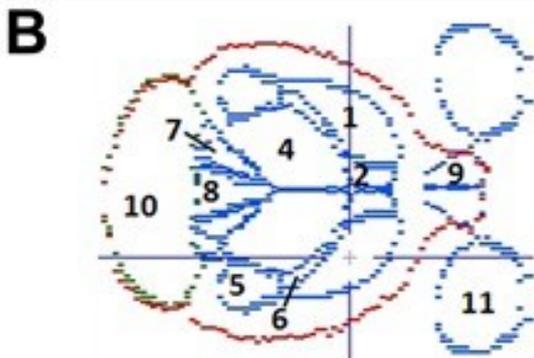
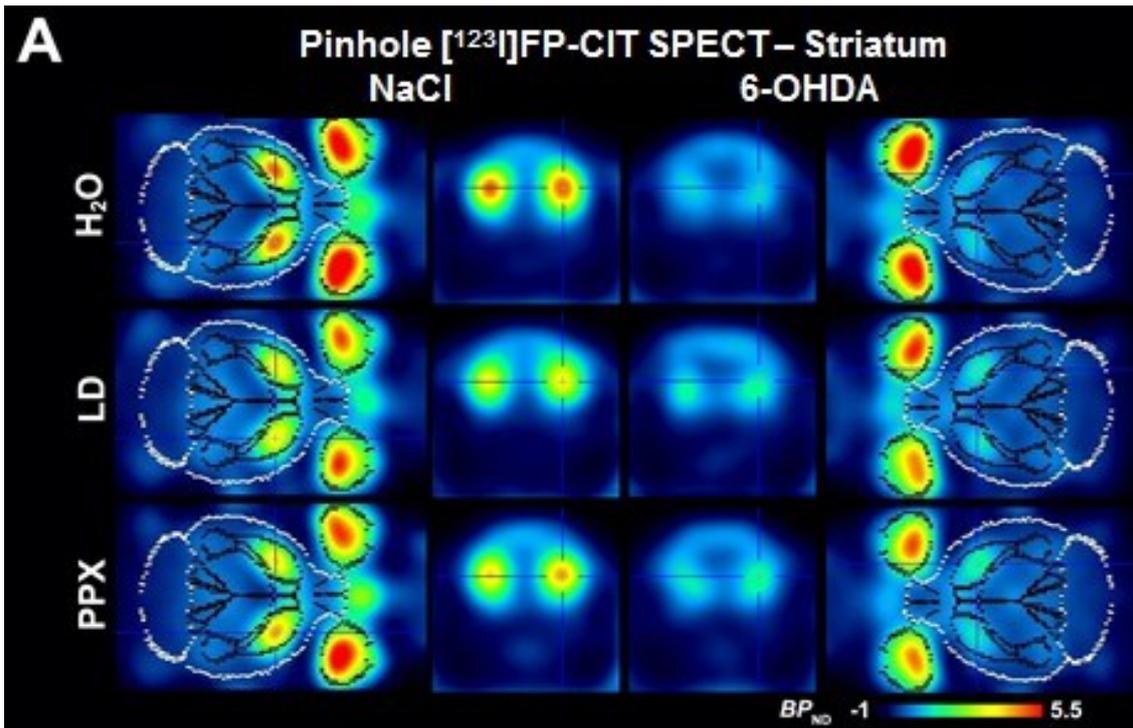


Abbildung 6: [¹²³I]FP-CIT SPECT Darstellung

A: Parametrische [¹²³I]FP-CIT SPECT Darstellung der durchschnittlichen Tracer-Anreicherung aller Versuchstiere der jeweiligen Gruppe nach Abschluss der Medikationsphase. Koronare und horizontale Schichten sind in Überlagerung mit der MRT-Atlas-Schablone dargestellt, die zum Auslesen des regionalen Bindungspotentials (BP_{ND} , Spektrum -1 bis 5,5) verwendet wurden. Zusätzlich zur spezifischen Tracer Anreicherung im Striatum ist die symmetrische Radiotracer Aufnahme im Bereich der beiden Orbitae über die Haderschen Drüsen zu beobachten.

B: Separate Darstellung der jeweiligen Schichten der Atlas-Vorlage mit folgenden Regions of Interest: 1. Striatum, 2. ventrales Vorderhirn, 3. Hypothalamus, 4. Thalamus, 5. Hippocampus, 6. Pallidum, 7. Mesencephalon, 8. periaquäduktales Grau, 9. Bulbus olfactorius, 10. Zerebellum, 11. Hadersche Drüsen.

C: Verlauf des [¹²³I]FP-CIT SPECT-Signals über den Behandlungszeitraum von 20 Wochen in den verschiedenen Gruppen (NaCl/H₂O: schwarze Kurve; 6-OHDA/H₂O: rote Kurve; 6-OHDA/LD: grüne Kurve 6-OHDA/PPX: blaue Kurve) im Vergleich zum Ausgangswert (4 Wochen nach Läsion) der NaCl/H₂O Kontrollgruppe.

D: [¹²³I]FP-CIT SPECT-Signal zum Abschlusszeitpunkt nach 20 wöchiger Behandlungsphase für alle Versuchstiergruppen. Weder LD noch PPX beeinflussten die striatale FP-CIT Bindung in 6-OHDA-lädierten Tieren, reduzierten allerdings die FP-CIT Bindung in der Kontrollgruppe. Fehlerbalken Darstellung für S.E.M., * $p < 0,01$, # $p < 0,001$ vs. NaCl/H₂O; ANOVA, post-hoc LSD-Test

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

3.2 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf die Anzahl dopaminergere Zellen in der Substantia nigra

Nach Tötung der Versuchstiere wurde zunächst das Ausmaß der 6-OHDA-induzierten Läsion des dopaminergen Systems durch quantitative Bestimmung der Tyrosinhydroxylase-positiven (TH⁺) Neurone in der SNc evaluiert. Hier zeigte sich, dass die bilaterale nigrale 6-OHDA Injektion zu einer ausgeprägten Reduktion der Anzahl TH⁺ Zellen in der SNc führte (**Abbildung 7A**). Die Behandlung mit PPX oder LD im Vergleich zur Kontrollgruppe hatte keinerlei Effekt auf die Anzahl TH⁺ Zellen in der SNc. Weder in der Gruppe der Tiere, die eine 6-OHDA Injektion erhalten hatten (NaCl/LD: $-2.5 \pm 4.7\%$; NaCl/PPX: $+5.1 \pm 5.3\%$ im Vergleich NaCl/H₂O) noch in der Gruppe der nicht-lädierten Tiere wurden signifikante Veränderungen beobachtet (6-

OHDA/H₂O: $-87.4 \pm 2.9\%$; 6-OHDA/LD: $-88.0 \pm 3.5\%$; 6-OHDA/PPX: $-88.4 \pm 3.3\%$;
Abbildung 7B).

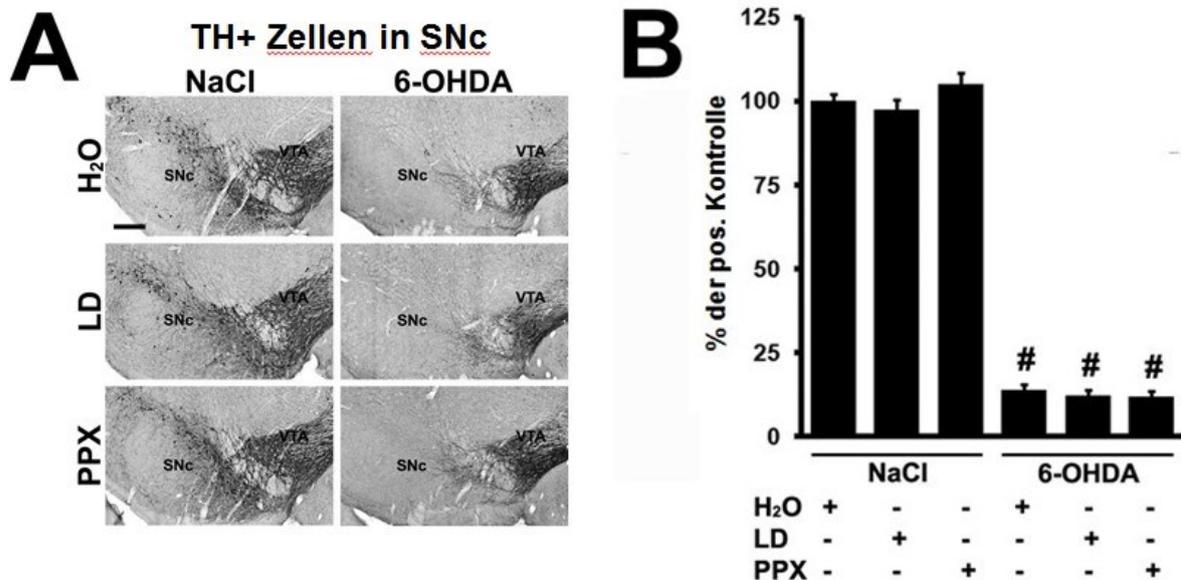


Abbildung 7: Immunhistologische Darstellung Tyrosinhydroxylase-positiver (TH⁺) Zellen in der Substantia nigra pars compacta (SNc)

A: Repräsentative Abbildung TH⁺ Neurone in der SNc und dem ventralen Tegmentum Areal (VTA) der verschiedenen Versuchsgruppen mit einer relativ selektiven, subtotalen Verminderung TH⁺ Zellen im Bereich der SNc in den Gruppen der mit 6-OHDA lädierten Tiere im Vergleich zur Scheinoperation mit NaCl Injektion.

B: Darstellung der stereologischen Zellzählung TH⁺ Zellen in der SNc der verschiedenen Gruppen im Vergleich zur durchschnittlichen Zellzahl der Kontrollgruppe (NaCl/H₂O – absolute Zellzahl in dieser Gruppe 9880 ± 279). Die Behandlung mit LD oder PPX hatte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen (6-OHDA und Scheinoperation), die keine Medikation erhielten, keinen Einfluss auf die Anzahl TH⁺ Zellen in der SNc. Fehlerbalken Darstellung für S.E.M., # $p < 0,001$ vs. NaCl/H₂O; ANOVA, post-hoc LSD-Test.

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

3.3 Effekte der LD- und PPX-Therapie auf dopaminerge Fasern im Striatum

Zur Untersuchung der dopaminergen Innervation des Striatums wurde eine optische Dichtebestimmung der TH⁺ und DAT⁺ Zellfasern vorgenommen (**Abbildung 8**). Die Faserdichte war in der Gruppe der 6-OHDA/H₂O Tiere im Vergleich zu den NaCl/H₂O Kontrolltieren in Folge der zu Beginn des Experiments erfolgten Neurotoxin Anwendung deutlich vermindert (TH: $-76.7 \pm 3.6\%$; DAT: $-75.2 \pm 4.7\%$; $p < 0.001$; **Abbildung 8 A-D**). Der durch die bilaterale nigrale 6-OHDA Injektion verursachte Verlust an striatalen dopaminergen Fasern wurde weder durch die Behandlung mit LD (TH: $-70.3 \pm 5.3\%$; DAT: $-69.5 \pm 5.6\%$) noch durch PPX (TH: $-72.3 \pm 5.8\%$; DAT: $-74.7 \pm 4.0\%$) signifikant verändert (**Abbildung 8 A-D**). Im Gegensatz dazu führte die dopaminerge Therapie bei den Kontrolltieren interessanterweise zu einer Abnahme der TH-Immunreaktivität (NaCl/LD: $-41.5 \pm 8.0\%$; NaCl/PPX: $-44.9 \pm 4.4\%$; $p < 0.01$; **Abbildung 8 A, B**) bei gleichzeitiger Zunahme der DAT-Immunreaktivität (NaCl/LD: $+41.6 \pm 4.3\%$; NaCl/PPX: $+32.9 \pm 4.6\%$; $p < 0.01$; **Abbildung 9 C, D**) im Vergleich zur Gruppe der unbehandelten Kontrolltiere.

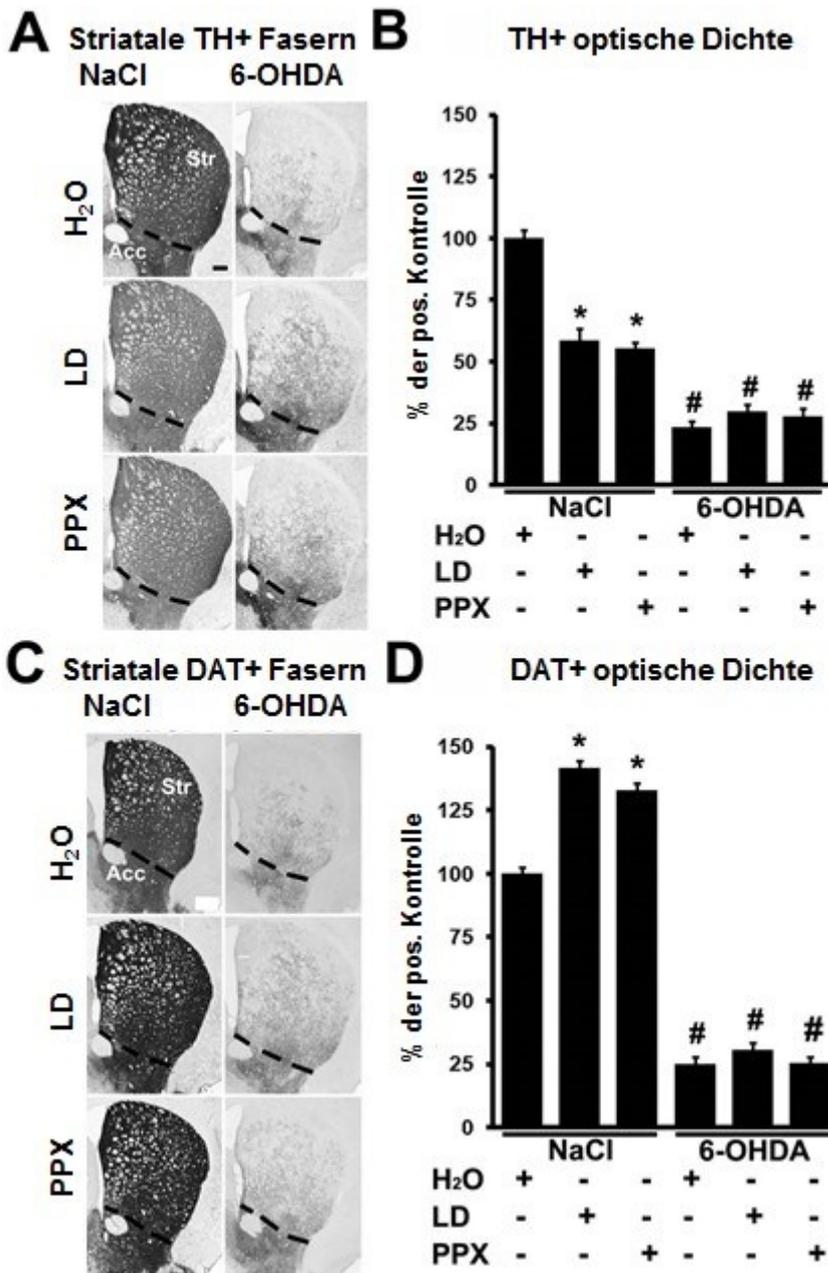


Abbildung 8: Striatale TH⁺ und DAT⁺ Faserdichte

A: Repräsentative Abbildung der striatalen TH⁺ Faserdichte der verschiedenen Versuchsgruppen, die durchbrochene Linie zeigt die Grenze zwischen Nucleus accumbens (Acc) und übrigen Striatum (Str).

B: TH⁺ Faserdichte im Striatum – Bestimmung mittels optischer Dichtemessung – der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/H₂O). Die Behandlung mit PPX oder LD hatte keinen Einfluss auf die TH-Immunreaktivität in 6-OHDA-lädierten Tieren ($p > 0,05$), führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion in der Gruppe der Kontrolltiere. Fehlerbalken Darstellung S.E.M., * $p < 0,01$; # $p < 0,001$ vs. NaCl/H₂O; ANOVA, post-hoc LSD-Test.

C: Repräsentative Abbildung der striatalen DAT⁺ Faserdichte der verschiedenen Versuchsgruppen, die durchbrochene Linie zeigt die Grenze zwischen Acc und Str.

D: DAT⁺ Faserdichte im Striatum – Bestimmung mittels optischer Dichtemessung – der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (NaCl/H₂O). Die Behandlung mit PPX oder LD hatte keinen Einfluss auf die DAT-Immunreaktivität in 6-OHDA lädierten Tieren ($p > 0,05$), führte allerdings zu einer signifikanten Reduktion in der Gruppe der Kontrolltiere. Fehlerbalken Darstellung S.E.M., * $p < 0,01$; # $p < 0,001$ vs. NaCl/H₂O; ANOVA, post-hoc LSD-Test.

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

3.4 Korrelationen der striatalen FP-CIT Bindung mit präsynaptischen Markern

In allen Gruppen zeigte sich erwartungsgemäß eine positive Korrelation der Anzahl TH⁺ Neurone in der SNc mit der Dichte der dopaminergen Fasern im Striatum korreliert (TH⁺ Fasern: $r = 0.72$, $p = 2.21 \times 10^{-21}$, $n = 126$, **Abbildung 9A**; DAT⁺ Fasern: $r = 0.92$, $p < 10^{-35}$, $n = 126$, **Abbildung 9B**). Es ergab sich ebenfalls eine positive Korrelation der Dichtewerte für TH⁺ und DAT⁺ Fasern im Striatum ($r = 0.59$, $p = 1.12 \times 10^{-13}$, $n = 128$; **Abbildung 9C**). Die striatale FP-CIT Bindung war sowohl positiv korreliert mit der Anzahl TH⁺ Neurone in der SNc ($r = 0.84$, $p = 1.26 \times 10^{-28}$, $n = 100$; **Abbildung 9D**) als auch mit der striatalen dopaminergen Faserdichte (TH⁺: $r = 0.80$, $p = 2.25 \times 10^{-24}$, $n = 102$; **Abbildung 10E**; DAT⁺: $r = 0.79$, $p = 6.74 \times 10^{-23}$, $n = 102$, **Abbildung 9F**). Eine weitere Differenzierung ergibt sich an dieser Stelle im Hinblick auf die Gruppen der behandelten Tiere mit nicht lädiertem Dopamin-System. Die Stärke der angegebenen Korrelationen wurden v.a. beeinträchtigt durch diese beiden Gruppen: (NaCl/LD, NaCl/PPX). Diese zeigten eine signifikant niedrigere striatale TH-Immunreaktivität sowie eine niedrigere striatale FP-CIT Bindung bei gleichzeitig erhöhter striataler DAT-Immunreaktivität im Vergleich zur NaCl/H₂O Kontrollgruppe trotz gleicher Anzahl TH⁺ Zellen in der SNc. Dementsprechend zeigten sich die Korrelationen bei Ausschluss dieser beiden genannten Gruppen noch deutlicher (nigrale TH⁺ Zellen vs. striatale TH⁺ Fasern: $r = 0.92$, $p = 3.75 \times 10^{-35}$, $n = 82$; nigrale TH⁺ Zellen vs. striatale DAT⁺ Fasern: $r = 0.95$, $p = 1.52 \times 10^{-41}$, $n = 82$; striatale TH⁺ Fasern vs. striatale DAT⁺ Fasern: $r = 0.97$, $p < 10^{-35}$, $n = 84$; striatales FP-CIT vs. nigrale TH⁺ Zellzahl: $r = 0.89$, $p = 1.11 \times 10^{-23}$, $n = 66$; striatales FP-CIT vs. striatale TH⁺ Fasern: $r = 0.91$, $p = 5.81 \times 10^{-28}$, $n = 68$;

striatales FP-CIT vs. striatale DAT+ Fasern: $r = 0.93$, $p = 4.92 \times 10^{-31}$, $n = 68$; **Abbildung 9A-F).**

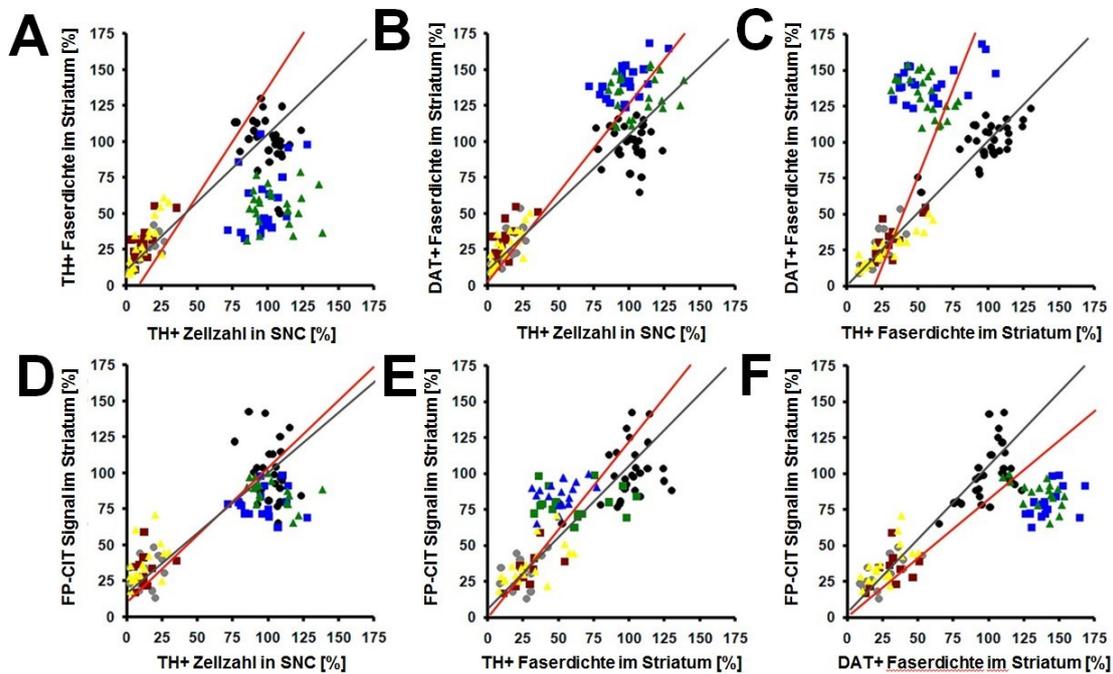


Abbildung 9: Korrelationen zwischen histologischen Markern und FP-CIT SPECT Signal

Die Punktediagramme in der oberen Zeile zeigen die Korrelationen der Zahl TH⁺ Zellen in der SNc mit der striatalen TH⁺ Faserdichte (**A**) und striatalen DAT⁺ Faserdichte (**B**), sowie die Korrelation von TH⁺ mit der DAT⁺ Faserdichten im Striatum (**C**). Die Punktediagramme in der unteren Zeile zeigen die Korrelationen des FP-CIT Signals im Striatum mit der Zahl TH⁺ Zellen in der SNc (**D**), sowie der striatalen TH⁺ Faserdichte (**E**) und DAT⁺ Faserdichte (**F**). Alle Werte sind als prozentual zum Durchschnitt der Kontrollgruppe (NaCl/H₂O) angegeben. Jeder Punkt repräsentiert ein jeweiliges kohärentes nigrostriatales System. Die verschiedenen Gruppen sind wie folgt dargestellt:

Farbkodierung der Gruppen: NaCl/H₂O: schwarze Kreise; NaCl/LD: blaue Quadrate; NaCl/PPX: grüne Dreiecke; 6-OHDA/H₂O: graue Kreise; 6-OHDA/LD: braune Quadrate; 6-OHDA/PPX: gelbe Dreiecke.

Rote Regressionslinie: Korrelation unter Einschluss aller Gruppen; Graue Regressionslinie: Korrelation bei Ausschluss der NaCl/LD und NaCl/PPX Gruppe

(Depboylu and Maurer et al., 2013)

4. Diskussion

Das vorliegende Experiment diente der Untersuchung von Effekten einer chronischen, medikamentösen Therapie mit LD oder PPX auf das nigrostriatale dopaminerge System gesunder, scheinlädierter Mäuse und Versuchstiere mit einer bilateralen 6-OHDA Läsion als Tiermodell für die Parkinson-Krankheit.

Zur in vivo Darstellung der DAT-Dichte führten wir während der Therapiephase serielle [¹²³I]FP-CIT SPECT-Messungen durch. Anschließend erfolgte eine histologische Analyse der nigralen und striatalen dopaminergen Neurone, so dass die Ergebnisse der funktionellen Bildgebung mit den histologischen Befunden verglichen werden konnten. In der Gruppe der Kontrolltiere induzierten LD und PPX sowohl Veränderungen auf histologischer Ebene als auch des gemessenen SPECT Signals. Im Gegensatz dazu hatte in der Gruppe der lädierten Tiere keines der beiden Medikamente einen messbaren Einfluss auf die FP-CIT Bindung. Auch die histologische Aufarbeitung des nigrostriatalen dopaminergen Systems erbrachte in dieser Gruppe keinen Hinweis auf das Vorliegen eines messbaren neurotoxischen oder neuroregenerativen Effektes ausgelöst durch eine Therapie mit LD oder PPX.

4.1 Bilaterale Läsion der dopaminergen nigrostriatalen Projektion

In dem von uns verwendeten Tiermodell lag eine eine subtotale bilaterale Läsionen der nigrostriatalen dopaminergen Projektion vor, die wir durch eine stereotaktische, bilaterale, nigrale 6-OHDA Injektion induzierten.

Der Verlust der dopaminergen Neurone in der SNc lag bei den lädierten Tieren bei >85%, die Verminderung der dopaminergen Fasern im Striatum bei >70% und die Abnahme des striatalen FP-CIT Signals bei >65%. Der induzierte Zelluntergang dopaminergener Neurone im Bereich der nigralen Injektionsstelle betraf vorwiegend den Bereich der SNc. Die neuronale Population im benachbarten VTA und dessen Projektion zum Acc wurde weitgehend ausgespart (**Abbildung 7, 8**). Eine schwere Schädigung dopaminergener Neurone in diesem Bereich kann zu einer hohen Mortalität in Folge einer Adipsie und Aphagie führen (Sakai and Gash, 1994; Zhou and Palmiter,

1995). Solange der Verlust dopaminerger Zellen allerdings auf die SNc beschränkt ist und die Neurone im Bereich der VTA erhalten bleiben, kann eine Beeinträchtigung der Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme weitgehend vermieden werden (Narayanan et al., 2010; Rousset et al., 2003; Zigmond and Stricker, 1973). Die seriellen FP-CIT SPECT-Untersuchungen im Verlauf des 20 Wochen dauernden Untersuchungszeitraumes zeigten in der Kontrollgruppe NaCl/H₂O einen geringen aber signifikanten, linearen Signalanstieg. Diese ungewöhnliche Beobachtung könnte Ausdruck einer funktionellen Reifung des nigrostriatalen dopaminergen Systems während der frühen Adoleszenzphase der Versuchstiere sein. In der Gruppe der Tiere mit 6-OHDA-induzierter Läsion des dopaminergen Systems, die keine medikamentöse Behandlung erhielten, zeigten die FP-CIT SPECT-Untersuchungen im Verlauf des 20 wöchigen Beobachtungszeitraumes keine signifikante Veränderung. Somit ergaben sich an dieser Stelle keine Hinweise für eine spontane Regeneration des dopaminergen Systems innerhalb des hier verwendeten subtotalen, bilateralen Läsionsmodells. In anderen Tiermodellen kommt es häufig zu spontanen Regenerationsphänomenen nach induzierter Schädigung dopaminerger Fasern. Beispiele hierfür stellen MPTP Intoxikationsmodelle (Bezard et al., 2000; Hoglinger et al., 2004; Mitsumoto et al., 1998) oder auch partielle, weniger starke 6-OHDA Läsionsmodelle (Stanic et al., 2003a) dar. Der primär nigrale und nicht striatale Ausgangspunkt der toxischen Schädigung, das starke Ausmaß des Zellverlustes in der SNc und die bilaterale Anwendung der stereotaktischen Injektion sind wahrscheinliche Gründe für das Ausbleiben spontaner Regenerationsphänomene in dem verwendeten Modell. Zur Untersuchung einer chronischen LD- und PPX-Behandlung im Hinblick auf mögliche toxische oder auch regenerative Effekte auf das nigrostriatale Dopamin-System erschien somit dieses über den gesamten Beobachtungszeitraum stabile Läsionsmodell geeignet.

4.2 Einfluss von Levodopa und Pramipexol auf nigrale dopaminerge Neurone

Die Zahl dopaminerger Zellen in der SNc war in allen Tieren unverändert. Die medikamentöse Therapie mit LD oder PPX hatte hierauf keinen Einfluss, weder in den Kontrolltieren noch in den Tieren bei denen eine Läsion des Dopamin-Systems induziert worden war. Im Gegensatz hierzu wurde in einer anderen Arbeit eine Zunahme der

dopaminergen Neuronenzahl infolge einer Dopaminagonisten-Therapie beschrieben (Van Kampen and Eckman, 2006). Eine Erklärung für diesen Unterschied könnte in der Verwendung unterschiedlicher Läsionsmodelle liegen. In der oben genannten Arbeit wurde ein subakutes intrastriatales 6-OHDA Läsionsmodell verwendet im Vergleich zu dem hier angewandten subtotalen intranigralen Läsionsmodell. Ausgehend von den beiden unterschiedlichen Ausgangspunkten und dem stärkeren Ausmaß der Schädigung könnten die beobachteten Unterschiede begründet liegen im Vorhandensein einer einerseits irreversiblen direkten Schädigung dopaminergere Neurone gegenüber einer reversiblen retrograden Schädigung beim subakuten intrastriatalen Läsionsmodell. Eine partielle retrograde Läsion könnte an dieser Stelle zu einem Verlust der Expression phänotypischer Zellmarker führen, der im Verlauf reversibel ist und durch eine dopaminerge Therapie modulierbar sein könnte.

4.3 Einfluss von LD und PPX auf striatale dopaminerge Fasern

Die Therapie mit LD und PPX führte bei der Behandlung von Tieren mit einem intakt, scheinladierten Dopamin-System auf histologischer Ebene zu einer Abnahme der TH-Immunreaktivität im Striatum und gleichzeitig zu einer Zunahme der striatalen DAT-Immunreaktivität. Für LD gibt es experimentelle Belege für eine medikamentös induzierte Reduktion der striatalen TH⁺ Faserdichte bei Tieren, deren nigrostriatales Dopamin-System nicht experimentell geschädigt wurde (Fang et al., 2011). Die Reduktion der striatalen TH-Immunreaktivität bei intakter dopaminergere Innervation könnte eine physiologische Anpassungsreaktion darstellen, im Sinne einer verminderten endogenen Dopamin-Synthese bei exogener Dopamin-Zufuhr. Eine derartige Reaktion könnte ausgelöst sein, durch eine präsynaptische D₂-Autorezeptor-vermittelte Inhibition der Tyrosinhydroxylase (Wolf and Roth, 1990). Eine Stimulation präsynaptischer D₂-Rezeptoren könnte darüber hinaus ebenfalls Ursache für die beobachtete Zunahme der striatalen DAT-Immunreaktivität sein. Es gibt experimentelle Belege für eine D₂-Rezeptor vermittelte Steigerung der DAT-Plasmamembranexpression. Dieses Phänomen wurde häufig als eine mögliche Kompensationsreaktion zur Reduktion der synaptischen Dopamin-Spiegel gewertet (Meiergerd et al., 1993; Pan et al., 2005; Schmitt and Reith, 2010). Durch eine

gesteigerte präsynaptische Wiederaufnahme über den DAT könnte somit eine dopaminerge Überstimulation kompensiert werden.

In der Gruppe der Tiere, die einer 6-OHDA Injektion unterzogen worden waren, zeigten weder die Behandlung mit LD noch mit PPX Effekte im Hinblick auf die striatale TH⁺ und DAT⁺ Faserdichte. Als mögliche Ursachen für das Fehlen messbarer Veränderungen der dopaminergen Faserdichte im Striatum dieser Tiere erscheinen mehrere Möglichkeiten plausibel. Aufgrund der subtotalen Reduktion der dopaminergen Neurone in der SNc könnte ein soweit fortgeschrittenes Defizit induziert worden sein, dass keine ausreichende kompensatorische Kapazität der verbleibenden striatalen Nervenfasern vorhanden ist. Aufgrund des ausgeprägten Verlustes striataler Nervenendigungen ist auch von einer entsprechend verminderten präsynaptischen Dopamin-2-Rezeptor Dichte auszugehen, so dass vermeintliche Inhibitionsprozesse über diesen Signalweg nicht induziert werden könnten (Chen et al., 1991). Darüber hinaus besteht bei diesen Tieren, die eine ausgeprägt Schädigung ihres Dopamin-Systems aufweisen, die Möglichkeit, dass das Dopamin-Defizit durch die vorgenommene Therapie lediglich kompensiert wurde. Eine dopaminerge Überstimulation, wie sie bei der chronischen Applikation von LD oder PPX in der Kontrollgruppe anzunehmen ist, lag möglicherweise bei diesen lädierten Tieren nicht vor und konnte somit auch keinerlei Kompensationsmechanismen auslösen.

Zusammenfassend ergeben sich aus den erhobenen Daten mehrere Schlussfolgerungen. Eine Langzeittherapie mit LD und PPX ist in der Lage, Adaptationsphänomene im Sinne histologischer Veränderungen der striatalen dopaminergen Projektion auszulösen. Diese Veränderungen lassen sich in unserem Experiment ausschließlich bei einem intakten Dopamin-System nachweisen, nicht jedoch bei vorbestehender ausgeprägter Schädigung des Dopamin-Systems. Die Art und Ausprägung der induzierten Veränderungen unterscheiden sich zwischen LD und PPX nicht signifikant.

4.4 Einfluss von LD und PPX auf die striatale [¹²³I]FP-CIT Bindung

Die Untersuchung des gemessenen striatalen FP-CIT SPECT Signals im Vergleich zu den gemessenen histologischen Parametern, Anzahl dopaminergener Neurone in der SNc

sowie striatale Dichte dopaminerger Fasern, erbrachte in Analogie zu zuvor innerhalb unserer Arbeitsgruppe erhobenen Daten (Alvarez-Fischer et al., 2007) das Bild einer stabilen Korrelation für diejenigen Tiere, die keine medikamentöse Therapie mit LD oder PPX erhalten hatten. Vor diesem Hintergrund erscheint der verwendete Pinhole SPECT Ansatz zur in vivo Verlaufsbeurteilung sowohl eines intakten Dopamin-System als auch zur Beurteilung des Ausmaßes einer 6-OHDA induzierten Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Projektion in Mäusen grundsätzlich geeignet.

Im Hinblick auf diejenigen Tiere die einer medikamentösen Therapie unterzogen wurden, ergab sich jedoch ein differenziertes Bild im Hinblick auf die Korrelation zwischen histologischen Markern und gemessenem SPECT Signal. In der Gruppe der lädierten Tiere, die eine dopaminerge Substitutionstherapie erhalten hatten, wurden die genannten Korrelationen ebenfalls beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte sich jedoch in der Gruppe der scheinlädierten Tiere unter chronischer Gabe von LD oder PPX eine signifikante Reduktion der striatalen FP-CIT Bindung bei gleichzeitiger Zunahme der striatalen DAT-Immunreaktivität. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz könnte in der Beschaffenheit der verwendeten DAT-Antikörper bestehen. In diesem Experiment wurde der monoklonale DAT-Antikörper MAB369 von Chemicon International verwendet, der an der Aminosäuresequenz 1-66 im Bereich des N-Terminus bindet. Es ist grundsätzlich möglich, dass der DAT-Antikörper eine größere Subpopulation des DAT-Proteinspektrums markiert als der verwendete FP-CIT Tracer. Es ist bekannt, dass die Proteinstruktur des DAT verschiedenen posttranslationalen Veränderungen unterworfen ist. So führt die Glykosylierung des Proteins im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife N181 zu einer funktionellen Aktivierung des DAT. Dem gegenüber stehen Prozesse, die zu einer Deaktivierung des Transporter Proteins führen, wie die Ubiquitinylierung N-terminaler Lysine (Lys19, Lys27, Lys35) und Phosphorylierungen an verschiedenen Stellen im Bereich des N-Terminus, der intrazellulären Schleife und des C-Terminus (Granás et al., 2003). Ausgehend von diesen Befunden erscheint es wahrscheinlich, dass der verwendete Antikörper sowohl inaktive, nicht-glykosylierte als auch verschiedene aktive, phosphorylierte DAT-Proteine markiert. Wohingegen das Bindungspotential des Radioliganden [¹²³I]FP-CIT möglicherweise in erster Linie den Anteil vollständig maturierten DAT-Proteins in funktionell aktivem Zustand abbildet (Eriksen et al., 2010).

Ein zusätzlicher Faktor könnte in einer verminderten Transportfunktion des DAT-Proteins im Kontext eines chronisch, gesteigerten dopaminergen Tonus zu sehen sein. In experimentellen Untersuchungen konnte belegt werden, dass eine chronische Anwendung von DAT-Liganden zu einer Abnahme der Transportgeschwindigkeit (V_{\max}) führen kann (Kokoshka et al., 1998). Darüber hinaus gibt es Belege für eine gesteigerte, Dopamin-Rezeptor-vermittelte Internalisierung und Sequestrierung von funktionell aktivem, Plasmamembran-gebundenem DAT-Protein (Saunders et al., 2000), der somit in einer refraktären, möglicherweise nicht-FP-CIT-bindenden Konformation vorliegt (Schmitt and Reith, 2010). Beide Phänomene würden zu einer Reduktion des FP-CIT SPECT-Signals führen und könnten somit eine Erklärung für die beobachteten Veränderungen in der Gruppe der scheinladierten und medikamentös behandelten Tiere darstellen. Der Verlust an funktionell aktivem DAT-Protein wird möglicherweise durch eine gesteigerte De-Novo-Synthese? kompensiert, die sich wiederum in einer gesteigerten DAT-Immunreaktivität äußern würde. Da die genannten Veränderungen in dieser Gruppe sowohl bei der Gabe von PPX als auch LD beobachtet wurden, könnte ein Dopamin-Rezeptor-vermittelter Prozess den zugrundeliegenden Hauptmechanismus der beobachteten Divergenz zwischen FP-CIT Signalreduktion und gesteigerter striataler DAT-Immunreaktivität darstellen.

Die Ursache dafür, dass FP-CIT SPECT-Signal und striatale DAT-Immunreaktivität in den Versuchsgruppen mit 6-OHDA-Läsion im Verlauf konstant blieb und durch eine Dopamin-Therapie nicht beeinflusst wurde, liegt möglicherweise zum einen an dem großen Verlust striataler dopaminerges Fasern und der damit verminderten Dopamin-Rezeptor Dichte. Zum anderen kam es möglicherweise aufgrund der schweren Läsion des Dopamin-Systems durch die Therapie nicht zu einer dopaminergen Überstimulation, die zu entsprechenden adaptiven Veränderungen und posttranslationalen Modifikationen geführt hätte.

5. Ausblick

5.1 Übertragbarkeit auf die humane Anwendung des FP-CIT SPECT

Eine wesentliche Herausforderung im Hinblick auf die Interpretation von [¹²³I]FP-CIT Messungen in klinischen Studien besteht in der Frage, ob eine medikamentöse Therapie mit dopaminerg wirksamen Substanzen für sich genommen einen Einfluss auf die Radiotracer Bindung hat bzw. haben kann. Die in dieser Studie beobachtete Abnahme sowohl der [¹²³I]FP-CIT Bindung als auch der TH-Immunreaktivität in den Gruppe der scheinladierten Versuchstiere, die PPX oder LD erhalten hatten, deutet auf diese Möglichkeit hin. Allerdings bleibt zu bedenken, dass die genannten Veränderungen ausschließlich bei Versuchstieren mit einem intakten Dopamin-System beobachtet wurden, jedoch nicht bei denjenigen Tieren, deren dopaminerge Projektion mit 6-OHDA Injektion geschädigt wurde, so dass dieses Phänomen insbesondere im Hinblick auf die klassische Anwendung der [¹²³I]FP-CIT SPECT bei Patienten mit einer klinisch manifesten Parkinson-Krankheit im Krankheitsverlauf zunehmend in den Hintergrund treten könnte. Dennoch ergeben sich aus den genannten Beobachtungen einige interessante Analogien zu den Ergebnissen vorangegangener klinischer Studien. In der CALM-PD Studie wurde die gesamte Kohorte mit 65 eingeschlossenen? Patienten vor Beginn der Therapie und im Verlauf nach 22, 34, und 46 Monaten jeweils einer [¹²³I]FP-CIT SPECT-Untersuchungen unterzogen. Darüber hinaus wurde bei einer Untergruppe von 13 Patienten bereits zehn Wochen nach Erreichen der vollen Therapiedosis eine zusätzliche [¹²³I]FP-CIT SPECT-Untersuchung durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich bereits eine 4,6 bzw. 5,4%ige Signalreduktion im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung (ParkinsonStudyGroup, 2002). Ausgehend von der Überlegung, dass es in diesem kurzen Zeitraum nicht zu einer entsprechenden Progression des neurodegenerativen Prozesses gekommen sein konnte, lässt sich dieser Befund ebenfalls als indirekter Hinweis auf eine primäre Medikamenten-induzierte Veränderung des SPECT Signals interpretieren. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte eine klinische Untersuchung aus dem Jahr 2001 zur Anwendung von LD oder PPX über einen Zeitraum von sechs Wochen unter Verwendungen eines alternativen Bildgebungsverfahrens zur DAT-Darstellung. Hier zeigte sich eine 16 - 22 bzw. 15%ige Reduktion der DAT-Bindung gemessen durch eine PET-Untersuchung, die den

spezifischen DAT-Liganden [^{11}C]RTI-32 als Radiotracer verwendete (Guttman et al., 2001). Ein wesentlicher Schwachpunkt des hier dargestellten Experimentes besteht möglicherweise in der stark ausgeprägten Schädigung des Dopamin-Systems der Tiere, die eine 6-OHDA Injektion erhalten hatten. Es ist anzunehmen, dass die Beeinträchtigung der nigrostriatalen Projektion bei den Patienten, die in den genannten klinischen Studien untersucht wurden, weniger ausgeprägt war, als in dem von uns gewählten subtotalen Läsionsmodell. Vor diesem Hintergrund erscheint es im Hinblick auf eventuelle, zukünftige Experimente sinnvoll auch die Verwendung eines moderateren Läsionsmodells mit einzubeziehen (Sauer and Oertel, 1994), um mögliche adaptive Prozesse oder auch regenerative Veränderungen in Folge einer Dopamin-Therapie untersuchen zu können (Datla et al., 2001; Kemmerer et al., 2003; Murer et al., 1998).

Es ist bekannt, dass ein gewisser Anteil der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra im Laufe des Lebens degeneriert (Rudow et al., 2008). Ein Prozess der auch bei gesunden, nicht an der Parkinson-Krankheit leidenden, Probanden auftritt. Ein wesentliches pathophysiologisches Merkmal beim idiopathischen Parkinson-Syndrom ist die Beschleunigung dieses degenerativen Prozesses (Fearnley and Lees, 1991; Mann and Yates, 1983; Tompkins et al., 1997). In der ELLDOPA (Early versus Later L-Dopa Therapy in PD) Studie beobachtete man eine signifikant stärkere Abnahme der DAT-Bindung gemessen mittels [^{123}I]β-CIT SPECT, bei den mit LD therapierten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Fahn et al., 2004). Dieses Ergebnis wurde kontrovers diskutiert und mitunter als Abnahme der Radioligand-bindenden DAT-Population gewertet oder auch als Ausdruck einer toxischen Wirkung von LD auf die verbleibenden dopaminergen Neurone verstanden. Zu letzterer Interpretation passt nicht, dass verschiedene andere klinische Studien keinerlei Hinweise auf eine neurotoxische Wirkung durch eine chronische LD-Therapie fanden (Eisensehr et al., 2001; Schillaci et al., 2005). Darüber hinaus erbrachten weder die durchgeführten Autopsie-Studien von therapierten, nicht an der Parkinson-Krankheit leidenden Personen noch post mortem Untersuchungen von Parkinson-Patienten mit unterschiedlich langer Therapie- bzw. Nachweis für einen erhöhten Zellverlust in der Substantia nigra oder eine Beschleunigung des pathologischen Prozesses (Hagenah et al., 1999; Parkkinen et al., 2011; Rajput, 2001).

Zieht man ausgehend von diesen Befunden die Möglichkeit einer medikamentös-induzierten Abnahme der DAT-Radioliganden-Bindung bei Patienten mit einem intakten oder nur moderat geschädigten Dopamin-System in Betracht, ergeben sich mehrere Aspekte in Bezug auf die Anwendung der [¹²³I]FP-CIT SPECT-Untersuchung. Bei der Untersuchung von Parkinson-Patienten im Frühstadium der Erkrankung könnte eine entsprechende Adaptation der jeweiligen Referenzwerte in Abhängigkeit der bestehenden Medikation zu einer präziseren diagnostischen Abgrenzung genutzt werden. Insbesondere erscheint Vorsicht geboten bei der Benutzung der [¹²³I]FP-CIT SPECT zur Untersuchung von nicht-Parkinson-Patienten, die eine Dopamin-Therapie erhalten, z.B. Patienten mit Restless-legs-Syndrom oder Patienten mit unsicherer und möglicherweise falscher Diagnose eines idiopathischen Parkinson-Syndroms. Bei diesen Patienten könnte eine medikamentös-induzierte Reduktion des FP-CIT SPECT-Signals zu einer (falsch-positiven) Interpretation des Befundes als Hinweis auf Vorliegen einer Parkinson-Krankheit führen. Des Weiteren ergeben sich Einschränkungen bei der Verwendung der FP-CIT Bildgebung als Surrogat-Parameter zur Untersuchung neuroprotektiver Effekte. Aufgrund der vorliegenden Hinweise auf die grundsätzliche Möglichkeit einer Signalveränderung der DAT-Bildgebung durch die Anwendung einer dopaminergen Therapie, erscheint eine Abgrenzung zu tatsächlich den Krankheitsverlauf modifizierenden Effekten ausschließlich basierend auf den Ergebnissen einer [¹²³I]FP-CIT SPECT Messung nicht möglich. Hier könnte alternativ eine genaue Untersuchung der Validität der [¹⁸F]Fluorodopa-PET angezeigt sein.

5.2 Schlussfolgerung

In der hier vorgenommenen tierexperimentellen Untersuchung konnten wir erstmalig zeigen, dass eine funktionelle DAT-Bildgebung mittels einer [¹²³I]FP-CIT-Pinhole-SPECT Untersuchung ein geeignetes Verfahren darstellt, um über einen Zeitraum von bis zu sechs Monaten eine in vivo Verlaufsbeurteilung der nigrostriatalen Projektion von Mäusen vorzunehmen, deren Dopamin-System durch eine 6-OHDA Injektion geschädigt wurde. Insgesamt ergaben sich bei dieser Gruppe von Versuchstieren keine Belege für eine signifikante Beeinflussung präsynaptischer Marker durch die chronische Therapie mit LD oder PPX. Die dargelegten Ergebnisse sprechen somit nicht für eine

Induktion, weder von toxischen noch von regenerativen Veränderungen in Folge einer Substitutionstherapie bei einem stark vorgeschädigten Dopamin-System. Im Gegensatz dazu beobachteten wir verschiedene Adaptationsphänomene durch die dopaminerge Therapie bei Versuchstieren mit einer intakten nigrostriatalen Projektion. Auftreten und Ausmaß der Veränderungen zeigten sich allerdings unabhängig davon, ob LD oder PPX gegeben wurde, so dass sich hieraus keine Erklärung für die geringere Abnahme des FP-CIT SPECT-Signals bei Parkinson-Patienten, die mit PPX behandelt wurden im Vergleich zur Therapie mit LD, wie es in der CALM-PD Studie beobachtet wurde, ergab (ParkinsonStudyGroup, 2002). Vor diesem Hintergrund kommt ein neuroprotektiver Effekt von PPX gegenüber dem degenerativen Prozess, wie er in anderen experimentellen Untersuchungen belegt worden ist (Izumi et al., 2007; Joyce et al., 2004; Li et al., 2010; Zou et al., 1999) als mögliche Erklärung für diesen Umstand weiterhin in Frage. Eine weitreichendere Interpretation der hier erhobenen Daten ist aufgrund der Diskrepanz zwischen tierexperimentellem Ansatz und klinischer Studie, insbesondere im Hinblick auf die unterschiedliche Genese und den divergenten Verlauf der Schädigung des Dopamin-System, schwierig. Das Vorhandensein einer klinisch relevanten Neuroprotektion durch eine Therapie mit PPX erscheint jedoch im Kontext der mittlerweile veröffentlichten Daten der PROUD Studie zunehmend unwahrscheinlich (Schapira et al., 2013). In der genannten Untersuchung zeigten sich in einem „delayed-onset“ Design weder im Hinblick auf die klinische Ausprägung, noch auf die striatale [¹²³I]FP-CIT Bindung nach 15 Monaten signifikante Unterschiede zwischen Patienten, die unmittelbar nach Studieneinschluss mit PPX behandelt wurden und denjenigen Patienten, die erst nach 6 - 9 Monaten Placebo-Therapie auf PPX eingestellt wurden. Im Hinblick auf die Frage, in wie fern eine dopaminerge Therapie einen modulatorischen Effekt auf die striatale [¹²³I]FP-CIT Bindung hat, könnte in zukünftigen „delayed-onset“ Studien insbesondere die Verwendung von Verfahren zur funktionellen Bildgebung zum Zeitpunkt des Wechsel von Placebo- zu Verumgruppe einen weiteren Erkenntniszuwachs erbringen.

6. Publikation

Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen wurden 2013 in der Fachzeitschrift *Neuroimage* veröffentlicht (Depboylu and Maurer et al., 2013).

6.1 Zusammenfassung

Die zuvor durchgeführte klinische Studie CALM-PD (ParkinsonStudyGroup, 2002) untersuchte den Effekt einer Langzeittherapie mit Levodopa oder Pramipexol auf das Fortschreiten der Parkinson-Krankheit mittels SPECT unter Verwendung des Dopamintransporter-Liganden [¹²³I]β-CIT als Surrogat-Marker. Die [¹²³I]β-CIT Bindung fiel in den Patienten, die Levodopa erhalten hatten, auf ein signifikant niedrigeres Niveau ab, als bei den Patienten, die Pramipexol erhalten hatten. Allerdings wurde dieses Ergebnis unterschiedlich interpretiert, zum einen als Ausdruck Levodopa-induzierter Neurotoxizität, zum anderen als Pramipexol-induzierte Neuroprotektion / -regeneration oder auch als lediglich medikamentös-induzierte Veränderung der Dopamintransporter-Verfügbarkeit.

Um diese Fragestellung experimentell zu untersuchen, induzierten wir in Mäusen eine subtotale, bilaterale Läsion der Substantia nigra durch Injektion des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin. Vier Wochen danach wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 20 Wochen oral mit Levodopa (100mg/kg/Tag), Pramipexol (3mg/kg/Tag) oder lediglich Wasser (Placebo) behandelt. Die Integrität der nigrostriatalen Projektion wurde in vivo wiederholt mittels [¹²³I]FP-CIT SPECT gemessen, sowie nach Tötung der Tiere durch immunhistologische Untersuchung des Dopamintransporter und der Dopaminsynthetisierenden Tyrosinehydroxylase. In scheinläderten Tieren zeigte sich, dass Levodopa ebenso wie Pramipexol sowohl die striatale FP-CIT Bindung (LD: -21%; PPX: -14%), als auch die TH-Immunreaktivität (LD: -42%, PPX: -45%) signifikant senkten. Gleichzeitig wurde die DAT-Immunreaktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Dopamin-Therapie signifikant erhöht (LD: +42%; PPX +33%). In operierten Tieren mit 6-OHDA-Läsion hingegen hatten weder Levodopa noch

Pramipexol einen signifikanten Einfluss auf das stabil reduzierte Niveau der FP-CIT SPECT-Bindung (LD: -66%; PPX: -66%; Placebo: -66%), die striatale TH-Immunreaktivität (LD: -70%, PPX: -72%; Placebo: -77%), die striatale DAT-Immunreaktivität (LD: -70%, PPX: -75%; Placebo: -75%) oder die Anzahl TH-positiver Zellen in der Substantia nigra (LD: -88%, PPX: -88%; Placebo: -86%) im Vergleich zu den Tieren ohne Dopamin-Therapie. Zusammenfassend zeigte sich, dass eine chronische dopaminerge Stimulation mit Levodopa oder Pramipexol ähnliche präsynaptische Anpassungsphänomene in gesunden Mäusen verursacht, allerdings keine erkennbaren Veränderungen in Mäusen mit ausgeprägter Läsion der nigrostriatalen dopaminergen Projektion. Die hier erzielten Ergebnisse ermöglichen eine verlässlichere Interpretation klinischer Studien, die Verfahren zur Dopamintransporter-Bildgebung als Surrogat-Parameter verwenden.

Schlagwörter:

Dopamin, Dopamin Agonist, Neurodegeneration, Neuroregeneration, Neuro-Bildgebung, Parkinson-Krankheit

6.2 Abstract

A previous clinical trial studied the effect of long-term treatment with levodopa (LD) or the dopamine agonist pramipexole (PPX) on disease progression in Parkinson disease using SPECT with the dopamine transporter (DAT)-radioligand [^{123}I] β -CIT as surrogate marker. [^{123}I] β -CIT binding declined to significantly lower levels in patients receiving LD compared to PPX. However, the interpretation of this difference as LD-induced neurotoxicity, PPX-induced neuroprotection/-regeneration, or only drug-induced regulatory changes of DAT-availability remained controversial. To address this question experimentally, we induced a subtotal lesion of the substantia nigra in mice by bilateral injection of the neurotoxin 6-hydroxydopamine. After 4 weeks, mice were treated for 20 weeks orally with LD (100 mg/kg/day) or PPX (3 mg/kg/day), or water (vehicle) only. The integrity of nigrostriatal projections was assessed by repeated [^{123}I]FP-CIT SPECT in vivo and by immunostaining for DAT and the dopamine-synthesizing enzyme tyrosine hydroxylase (TH) after sacrifice. In sham-lesioned mice, we found that both

LD and PPX treatment significantly decreased the striatal FP-CIT binding (LD: -21%; PPX: -14%) and TH-immunoreactivity (LD: -42%; PPX: -45%), but increased DAT-immunoreactivity (LD: +42%; PPX: +33%) compared to controls without dopaminergic treatment. In 6-hydroxydopamine-lesioned mice, however, neither LD nor PPX significantly influenced the stably reduced FP-CIT SPECT signal (LD: -66%; PPX: 66%; controls -66%), TH-immunoreactivity (LD: -70%; PPX: -72%; controls: -77%) and DAT-immunoreactivity (LD: -70%; PPX: -75%; controls: -75%) in the striatum or the number of TH-positive cells in the substantia nigra (LD: -88%; PPX: -88%; controls: -86%), compared to lesioned mice without dopaminergic treatment. In conclusion, chronic dopaminergic stimulation with LD or PPX induced similar adaptive presynaptic changes in healthy mice, but no discernible changes in severely lesioned mice. These findings allow to more reliably interpret the results from clinical trials using neuroimaging of DAT as surrogate parameter.

Keywords:

dopamine, dopamine agonist, neurodegeneration, neuroregeneration, neuroimaging, Parkinson disease

7. Danksagung

Ich möchte insbesondere Herrn Prof. Dr. Höglinger, Herrn PD Dr. Depboylu und Herrn Prof. Dr. Oertel für die Aufnahme als Doktorand in die Klinik für Neurologie sowie die engagierte Betreuung während der Durchführung meiner Dissertationsarbeit danken.

Darüber hinaus gilt mein herzlicher Dank den Mitarbeitern der AG Experimentelle Neurologie am UKGM, Standort Marburg Guido Hermanns, Sabine Anfimov, und Silke Caspari sowie Herrn Dr. Matusch und Herrn Dr. Borta für das große Engagement und die enge Zusammenarbeit, die die Durchführung und Fertigstellung dieses Projektes erst möglich gemacht haben.

Ebenso möchte ich mich bei den Kollegen der Klinik für Nuklearmedizin ganz besonders Herrn Dr. Behé und Herrn PD Dr. Höffken für die tatkräftige Unterstützung bedanken.

Nicht zuletzt gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, ganz besonders meiner Mutter Marlene, meiner Freundin Anika und meinem Sohn Raphael, die mir stets unterstützend und verständnisvoll zur Seite standen.

8. Verzeichnis akademischer Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren Prof. Dr. med. Günter U. Höglinger (gegenwärtige Adresse: Neurologische Klinik und Poliklinik, Technische Universität München), PD. Dr. med. Candan Depboylu (gegenwärtige Adresse: Abteilung für Neurologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Marburg) und Dr. rer. nat. Andreas Borta (gegenwärtige Adresse: Clinical R&D CNS, Merz Pharmaceuticals GmbH, Frankfurt, Main).

9. Abkürzungsverzeichnis

[¹²³ I]FP-CIT	[N-(3-fluoropropyl)-2β-carbomethoxy-3β-(4-[¹²³ I]iodophenyl)nortropane]
[¹²³ I]β-CIT	[2β-carboxymethoxy-3β-(4-[¹²³ I]iodophenyl)tropane]
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
Acc	Nucleus Accumbens
<i>BP_{ND}</i>	Durchschnittliches parametrisches Bindungspotential
CALM-PD	Comparison Of The Agonist Pramipexole With Levodopa On Motor Complications Of PD
CPu	Caudatus-Putamen-Komplex (entspr. Striatum)
DAT	Dopamintransporter
LD	Levodopa
MFB	Medial forebrain bundle – mediales Vorderhirnbündel
NHS	Normal Horse Serum - Standard Pferde Serum
PB	Phosphat Buffer - Phosphat Puffer
PET	Positronen-Emissionstomographie
PPX	Pramipexol
ROI	Region of Interest
SNe	Substantia nigra pars compacta
SPECT	Single Photon Emission Tomographie

STN	Substantia nigra
Str	Striatum
TH	Tyrosinhydroxylase
VOI	Volume of Interest

10. Literaturverzeichnis

- Abi-Dargham, A., Gandelman, M.S., DeErausquin, G.A., Zea-Ponce, Y., Zoghbi, S.S., Baldwin, R.M., Laruelle, M., Charney, D.S., Hoffer, P.B., Neumeyer, J.L., Innis, R.B., 1996. SPECT imaging of dopamine transporters in human brain with iodine-123-fluoroalkyl analogs of beta-CIT. *J Nucl Med* 37, 1129-1133.
- Ahlskog, J.E., 2003. Slowing Parkinson's disease progression: recent dopamine agonist trials. *Neurology* 60, 381-389.
- Ahlskog, J.E., Uitti, R.J., O'Connor, M.K., Maraganore, D.M., Matsumoto, J.Y., Stark, K.F., Turk, M.F., Burnett, O.L., 1999. The effect of dopamine agonist therapy on dopamine transporter imaging in Parkinson's disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society* 14, 940-946.
- Alvarez-Fischer, D., Blessmann, G., Trosowski, C., Behe, M., Schurrat, T., Hartmann, A., Behr, T.M., Oertel, W.H., Hoglinger, G.U., Hoffken, H., 2007. Quantitative [(123)I]FP-CIT pinhole SPECT imaging predicts striatal dopamine levels, but not number of nigral neurons in different mouse models of Parkinson's disease. *Neuroimage* 38, 5-12.
- Alvarez-Fischer, D., Henze, C., Strenzke, C., Westrich, J., Ferger, B., Hoglinger, G.U., Oertel, W.H., Hartmann, A., 2008. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol* 210, 182-193.
- Antonini, A., Barone, P., Ceravolo, R., Fabbrini, G., Tinazzi, M., Abbruzzese, G., 2010. Role of pramipexole in the management of Parkinson's disease. *CNS Drugs* 24, 829-841.
- Barone, P., Poewe, W., Albrecht, S., Debieuvre, C., Massey, D., Rascol, O., Tolosa, E., Weintraub, D., 2010. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 9, 573-580.
- Beekman, F., Have, F.V.D., 2007. Editorial The pinhole : gateway to ultra-high-resolution three-dimensional radionuclide imaging. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 34.
- Benamer, H.T., Patterson, J., Wyper, D.J., Hadley, D.M., Macphee, G.J., Grosset, D.G., 2000. Correlation of Parkinson's disease severity and duration with 123I-FP-CIT SPECT striatal uptake. *Mov Disord* 15, 692-698.
- Bernheimer, H., Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., Jellinger, K., Seitelberger, F., 1973. Brain dopamine and the syndromes of Parkinson and Huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. *J Neurol Sci* 20, 415-455.
- Bezard, E., Dovero, S., Imbert, C., Boraud, T., Gross, C.E., 2000. Spontaneous long-term compensatory dopaminergic sprouting in MPTP-treated mice. *Synapse* 38, 363-368.
- Birkmayer, W., Hornykiewicz, O., 1962. [The L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) effect in Parkinson's syndrome in man: On the pathogenesis and treatment of Parkinson akinesia]. *Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr* 203, 560-574.
- Blum, D., Torch, S., Lambeng, N., Nissou, M., Benabid, A.L., Sadoul, R., Verna, J.M., 2001. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and

- MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 65, 135-172.
- Booij, J., Habraken, J.B.A., Bergmans, P., Tissingh, G., Winogrodzka, A., Wolters, E.C., Janssen, A.G.M., Stoof, J.C., Royen, E.A.V., 1998. Imaging of Dopamine Transporters with Iodine-123- FP-CIT SPECT in Healthy Controls and Patients with Parkinson 's Disease. *Journal of Nuclear Medicine*.
- Booij, J., Kemp, P., 2008. Dopamine transporter imaging with [(123)I]FP-CIT SPECT: potential effects of drugs. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 35, 424-438.
- Booij, J., Tissingh, G., Boer, G.J., Speelman, J.D., Stoof, J.C., Janssen, A.G., Wolters, E.C., van Royen, E.A., 1997. [123I]FP-CIT SPECT shows a pronounced decline of striatal dopamine transporter labelling in early and advanced Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 62, 133-140.
- Bove, J., Prou, D., Perier, C., Przedborski, S., 2005. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2, 484-494.
- Bruchelt, G., Schraufstatter, I.U., Niethammer, D., Cochrane, C.G., 1991. Ascorbic acid enhances the effects of 6-hydroxydopamine and H₂O₂ on iron-dependent DNA strand breaks and related processes in the neuroblastoma cell line SK-N-SH. *Cancer Res* 51, 6066-6072.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., 1957. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-hydroxytryptophan as reserpine antagonists. *Nature* 180, 1200.
- Carter, A.J., Muller, R.E., 1991. Pramipexole, a dopamine D₂ autoreceptor agonist, decreases the extracellular concentration of dopamine in vivo. *Eur J Pharmacol* 200, 65-72.
- Carvey, P.M., McGuire, S.O., Ling, Z.D., 2001. Neuroprotective effects of D₃ dopamine receptor agonists. *Parkinsonism Relat Disord* 7, 213-223.
- Cenci, M.A., Whishaw, I.Q., Schallert, T., 2002. Animal models of neurological deficits: how relevant is the rat? *Nat Rev Neurosci* 3, 574-579.
- Chen, J.F., Qin, Z.H., Szele, F., Bai, G., Weiss, B., 1991. Neuronal localization and modulation of the D₂ dopamine receptor mRNA in brain of normal mice and mice lesioned with 6-hydroxydopamine. *Neuropharmacology* 30, 927-941.
- Darcourt, J., Booij, J., Tatsch, K., Varrone, A., Vander Borght, T., Kapucu, O.L., Nagren, K., Nobili, F., Walker, Z., Van Laere, K., 2010. EANM procedure guidelines for brain neurotransmission SPECT using (123)I-labelled dopamine transporter ligands, version 2. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 37, 443-450.
- Datla, K.P., Blunt, S.B., Dexter, D.T., 2001. Chronic L-DOPA administration is not toxic to the remaining dopaminergic nigrostriatal neurons, but instead may promote their functional recovery, in rats with partial 6-OHDA or FeCl(3) nigrostriatal lesions. *Mov Disord* 16, 424-434.
- de Lau, L.M.L., Breteler, M.M.B., 2006. Epidemiology of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology* 5, 525-535.
- Depboylu, C., Maurer, L., Matusch, A., Hermanns, G., Windolph, A., Béhé, M., Oertel, W.H., Höglinger, G.U., 2013. Effect of long-term treatment with pramipexole or levodopa on presynaptic markers assessed by longitudinal [123I]FP-CIT SPECT and histochemistry. *Neuroimage* 79, 191-200.

- Deumens, R., Blokland, A., Prickaerts, J., 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol* 175, 303-317.
- Djang, D.S., Janssen, M.J., Bohnen, N., Booij, J., Henderson, T.A., Herholz, K., Minoshima, S., Rowe, C.C., Sabri, O., Seibyl, J., Van Berckel, B.N., Wanner, M., 2012. SNM practice guideline for dopamine transporter imaging with 123I-ioflupane SPECT 1.0. *J Nucl Med* 53, 154-163.
- Eggert K; Oertel W, R.H., Arnold G, Baas H, Berg D, Deuschl G, Dodel R, Gasser T, Gerlach M, Höglinger G, Jost W, Mehdorn M, Müngersdorf M, Poewe W, Reuther P, Riederer P, Schulz J, Spieker S, Storch A , Tatsch K, Trenkwalder C, Waldvogel D, 2012. Leitlinien: Parkinson-Syndrome – Diagnostik und Therapie.
- Ehringer, H., Hornykiewicz, O., 1960. [Distribution of noradrenaline and dopamine (3-hydroxytyramine) in the human brain and their behavior in diseases of the extrapyramidal system]. *Klin Wochenschr* 38, 1236-1239.
- Eisensehr, I., Wetter, T.C., Linke, R., Noachtar, S., von Lindener, H., Gildehaus, F.J., Trenkwalder, C., Tatsch, K., 2001. Normal IPT and IBZM SPECT in drug-naive and levodopa-treated idiopathic restless legs syndrome. *Neurology* 57, 1307-1309.
- Eriksen, J., Jorgensen, T.N., Gether, U., 2010. Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges. *J Neurochem* 113, 27-41.
- Fahn, S., Oakes, D., Shoulson, I., Kieburtz, K., Rudolph, A., Lang, A., Olanow, C.W., Tanner, C., Marek, K., 2004. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med* 351, 2498-2508.
- Fang, C., Yin, J., Xu, Z., Wang, Y., Xu, H., Zhou, H., Gao, C., 2011. Striatal dopaminergic fiber recovery after acute L-DOPA treatment in 6-hydroxydopamine (6-OHDA) lesioned rats. *Cell Biochem Biophys* 59, 49-56.
- Fearnley, J.M., Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain* 114 (Pt 5), 2283-2301.
- Filippi, L., Manni, C., Pierantozzi, M., Brusa, L., Danieli, R., Stanzione, P., Schillaci, O., 2005. 123I-FP-CIT semi-quantitative SPECT detects preclinical bilateral dopaminergic deficit in early Parkinson's disease with unilateral symptoms. *Nucl Med Commun* 26, 421-426.
- Forno, L.S., 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 259-272.
- Gee, P., San, R.H., Davison, A.J., Stich, H.F., 1992. Clastogenic and mutagenic actions of active species generated in the 6-hydroxydopamine/oxygen reaction: effects of scavengers of active oxygen, iron, and metal chelating agents. *Free Radic Res Commun* 16, 1-10.
- Glinka, Y., Gassen, M., Youdim, M.B., 1997. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl* 50, 55-66.
- Granas, C., Ferrer, J., Loland, C.J., Javitch, J.A., Gether, U., 2003. N-terminal truncation of the dopamine transporter abolishes phorbol ester- and substance P receptor-stimulated phosphorylation without impairing transporter internalization. *J Biol Chem* 278, 4990-5000.

- Guttman, M., Stewart, D., Hussey, D., Wilson, A., Houle, S., Kish, S., 2001. Influence of L-dopa and pramipexole on striatal dopamine transporter in early PD. *Neurology* 56, 1559-1564.
- Hagenah, J., Klein, C., Sieberer, M., Vieregge, P., 1999. Exogenous levodopa is not toxic to elderly subjects with non-parkinsonian movement disorders: further clinical evidence. *J Neural Transm* 106, 301-307.
- Heikkila, R., Cohen, G., 1971. Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* 172, 1257-1258.
- Heiss, W.D., Hilker, R., 2004. The sensitivity of 18-fluorodopa positron emission tomography and magnetic resonance imaging in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 11, 5-12.
- Hirsch, E., Graybiel, A.M., Agid, Y.A., 1988. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 334, 345-348.
- Hoehn, M.M., 1992. The natural history of Parkinson's disease in the pre-levodopa and post-levodopa eras. *Neurol Clin* 10, 331-339.
- Hoglinger, G.U., Rizk, P., Muriel, M.P., Duyckaerts, C., Oertel, W.H., Caille, I., Hirsch, E.C., 2004. Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7, 726-735.
- Holloway, R.G., Shoulson, I., Fahn, S., Kieburtz, K., Lang, A., Marek, K., McDermott, M., Seibyl, J., Weiner, W., Musch, B., Kamp, C., Welsh, M., Shinaman, A., Pahwa, R., Barclay, L., Hubble, J., LeWitt, P., Miyasaki, J., Suchowersky, O., Stacy, M., Russell, D.S., Ford, B., Hammerstad, J., Riley, D., Standaert, D., Wooten, F., Factor, S., Jankovic, J., Atassi, F., Kurlan, R., Panisset, M., Rajput, A., Rodnitzky, R., Shults, C., Petsinger, G., Waters, C., Pfeiffer, R., Biglan, K., Borchert, L., Montgomery, A., Sutherland, L., Weeks, C., DeAngelis, M., Sime, E., Wood, S., Pantella, C., Harrigan, M., Fussell, B., Dillon, S., Alexander-Brown, B., Rainey, P., Tennis, M., Rost-Ruffner, E., Brown, D., Evans, S., Berry, D., Hall, J., Shirley, T., Dobson, J., Fontaine, D., Pfeiffer, B., Brocht, A., Bennett, S., Daigneault, S., Hodgeman, K., O'Connell, C., Ross, T., Richard, K., Watts, A., Parkinson Study, G., 2004. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: a 4-year randomized controlled trial. *Arch Neurol* 61, 1044-1053.
- Hubble, J.P., Koller, W.C., Cutler, N.R., Sramek, J.J., Friedman, J., Goetz, C., Ranhosky, A., Korts, D., Elvin, A., 1995. Pramipexole in patients with early Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 18, 338-347.
- Izumi, Y., Sawada, H., Yamamoto, N., Kume, T., Katsuki, H., Shimohama, S., Akaike, A., 2007. Novel neuroprotective mechanisms of pramipexole, an anti-Parkinson drug, against endogenous dopamine-mediated excitotoxicity. *Eur J Pharmacol* 557, 132-140.
- Jankovic, J., 2002. Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology* 58, S19-32.
- Jennings, D., Tabamo, R., Seibyl, J., Marek, K., 2006. InSPECT: Investigating the effect of short-term treatment with pramipexole or levodopa on 123I beta-CIT and SPECT imaging. *Movement Disorders* 21, S631-S632.
- Jonsson, G., 1980. Chemical neurotoxins as denervation tools in neurobiology. *Annu Rev Neurosci* 3, 169-187.
- Jonsson, G., Sachs, C., 1971. Uptake and accumulation of 3 H-6-hydroxydopamine in adrenergic nerves. *Eur J Pharmacol* 16, 55-62.

- Joyce, J.N., Woolsey, C., Ryoo, H., Borwege, S., Hagner, D., 2004. Low dose pramipexole is neuroprotective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease, and downregulates the dopamine transporter via the D3 receptor. *BMC Biol* 2, 22.
- Kemmerer, E.S., Desmond, T.J., Albin, R.L., Kilbourn, M.R., Frey, K.A., 2003. Treatment effects on nigrostriatal projection integrity in partial 6-OHDA lesions: comparison of L-DOPA and pramipexole. *Exp Neurol* 183, 81-86.
- Kokoshka, J.M., Vaughan, R.A., Hanson, G.R., Fleckenstein, A.E., 1998. Nature of methamphetamine-induced rapid and reversible changes in dopamine transporters. *Eur J Pharmacol* 361, 269-275.
- Kuikka, J.T., Akerman, K., Bergstrom, K.A., Karhu, J., Hiltunen, J., Haukka, J., Heikkinen, J., Tiihonen, J., Wang, S., Neumeyer, J.L., 1995. Iodine-123 labelled N-(2-fluoroethyl)-2 beta-carbomethoxy-3 beta-(4-iodophenyl)nortropine for dopamine transporter imaging in the living human brain. *Eur J Nucl Med* 22, 682-686.
- Kumar, R., Agarwal, A.K., Seth, P.K., 1995. Free radical-generated neurotoxicity of 6-hydroxydopamine. *J Neurochem* 64, 1703-1707.
- Le, W.D., Jankovic, J., Xie, W., Appel, S.H., 2000. Antioxidant property of pramipexole independent of dopamine receptor activation in neuroprotection. *J Neural Transm* 107, 1165-1173.
- Lee, J., Zhu, W.M., Stanic, D., Finkelstein, D.I., Horne, M.H., Henderson, J., Lawrence, A.J., O'Connor, L., Tomas, D., Drago, J., Horne, M.K., 2008. Sprouting of dopamine terminals and altered dopamine release and uptake in Parkinsonian dyskinesia. *Brain* 131, 1574-1587.
- Li, C., Guo, Y., Xie, W., Li, X., Janokovic, J., Le, W., 2010. Neuroprotection of pramipexole in UPS impairment induced animal model of Parkinson's disease. *Neurochem Res* 35, 1546-1556.
- Luthman, J., Fredriksson, A., Sundstrom, E., Jonsson, G., Archer, T., 1989. Selective lesion of central dopamine or noradrenaline neuron systems in the neonatal rat: motor behavior and monoamine alterations at adult stage. *Behav Brain Res* 33, 267-277.
- Ma, Y., Smith, D., Hof, P.R., Foerster, B., Hamilton, S., Blackband, S.J., Yu, M., Benveniste, H., 2008. In Vivo 3D Digital Atlas Database of the Adult C57BL/6J Mouse Brain by Magnetic Resonance Microscopy. *Front Neuroanat* 2, 1.
- Mann, D.M.A., Yates, P.O., 1983. Possible role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mech Ageing Dev* 21, 193-203.
- Marek, K., Innis, R., van Dyck, C., Fussell, B., Early, M., Eberly, S., Oakes, D., Seibyl, J., 2001. [123I]beta-CIT SPECT imaging assessment of the rate of Parkinson's disease progression. *Neurology* 57, 2089-2094.
- Marek, K.L., Seibyl, J.P., Zoghbi, S.S., Zea-Ponce, Y., Baldwin, R.M., Fussell, B., Charney, D.S., van Dyck, C., Hoffer, P.B., Innis, R.P., 1996. [123I] beta-CIT/SPECT imaging demonstrates bilateral loss of dopamine transporters in hemi-Parkinson's disease. *Neurology* 46, 231-237.
- Meiergerd, S.M., Patterson, T.A., Schenk, J.O., 1993. D2 receptors may modulate the function of the striatal transporter for dopamine: kinetic evidence from studies in vitro and in vivo. *J Neurochem* 61, 764-767.

- Mitsumoto, Y., Watanabe, A., Mori, A., Koga, N., 1998. Spontaneous regeneration of nigrostriatal dopaminergic neurons in MPTP-treated C57BL/6 mice. *Biochem Biophys Res Commun* 248, 660-663.
- Montagu, K.A., 1957. Catechol compounds in rat tissues and in brains of different animals. *Nature* 180, 244-245.
- Morrish, P., 2002. Is it time to abandon functional imaging in the study of neuroprotection? *Mov Disord* 17, 229-232.
- Morrish, P.K., 2003. How valid is dopamine transporter imaging as a surrogate marker in research trials in Parkinson's disease? *Mov Disord* 18 Suppl 7, S63-70.
- Murer, M.G., Dziewczapolski, G., Menalled, L.B., Garcia, M.C., Agid, Y., Gershanik, O., Raisman-Vozari, R., 1998. Chronic levodopa is not toxic for remaining dopamine neurons, but instead promotes their recovery, in rats with moderate nigrostriatal lesions. *Ann Neurol* 43, 561-575.
- Narayanan, N.S., Guarnieri, D.J., DiLeone, R.J., 2010. Metabolic hormones, dopamine circuits, and feeding. *Front Neuroendocrinol* 31, 104-112.
- Nirenberg, M.J., Vaughan, R.A., Uhl, G.R., Kuhar, M.J., Pickel, V.M., 1996. The dopamine transporter is localized to dendritic and axonal plasma membranes of nigrostriatal dopaminergic neurons. *J Neurosci* 16, 436-447.
- Nuyts, J., Vunckx, K., Defrise, M., Vanhove, C., 2009. Small animal imaging with multi-pinhole SPECT. *Methods* 48, 83-91.
- Obeso, J.A., Olanow, C.W., Nutt, J.G., 2000. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. *Trends Neurosci* 23, S2-7.
- Oertel, W.H., Wolters, E., Sampaio, C., Gimenez-Roldan, S., Bergamasco, B., Dujardin, M., Grosset, D.G., Arnold, G., Leenders, K.L., Hundemer, H.-P., Lledó, A., Wood, A., Frewer, P., Schwarz, J., 2006. Pergolide versus levodopa monotherapy in early Parkinson's disease patients: The PELMOPET study. *Movement Disorders* 21, 343-353.
- Olanow, C.W., Stern, M.B., Sethi, K., 2009. The scientific and clinical basis for the treatment of Parkinson disease (2009). *Neurology* 72, S1-136.
- Pan, T., Xie, W., Jankovic, J., Le, W., 2005. Biological effects of pramipexole on dopaminergic neuron-associated genes: relevance to neuroprotection. *Neurosci Lett* 377, 106-109.
- Parkinson Study, G., 1997. Safety and efficacy of pramipexole in early Parkinson disease. A randomized dose-ranging study. *Parkinson Study Group. JAMA* 278, 125-130.
- Parkinson Study, G., 2000. Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease: A randomized controlled trial. *Parkinson Study Group. JAMA* 284, 1931-1938.
- Parkinson Study Group, C.C.I., 2009. Long-term effect of initiating pramipexole vs levodopa in early Parkinson disease. *Arch Neurol* 66, 563-570.
- ParkinsonStudyGroup, 2002. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson disease progression. *JAMA* 287, 1653-1661.
- Parkkinen, L., O'Sullivan, S.S., Kuoppamaki, M., Collins, C., Kallis, C., Holton, J.L., Williams, D.R., Revesz, T., Lees, A.J., 2011. Does levodopa accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology* 77, 1420-1426.

- Pavese, N., Kiferle, L., Piccini, P., 2009. Neuroprotection and imaging studies in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 15 Suppl 4, S33-37.
- Perese, D.A., Ulman, J., Viola, J., Ewing, S.E., Bankiewicz, K.S., 1989. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. *Brain Res* 494, 285-293.
- Piercey, M.F., 1998. Pharmacology of pramipexole, a dopamine D3-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 21, 141-151.
- Porter, C.C., Totaro, J.A., Stone, C.A., 1963. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *J Pharmacol Exp Ther* 140, 308-316.
- Rajput, A.H., 2001. The protective role of levodopa in the human substantia nigra. *Adv Neurol* 86, 327-336.
- Rousselet, E., Joubert, C., Callebert, J., Parain, K., Tremblay, L., Orioux, G., Launay, J.M., Cohen-Salmon, C., Hirsch, E.C., 2003. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. *Neurobiol Dis* 14, 218-228.
- Rudow, G., O'Brien, R., Savonenko, A.V., Resnick, S.M., Zonderman, A.B., Pletnikova, O., Marsh, L., Dawson, T.M., Crain, B.J., West, M.J., Troncoso, J.C., 2008. Morphometry of the human substantia nigra in ageing and Parkinson's disease. *Acta Neuropathol* 115, 461-470.
- Sachs, C., Jonsson, G., Heikkila, R., Cohen, G., 1975. Control of the neurotoxicity of 6-hydroxydopamine by intraneuronal noradrenaline in rat iris. *Acta Physiol Scand* 93, 345-351.
- Sakai, K., Gash, D.M., 1994. Effect of bilateral 6-OHDA lesions of the substantia nigra on locomotor activity in the rat. *Brain Res* 633, 144-150.
- Sauer, H., Oertel, W.H., 1994. Progressive degeneration of nigrostriatal dopamine neurons following intrastriatal terminal lesions with 6-hydroxydopamine: a combined retrograde tracing and immunocytochemical study in the rat. *Neuroscience* 59, 401-415.
- Saunders, C., Ferrer, J.V., Shi, L., Chen, J., Merrill, G., Lamb, M.E., Leeb-Lundberg, L.M., Carvelli, L., Javitch, J.A., Galli, A., 2000. Amphetamine-induced loss of human dopamine transporter activity: an internalization-dependent and cocaine-sensitive mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6850-6855.
- Schapira, A.H., 2002. Dopamine agonists and neuroprotection in Parkinson's disease. *Eur J Neurol* 9 Suppl 3, 7-14.
- Schapira, A.H., McDermott, M.P., Barone, P., Comella, C.L., Albrecht, S., Hsu, H.H., Massey, D.H., Mizuno, Y., Poewe, W., Rascol, O., Marek, K., 2013. Pramipexole in patients with early Parkinson's disease (PROUD): a randomised delayed-start trial. *Lancet Neurol* 12, 747-755.
- Schapira, A.H.V., Albrecht, S., Barone, P., Comella, C.L., McDermott, M.P., Mizuno, Y., Poewe, W., Rascol, O., Marek, K., 2010. Rationale for Delayed-Start Study of Pramipexole in Parkinson's Disease: The PROUD Study. *Movement Disorders* 25, 1627-1632.
- Scheffél, U., Lever, J.R., Abraham, P., Parham, K.R., Mathews, W.B., Kopajtic, T., Carroll, F.I., Kuhar, M.J., 1997. N-substituted phenyltropanes as in vivo binding ligands for rapid imaging studies of the dopamine transporter. *Synapse (New York, N.Y.)* 25, 345-349.

- Scherfler, C., Schwarz, J., Antonini, A., Grosset, D., Valldeoriola, F., Marek, K., Oertel, W., Tolosa, E., Lees, A.J., Poewe, W., 2007. Role of DAT-SPECT in the diagnostic work up of parkinsonism. *Mov Disord* 22, 1229-1238.
- Schillaci, O., Pierantozzi, M., Filippi, L., Manni, C., Brusa, L., Danieli, R., Bernardi, G., Simonetti, G., Stanzione, P., 2005. The effect of levodopa therapy on dopamine transporter SPECT imaging with(123)I-FP-CIT in patients with Parkinson's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 32, 1452-1456.
- Schmitt, K.C., Reith, M.E., 2010. Regulation of the dopamine transporter: aspects relevant to psychostimulant drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1187, 316-340.
- Schramm, N.U., Ebel, G., Engeland, U., Schurrat, T., Behe, M., Behr, T.M., 2003. High-resolution SPECT using multipinhole collimation. *Ieee Transactions on Nuclear Science* 50, 315-320.
- Senoh, S., Creveling, C.R., Udenfriend, S., Witkop, B., 1959. Chemical, Enzymatic and Metabolic Studies on the Mechanism of Oxidation of Dopamine¹. *J Am Chem Soc* 81, 6236-6240.
- Shannon, K.M., Bennett, J.P., Jr., Friedman, J.H., 1997. Efficacy of pramipexole, a novel dopamine agonist, as monotherapy in mild to moderate Parkinson's disease. The Pramipexole Study Group. *Neurology* 49, 724-728.
- Stanic, D., Finkelstein, D.I., Bourke, D.W., Drago, J., Horne, M.K., 2003a. Timecourse of striatal re-innervation following lesions of dopaminergic SNpc neurons of the rat. *Eur J Neurosci* 18, 1175-1188.
- Stanic, D., Parish, C.L., Zhu, W.M., Krstew, E.V., Lawrence, A.J., Drago, J., Finkelstein, D.I., Horne, M.K., 2003b. Changes in function and ultrastructure of striatal dopaminergic terminals that regenerate following partial lesions of the SNpc. *J Neurochem* 86, 329-343.
- Thanvi, B.R., Munshi, S.K., Vijaykumar, N., Lo, T.C., 2003. Neuropsychiatric non-motor aspects of Parkinson's disease. *Postgrad Med J* 79, 561-565.
- Thoenen, H., Tranzer, J.P., 1973. The Pharmacology of 6-Hydroxydopamine. *Annual Review of Pharmacology* 13, 169-180.
- Tompkins, M.M., Basgall, E.J., Zamrini, E., Hill, W.D., 1997. Apoptotic-like changes in Lewy-body-associated disorders and normal aging in substantia nigral neurons. *Am J Pathol* 150, 119-131.
- Ungerstedt, U., 1968. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. *Eur J Pharmacol* 5, 107-110.
- Ungerstedt, U., 1971. Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol Scand Suppl* 367, 95-122.
- Van Kampen, J.M., Eckman, C.B., 2006. Dopamine D3 receptor agonist delivery to a model of Parkinson's disease restores the nigrostriatal pathway and improves locomotor behavior. *J Neurosci* 26, 7272-7280.
- Vlaar, A.M.M., van Kroonenburgh, M.J.P.G., Kessels, A.G.H., Weber, W.E.J., 2007. Meta-analysis of the literature on diagnostic accuracy of SPECT in parkinsonian syndromes. *BMC Neurology* 7, 27-27.

Vogel, R.A., Kirch, D., LeFree, M., Steele, P., 1978. A new method of multiplanar emission tomography using a seven pinhole collimator and an Anger scintillation camera. *J Nucl Med* 19, 648-654.

Whone, A.L., Watts, R.L., Stoessl, a.J., Davis, M., Reske, S., Nahmias, C., Lang, A.E., Rascol, O., Ribeiro, M.J., Remy, P., Poewe, W.H., Hauser, R.a., Brooks, D.J., 2003. Slower progression of Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa: The REAL-PET study. *Ann Neurol* 54, 93-101.

Winner, B., Desplats, P., Hagl, C., Klucken, J., Aigner, R., Ploetz, S., Laemke, J., Karl, A., Aigner, L., Masliah, E., Buerger, E., Winkler, J., 2009. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Exp Neurol* 219, 543-552.

Winogrodzka, A., Bergmans, P., Booij, J., van Royen, E.A., Janssen, A.G., Wolters, E.C., 2001. [¹²³I]FP-CIT SPECT is a useful method to monitor the rate of dopaminergic degeneration in early-stage Parkinson's disease. *J Neural Transm* 108, 1011-1019.

Winogrodzka, A., Bergmans, P., Booij, J., van Royen, E.A., Stoof, J.C., Wolters, E.C., 2003. [(123)I]beta-CIT SPECT is a useful method for monitoring dopaminergic degeneration in early stage Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 294-298.

Wolf, M.E., Roth, R.H., 1990. Autoreceptor regulation of dopamine synthesis. *Ann N Y Acad Sci* 604, 323-343.

Zhou, Q.Y., Palmiter, R.D., 1995. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 83, 1197-1209.

Zigmond, M.J., Stricker, E.M., 1973. Recovery of feeding and drinking by rats after intraventricular 6-hydroxydopamine or lateral hypothalamic lesions. *Science* 182, 717-720.

Zou, L., Jankovic, J., Rowe, D.B., Xie, W., Appel, S.H., Le, W., 1999. Neuroprotection by pramipexole against dopamine- and levodopa-induced cytotoxicity. *Life Sci* 64, 1275-1285.