

Präklinische Evaluation von PET Tracern für die neurologische Bildgebung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefanie Vus

aus Mechernich

Köln, 2018

Berichtersteller/in:

PD Dr. Heike Endepols

Prof. Dr. Bernd Neumaier

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2019

Kurzzusammenfassung

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) hat sich in den letzten Jahrzehnten zu einem der wichtigsten Diagnoseverfahren für neurologische Erkrankungen entwickelt. Dabei werden radioaktiv markierte Sonden (PET Tracer) eingesetzt, die entweder an eine krankheitsspezifische Zielstruktur binden oder auf eine krankheitsspezifische Weise verstoffwechselt werden. Somit kann der pathologische Vorgang lokalisiert und sein Schweregrad bestimmt werden.

Bei fast allen neurologischen Erkrankungen treten Entzündungsprozesse auf, die mit der Expression des Inflammationsmarkers TSPO in aktivierten Mikrogliazellen einhergehen, was über radiomarkierte TSPO-Liganden visualisiert werden kann. Bei der Parkinsonschen Erkrankung kommt es darüber hinaus zu einer Verarmung des Neurotransmitters Dopamin. Um die Dopaminverarmung zu visualisieren und so die Krankheitsprogression überprüfen zu können, werden PET Tracer eingesetzt, die in den Biosyntheseweg von Dopamin eingehen.

Vor der klinischen Anwendung am Patienten müssen diese Tracer jedoch höchste Anforderungen erfüllen, was die präklinische Evaluation von neu entwickelten Radiotracer unerlässlich macht. In der vorliegenden Arbeit wurde die hohe Sensitivität der PET mit der hohen Auflösung der Magnetresonanztomographie (MRT) kombiniert, um die Bildgebungseigenschaften der Aminosäure-Tracer 5- und 6-[¹⁸F]FMT und des Neuroinflammationstracers [¹⁸F]DAA1106 präklinisch zu evaluieren. Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss Faktoren wie Neuroinflammation oder die Inhibition der Aromatischen-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) auf die Biodistribution der untersuchten Aminosäure-Tracer nehmen, um Rückschlüsse auf ihre Anreicherungsmechanismen zu ziehen.

Die präklinische Evaluation im Hemiparkinson- und im Apoplexiemodell der Ratte zeigte dabei, dass die neu entwickelten PET Tracer 5- und 6-[¹⁸F]FMT für die Visualisierung des Dopaminstoffwechsels und [¹⁸F]DAA1106 für die Detektion von Neuroinflammation bessere Bildgebungseigenschaften aufweisen als die klinisch etablierten Tracer 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DPA714. Des Weiteren deuten die Ergebnisse auf eine unspezifische Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA in entzündeten Hirnarealen hin.

Da die dopaminerge Degeneration von Parkinson-Patienten auch von Neuroinflammation begleitet wird, kann eine inflammationsbedingte Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA zur

Folge haben, dass die Krankheitsprogression unterschätzt und eine falsche Diagnose gestellt wird. Die beobachteten Limitierungen von 6-[¹⁸F]FDOPA erfordern neue Dopamintracer, für die radiofluorierte Tyrosinderivate wie 5- und 6-[¹⁸F]FMT vielversprechende Alternativen darstellen. 5-[¹⁸F]FMT, das in dieser Arbeit erstmalig präklinisch eingesetzt wurde, zeigte optimale Eigenschaften hinsichtlich seiner metabolischen Stabilität und Hirngängigkeit. Darüber hinaus zeigte der Vergleich mit 6-[¹⁸F]FMT, welchen großen Einfluss die Radiofluorierungsposition auf den Metabolismus von radiofluorierten Tyrosinderivaten hat. Die Evaluation des Neuroinflammationstracers [¹⁸F]DAA1106 konnte zwar dessen Eignung zur Visualisierung von Neuroinflammation sowie ein höheres spezifisches Signal als das des Referenztracers [¹⁸F]DPA714 nachweisen, Letzteres ging jedoch auch mit einer höheren Backgroundaktivität einher.

Die genannten Ergebnisse belegen nicht nur, dass ständige Weiterentwicklungen bestehender Tracer notwendig sind, sondern auch, dass bereits etablierte Tracer einer kritischen Reevaluation unterzogen werden müssen, um ihren klinischen Nutzen neu zu validieren. Darüber hinaus unterstreichen sie die Komplexität der durch zahlreiche Faktoren beeinflussten Anreicherungs- und Verstoffwechslungsmechanismen der untersuchten Tracer. Die Aufklärung dieser Mechanismen war das Hauptziel dieser Arbeit und ist eine wichtige Voraussetzung für die zukünftige Entwicklung neuer spezifischer PET Tracer für die neurologische Bildgebung.

Abstract

Positron emission tomography (PET) has become one of the most important diagnostic tools for neurological diseases in recent decades. The detection of disease-specific targets with the help of selective radiolabeled ligands enables the visualization of the underlying physiological or pathological processes.

In almost all neurological diseases, inflammatory processes occur that are associated with the expression of the inflammation marker TSPO in activated microglial cells, which can be visualized via radiolabelled TSPO ligands. In addition to neuroinflammation, Parkinson's disease also leads to dopamine depletion of the nigrostriatal system. In order to visualize dopamine depletion and monitor disease progression, PET tracers are used that enter the biosynthetic pathway of dopamine. These PET tracers must meet the highest requirements before clinical application on patients, which makes the preclinical evaluation of newly developed radiotracers indispensable.

In the present study, the high sensitivity of PET was combined with the high resolution of anatomical magnetic resonance tomography (MRI) to investigate the imaging properties of the amino acid tracers 5- and 6-[¹⁸F]FMT and the neuroinflammation tracer [¹⁸F]DAA1106.

The preclinical evaluation in the hemiparkinsonian and apoplexy rat models showed their superiority over the clinically established benchmark tracers 6-[¹⁸F]FDOPA and [¹⁸F]DPA714, outperforming them in almost all investigated imaging parameters. Furthermore, the results indicate an unspecific accumulation of 6-[¹⁸F]FDOPA in inflamed brain areas. Since dopaminergic degeneration of Parkinson's patients is also accompanied by neuroinflammation, inflammation-induced accumulation of 6-[¹⁸F]FDOPA may result in underestimation of disease progression and incorrect diagnosis.

The poor imaging properties of 6-[¹⁸F]FDOPA highlighted the need for new dopamine tracers for which radiofluorinated tyrosine derivatives such as 5- and 6-[¹⁸F]FMT are promising alternatives. In this context, 5-[¹⁸F]FMT's ability to cross the blood-brain barrier was demonstrated for the first time, as well as its excellent imaging properties and its high metabolic stability. In addition, the comparison with 6-[¹⁸F]FMT impressively demonstrated the far-reaching influence of the radiofluorination position on the metabolism of radiofluorinated tyrosine derivatives.

The evaluation of [¹⁸F]DAA1106 showed its suitability for the visualization of neuroinflammation, but the higher specific signal compared to [¹⁸F]DPA714 was also accompanied by higher background activity.

Thus, the results of this work illustrate not only the need for a continuous further development, but also the importance of a critical attitude towards already clinically established PET tracers such as 6-[¹⁸F]FDOPA. The studies carried out within the course of this work illustrate the complexity of the often multifactorial enrichment mechanisms. For the future development of new theragnostic PET tracers the clarification of the underlying mechanisms is highly needed and was also the main objective of this doctoral thesis.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	11
1.1	POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE.....	12
1.2	DER DOPAMINMETABOLISMUS.....	15
1.2.1	DEGENERATION DES DOPAMINERGEN SYSTEMS – MORBUS PARKINSON	18
1.2.2	BILDGEBUNG DES DOPAMINERGEN SYSTEMS.....	22
1.3	NEUROINFLAMMATION UND GLOSE – IMMUNANTWORT DES ZENTRALEN NERVENSYSTEMS	23
1.3.1	MIKROGLIA UND MAKROPHAGEN	23
1.3.2	ASTROGLIA.....	27
1.3.3	DIE BLUT-HIRN-SCHRANKE	30
1.4	AMINOSÄURE-TRACER	32
1.4.1	6-[¹⁸ F]FDOPA	33
1.4.2	5- UND 6-[¹⁸ F]FMT.....	35
1.4.3	[¹⁸ F]FET.....	39
1.5	TSPO-TRACER.....	40
1.5.1	[¹⁸ F]DAA1106 UND [¹⁸ F]DPA714	40
1.6	ZIELSETZUNG	43
1.6.1	TEILSTUDIE I: BIODISTRIBUTION VON 6-[¹⁸ F]FDOPA BEI NEUROINFLAMMATION IM HEMIPARKINSONMODELL	43
1.6.2	TEILSTUDIE II: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON 5- UND 6-[¹⁸ F]FMT.....	43
1.6.3	TEILSTUDIE III: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON [¹⁸ F]DAA1106	44
2	MATERIAL UND METHODEN.....	45
2.1	VERSUCHSTIERE UND HALTUNG	45
2.2	ANÄSTHESIE	45
2.3	DAS 6-OHDA HEMIPARKINSONMODELL DER RATTE	46
2.4	DAS ACAO APOPLEXIEMODELL DER RATTE.....	51
2.5	DURCHFÜHRUNG DER MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE	54
2.6	DURCHFÜHRUNG DER POSITRONEN-EMISSIONS-TOMOGRAPHIE	54

2.6.1	INTENSITÄTSNORMIERUNG	56
2.6.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG	58
2.7	STUDIENDESIGN.....	60
2.7.1	TEILSTUDIE I: BIODISTRIBUTION VON 6-[¹⁸ F]FDOPA BEI NEUROINFLAMMATION IM HEMIPARKINSONMODELL	60
2.7.2	TEILSTUDIE II: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON 5- UND 6-[¹⁸ F]FMT	64
2.7.3	TEILSTUDIE III: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON [¹⁸ F]DAA1106	67
2.8	PERFUSION UND GEHIRNENTNAHME NACH VERSUCHSENDE	69
2.9	IMMUNHISTOCHEMIE.....	70
2.9.1	ANTIKÖRPERFÄRBUNG MIT ANTI-IBA1	71
2.9.2	ANTIKÖRPERFÄRBUNG MIT ANTI-TH	73
3	ERGEBNISSE TEILSTUDIE I: BIODISTRIBUTION VON 6-[¹⁸F]FDOPA BEI NEUROINFLAMMATION IM HEMIPARKINSONMODELL	75
3.1	EINE WOCHE NACH STRIATALER INJEKTION	75
3.1.1	PET BEI STARKER NEUROINFLAMMATION	75
3.1.2	PET BEI SCHWACHER NEUROINFLAMMATION	76
3.1.3	KORRELATIONSANALYSE ZWISCHEN 6-[¹⁸ F]FDOPA UND [¹⁸ F]DAA1106	77
3.1.4	IMMUNHISTOCHEMIE BEI STARKER NEUROINFLAMMATION	78
3.2	VIER WOCHEN NACH STRIATALER INJEKTION.....	81
3.2.1	PET BEI STARKER NEUROINFLAMMATION	82
3.2.2	KORRELATIONSANALYSE ZWISCHEN 6-[¹⁸ F]FDOPA UND [¹⁸ F]DAA1106	83
3.2.3	IMMUNHISTOCHEMIE BEI STARKER NEUROINFLAMMATION	83
3.3	EINE WOCHE NACH INJEKTION IN DAS MEDIALE VORDERHIRNBÜNDEL.....	87
3.3.1	PET BEI STARKER NEUROINFLAMMATION	88
3.3.2	KORRELATIONSANALYSE ZWISCHEN 6-[¹⁸ F]FDOPA UND [¹⁸ F]DAA1106	90
3.3.3	VERGLEICH MIT [¹⁸ F]FET	90
3.4	VIER WOCHEN NACH INJEKTION IN DAS MEDIALE VORDERHIRNBÜNDEL	92
3.4.1	KORRELATIONSANALYSE ZWISCHEN 6-[¹⁸ F]FDOPA UND [¹⁸ F]DAA1106	93

4	DISKUSSION TEILSTUDIE I: BIODISTRIBUTION VON 6-[¹⁸F]FDOPA BEI NEUROINFLAMMATION IM HEMIPARKINSONMODELL	94
4.1	EINE WOCHEN NACH STRIATALER INJEKTION	95
4.1.1	EINFLUSS DES STEREOTAKTISCHEN RAHMENS AUF DIE NEUROINFLAMMATION	95
4.1.2	KORRELATION ZWISCHEN [¹⁸ F]DAA1106 UND 6-[¹⁸ F]FDOPA	97
4.1.3	IMMUNHISTOCHEMIE	98
4.2	VIERT WOCHE NACH STRIATALER INJEKTION.....	101
4.2.1	AUSBLEIBENDE KORRELATION ZWISCHEN [¹⁸ F]DAA1106 UND 6-[¹⁸ F]FDOPA.....	101
4.2.2	IMMUNHISTOCHEMIE	102
4.3	EINE WOCHEN NACH INJEKTION IN DAS MEDIALE VORDERHIRNBÜNDEL.....	103
4.3.1	KORRELATION ZWISCHEN [¹⁸ F]DAA1106 UND 6-[¹⁸ F]FDOPA	104
4.3.2	VERGLEICH MIT [¹⁸ F]FET	104
4.4	VIERT WOCHE NACH INJEKTION IN DAS MEDIALE VORDERHIRNBÜNDEL	106
4.4.1	AUSBLEIBENDE KORRELATION ZWISCHEN [¹⁸ F]DAA1106 UND 6-[¹⁸ F]FDOPA.....	106
4.5	FAZIT TEILSTUDIE I.....	109
5	ERGEBNISSE TEILSTUDIE II: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON 5-[¹⁸F]FMT UND 6-[¹⁸F]FMT	111
5.1	VERGLEICH VON 6-[¹⁸F]FMT UND 6-[¹⁸F]FDOPA IM HEMIPARKINSONMODELL.....	111
5.2	VERGLEICH VON 5- UND 6-[¹⁸F]FMT MIT 6-[¹⁸F]FDOPA IN GESUNDEN RATTEN	114
5.2.1	BIODISTRIBUTION	114
5.2.2	ZEITAKTIVITÄTSKURVEN.....	118
6	DISKUSSION TEILSTUDIE II: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON 5-[¹⁸F]FMT UND 6-[¹⁸F]FMT	126
6.1	VERGLEICH VON 6-[¹⁸F]FMT UND 6-[¹⁸F]FDOPA IM HEMIPARKINSONMODELL.....	126

6.2	VERGLEICH VON 5- UND 6-[¹⁸F]FMT MIT 6-[¹⁸F]FDOPA IN GESUNDEN RATTEN	133
6.3	FAZIT TEILSTUDIE II	141
7	ERGEBNISSE TEILSTUDIE III: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON [¹⁸F]DAA1106.....	145
7.1	VERGLEICH VON [¹⁸F]DAA1106 UND [¹⁸F]DPA714 IM APOPLEXIEMODELL	145
7.1.1	BIODISTRIBUTION	145
7.1.2	ZEITAKTIVITÄTSKURVEN.....	146
7.2	VERGLEICH VON [¹⁸F]DAA1106 UND [¹⁸F]DPA714 IN GESUNDEN RATTEN.....	152
7.2.1	BIODISTRIBUTION	152
8	DISKUSSION TEILSTUDIE III: PRÄKLINISCHE EVALUATION VON [¹⁸F]DAA1106.....	155
8.1	VERGLEICH VON [¹⁸F]DAA1106 UND [¹⁸F]DPA714 IM APOPLEXIEMODELL	155
8.2	VERGLEICH VON [¹⁸F]DAA1106 UND [¹⁸F]DPA714 IN GESUNDEN RATTEN.....	160
8.3	FAZIT TEILSTUDIE III.....	161
9	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION	164
10	LITERATURVERZEICHNIS	170
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	188
	DANKSAGUNG.....	188
	ERKLÄRUNG	192

1 Einleitung

Die neurologische Bildgebung mittels Positronen-Emissions-Tomographie (PET) oder Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein wichtiges Werkzeug bei der Früherkennung und Behandlung von neurologischen Erkrankungen wie des in dieser Arbeit thematisierten Morbus Parkinson oder der Apoplexie.

Die stetige Entwicklung neuer spezifischer Radiotracer ermöglicht dabei nicht nur die Bildgebung neurologischer Erkrankungen, sondern auch die Erforschung der zugrundeliegenden Krankheitsmechanismen. Bevor die neu entwickelten Radiotracer jedoch klinisch etabliert werden können, muss ihre Unschädlichkeit und Wirksamkeit präklinisch evaluiert werden. Die präklinische Evaluation stellt somit die Schnittstelle zwischen der radiochemischen Entwicklung und der klinischen Anwendung von PET Tracern dar. Sie kann *in vitro*, also anhand von Zellexperimenten, oder *in vivo* in Tiermodellen erfolgen.

In dieser Arbeit wurde die präklinische Evaluation *in vivo* anhand verschiedener Krankheitsmodelle der Ratte durchgeführt. Untersucht wurden dabei die bisher nicht klinisch etablierten Dopamintracer 5- und 6- ^{18}F FMT und der Neuroinflammationstracer ^{18}F DAA1106. Die Bildgebung des Dopaminmetabolismus spielt vor allem bei der Diagnose von Morbus Parkinson eine entscheidende Rolle, da die Parkinsonsche Krankheit mit einer Dopaminverarmung des Gehirns einhergeht, die durch die PET sichtbar gemacht werden kann. 5- und 6- ^{18}F FMT wurden deshalb in einem Parkinsonmodell der Ratte evaluiert und mit dem bereits klinisch etablierten Standardtracer 6- ^{18}F FDOPA verglichen.

Neuroinflammation ist ein charakteristisches Merkmal zahlreicher neurologischer Erkrankungen (Chen *et al.*, 2016). Für die Bildgebung von Neuroinflammation werden Liganden verwendet, die spezifisch an das bei Neuroinflammation überexprimierte Translocator Protein (TSPO) binden. ^{18}F DAA1106 ist ein solcher TSPO-Ligand und wurde für die Bildgebung von Neuroinflammation entwickelt. Da Neuroinflammation auch bei Morbus Parkinson und im Zuge der Sauerstoffarmut bei Apoplexie auftritt (Herrero *et al.*, 2015; Simats *et al.*, 2016), wurde ^{18}F DAA1106 in einem Rattenmodell

des Morbus Parkinson und in einem Apoplexiemodell evaluiert sowie mit dem klinisch etablierten TSPO-Liganden [¹⁸F]DPA714 verglichen.

Das gleichzeitige Auftreten von Dopaminverarmung und Neuroinflammation bei Morbus Parkinson stellt besondere Anforderungen an die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Dopamintracer. Deshalb wurde die Biodistribution von 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA im Parkinsonmodell mit der des Neuroinflammationstracers [¹⁸F]DAA1106 verglichen, um mögliche Interferenzen zwischen Dopaminmetabolismus und Neuroinflammation zu untersuchen.

Neben einer ausreichenden Selektivität erfordert die neurologische Bildgebung auch die Hirngängigkeit der Tracer. Die Eruiierung dieser und einiger weiterer Parameter, wie beispielsweise die Höhe der Backgroundaktivität oder der zeitliche Verlauf der Traceranreicherungen, sind zentrale Bestandteile dieser Arbeit, deren theoretischer Hintergrund im Folgenden erläutert wird.

1.1 Positronen-Emissions-Tomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist ein nichtinvasives, bildgebendes Verfahren, das es ermöglicht, physiologische oder pathologische Prozesse auf molekularer Ebene sichtbar zu machen (Jadvar & Colletti, 2014). Während andere Bildgebungsverfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Computertomographie (CT) die Struktur von Geweben darstellen, zeigt die PET molekulare Targets oder Stoffwechselprozesse. Aufgrund der hohen Sensitivität können mithilfe der PET sehr eng begrenzte oder schwach verlaufende Pathologien schon dann identifiziert werden, wenn noch keine messbaren strukturellen Veränderungen vorliegen (Vaquero & Kinahan, 2015). So ist es innerhalb der Onkologie mittels der PET beispielsweise möglich, einen Tumor durch seinen erhöhten Aminosäuremetabolismus und die damit verbundene Anreicherung von Aminosäure-Tracern im Tumorgewebe zu identifizieren (Bar-Shalom *et al.*, 2000). Die Neurologie nutzt die PET zur Diagnostik und Beurteilung der Progression von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder der Alzheimer-Krankheit (Dupont *et al.*, 2018).

Auch in der Präklinik spielt die PET eine essentielle Rolle. So können mithilfe der Kleintierbildgebung grundlegende Pathomechanismen verschiedener onkologischer oder

neurologischer Erkrankungen erforscht oder neue Therapieansätze erprobt werden, bevor sie in die Klinik überführt und am Humanpatienten angewendet werden. Dabei wird dem Versuchstier eine radioaktiv markierte Substanz (PET Tracer) injiziert, die selektiv an eine mit der zu untersuchenden Erkrankung assoziierte Zielstruktur bindet und sie auf diese Weise visualisiert. Zuvor wird an das Molekül ein Radionuklid gebunden, dessen radioaktiver Zerfall mit Hilfe des PET Scanners detektiert und dessen Verteilung innerhalb des Organismus räumlich rekonstruiert werden kann. Die am häufigsten verwendeten Radionuklide sind ^{18}F und ^{11}C , die sich aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeiten, und der damit verbundenen geringeren Strahlenbelastung für die Patienten, besonders für die klinische Anwendung eignen.

Die PET basiert auf der Detektion der durch radioaktiven Zerfall freiwerdenden Strahlungsenergie. Beim radioaktiven Zerfall von ^{18}F wird im Kern des Radionuklids ein Proton zu einem Neutron umgewandelt und setzt dabei ein Neutrino und ein Positron frei (β^+ -Zerfall). Es kommt danach zur sog. Annihilation, der Vernichtung des freiwerdenden Positrons durch dessen Kollision mit einem energetisch geeigneten Elektron (Miller *et al.*, 2008). Dabei entstehen zwei hochenergetische Photonen (γ -Quanten, 511 keV), die in einem Winkel von 180° ausgesendet werden. Ein Zerfallsereignis wird nur dann als ein solches registriert, wenn zwei γ -Quanten innerhalb eines bestimmten Koinzidenzintervalls (4-15 ns) auf die Detektoren treffen. Da die γ -Quanten in einem Winkel von 180° ausgestrahlt werden, muss die Annihilation folglich auf einer gedachten Linie zwischen den beiden sich gegenüberliegenden Detektorelementen stattgefunden haben. Diese Linie wird auch als line of response (LOR) bezeichnet (Berger, 2003; Miller *et al.*, 2008).

Die erfassten Koinzidenzereignisse werden daraufhin von einer Computersoftware räumlich und zeitlich eingeordnet. Anhand dieser Daten wird ein 3D-Datensatz des gemessenen Organismus rekonstruiert, der die Verteilung des Radiotracers und dessen Konzentration wiedergibt. Auf diese Weise können wichtige Informationen über die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse oder mit bestimmten Krankheiten assoziierten Pathologien gesammelt werden. In Abbildung 1 ist die Funktionsweise der PET schematisch dargestellt.

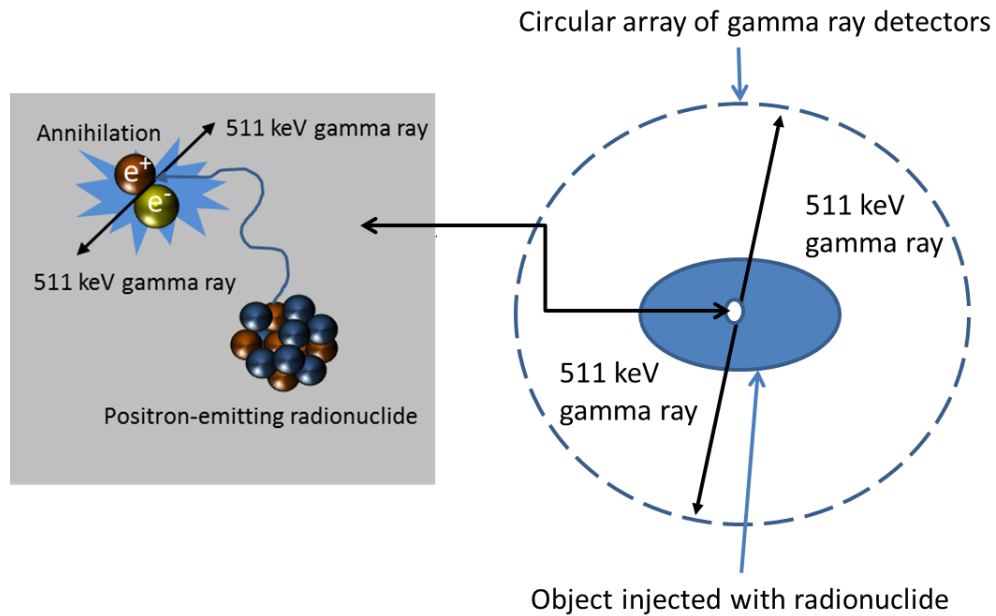


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Funktionsweise der PET (entnommen aus: http://umanitoba.ca/faculties/health_sciences/medicine/units/imaging_transgenic/10683.html, am 5.7.18).

Da die Koinzidenzmessung nur den Ort der Positronenannihilation und nicht den Ort der Positronenemission erfassen kann, ist die Genauigkeit der Zuordnung von ausgesendeten γ -Quanten und dem zugehörigen Ort des β^+ -Zerfalls abhängig von der Wegstrecke, die ein Positron bis zur Annihilation zurücklegt. Sie beträgt im Schnitt 1-2 mm und ist wiederum abhängig vom jeweiligen Positronenemitter bzw. der Energie seiner emittierten Positronen. Je geringer die Energie des Positrons, desto geringer ist die Strecke, die es bis zur Annihilation zurücklegt, und desto höher ist die räumliche Auflösung. Das in dieser Arbeit verwendete Radionuklid ^{18}F ist ein Positronenemitter mit einer maximalen Energie (E_{β^+}) von 0,64 MeV. Die Positronen legen bis zu ihrer Annihilation maximal 2,4 mm und im Durchschnitt 0,6 mm zurück. (Berger, 2003; Jacobs *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2008; “Medcyclopaedia - Pet imaging”, 2012).

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen mit ^{18}F markierte Liganden des sog. Translocator Proteins (TSPO-Liganden), zum anderen mit ^{18}F markierte Aminosäuren zur Bildgebung des dopaminergen Systems eingesetzt, um Rückschlüsse auf ihre Hirngängigkeit, Metabolisierung, Anreicherung und schließlich ihren Abbau zu ziehen. Im folgenden Kapitel wird der mit den Aminosäure-Tracern 6- ^{18}F FDOPA, 5- und 6- ^{18}F FMT adressierte Dopaminmetabolismus genauer erläutert.

1.2 Der Dopaminmetabolismus

Ein zentrales Thema dieser Arbeit ist die Bildgebung des Dopaminmetabolismus mit Hilfe der radiofluorierten aromatischen Aminosäuren 3,4-Dihydroxy-6-[¹⁸F]-fluor-L-phenylalanin (6-[¹⁸F]FDOPA), 5-[¹⁸F]Fluor-L-m-tyrosin (5-[¹⁸F]FMT) und 6-[¹⁸F]Fluor-L-m-tyrosin (6-[¹⁸F]FMT) (vgl. Kapitel 1.4) die analog zu der Aminosäure Dopamin verstoffwechselt werden und so das dopaminerge System visualisieren (Elsinga *et al.*, 2006).

Die Biosynthese von Dopamin erfolgt ausgehend von der Aminosäure L-Phenylalanin und findet in der Peripherie vor allem im Nebennierenmark und im Zentralnervensystem vorwiegend in den dopaminergen Zellkörpern der Substantia nigra pars compacta (SNpc), der Area tegmentalis ventralis (VTA) und im Hypothalamus statt (Rubí & Maechler, 2010; Meiser *et al.*, 2013).

In intakten dopaminergem Zellen wird L-Phenylalanin durch das Enzym Phenylalanin-Hydroxylase zu L-Tyrosin und durch Tyrosin-Hydroxylase (TH) zu 3,4-L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydroxyliert. L-DOPA wird daraufhin durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu Dopamin verstoffwechselt, welches als Neurotransmitter fungiert. Im Anschluss wird Dopamin entweder zu Noradrenalin (eng. Norepinephrin) und Adrenalin (engl. Epinephrin) metabolisiert, oder durch vesikuläre Monoamintransporter (VMAT) in Vesikel aufgenommen. Innerhalb der Vesikel wird Dopamin präsynaptisch gespeichert bis es zur Signalweiterleitung in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird (Juárez Olguín *et al.*, 2016). Abbildung 2 zeigt die einzelnen Schritte der Dopaminsynthese ausgehend von L-Tyrosin.

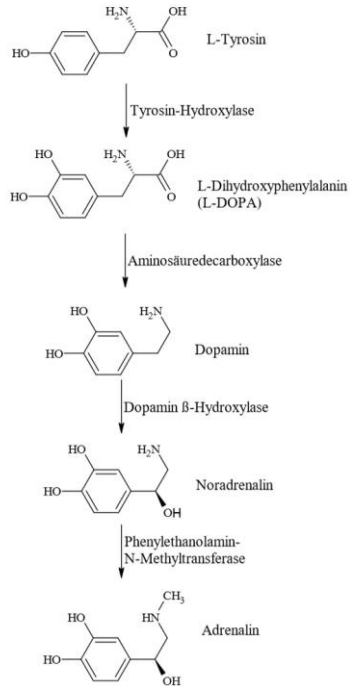


Abbildung 2: Dopaminbiosynthese ausgehend von L-Tyrosin (modifiziert nach Juárez Olguín *et al.*, 2016).

Sobald der Neurotransmitter Dopamin in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wurde, kann er an verschiedene postsynaptische Rezeptoren binden und abhängig vom jeweiligen Rezeptor unterschiedliche Wirkungskaskaden auslösen. Bislang sind zwei Untergruppen dieser G-Protein-gekoppelten Dopaminrezeptoren bekannt, die D1-Gruppe (D1- und D5-Rezeptoren) und die D2-Gruppe (D2-, D3- und D4-Rezeptoren) (Beaulieu *et al.*, 2015). Bindet Dopamin an einen Rezeptor der D1-Gruppe, wird das gekoppelte G-Protein freigesetzt, welches daraufhin das Enzym Adenylatzyklase (AC) aktiviert. AC stimuliert die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Proteinkinase A (PKA), die wiederum spannungsabhängige K^+ , Na^+ und Ca^{2+} Ionenkanäle sowie Glutamat und GABA-Rezeptoren modulieren. Rezeptoren der D2-Klasse sind an ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt. Bei eingehendem Dopaminsignal hemmt dieses G-Protein die AC und somit die Produktion von cAMP, limitiert auf diese Weise die PKA-Aktivität und somit auch die Signalweiterleitung. Nach der Bindung an den Rezeptor wird das ausgeschüttete Dopamin von Na^+ -abhängigen Dopamintransportern (DAT) zurück in die Präsynapse aufgenommen, um das Transmittersignal auf diese Weise zu deaktivieren.

Dort wird es bis zur nächsten Dopaminausschüttung erneut in Vesikeln gespeichert oder zu den inaktiven Dopaminmetaboliten 3,2-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) bzw. 3-Methoxytyramin (MT) und schließlich zu Homovanillinsäure (HVA). Abbildung 3 zeigt die schematische Darstellung der Dopaminsynthese innerhalb der Präsynapse und die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt, sowie die D1- und D2-Rezeptoren an der postsynaptischen Membran (Jackson & Westlind-Danielsson, 1994; Juárez Olguín *et al.*, 2016).

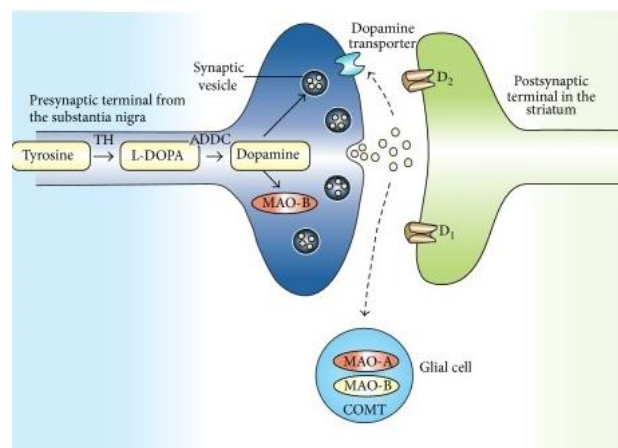


Abbildung 3: Dopaminsynthese und Signalweiterleitung an der Synapse (modifiziert nach Juárez Olguín *et al.* 2016).

Der enzymatische Abbau von Dopamin zu HVA, dem Endprodukt der Dopaminsynthese, erfolgt über die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (vgl. Abbildung 4). MAO ist für den Dopaminabbau in den dopaminergen Terminalien verantwortlich (Pinder, 2002). Der COMT-vermittelte Dopaminabbau findet vorwiegend im Zytoplasma von Gliazellen oder in der Peripherie statt (Männistö & Kaakkola 1999; Hälbig & Koller 2007).

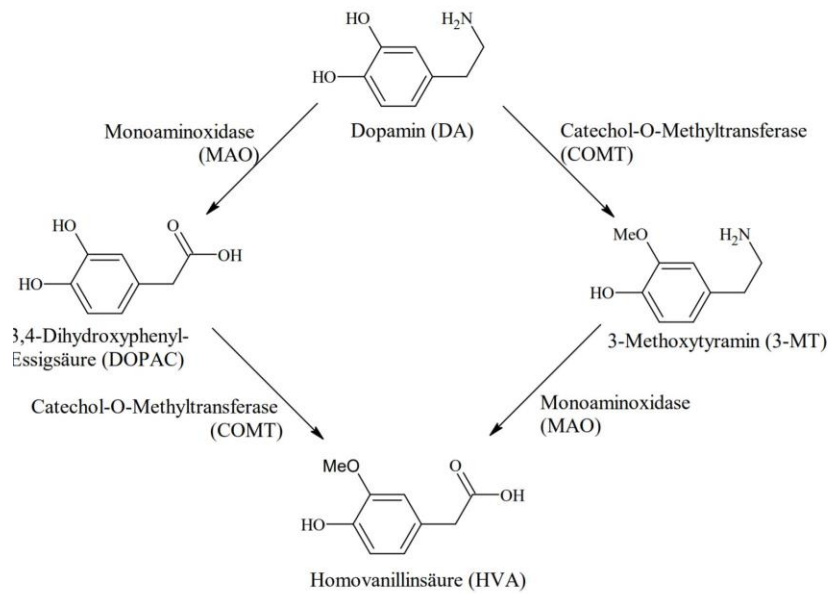


Abbildung 4: Dopaminabbau zu Homovanillinsäure durch die Enzyme Monoaminoxidase (MAO) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT).

Während eine Erhöhung der Tyrosinkonzentration keinen Einfluss auf die Dopaminkonzentration nimmt, steigert die externe Zufuhr von L-DOPA die zerebrale Dopaminverfügbarkeit (Nagatsu *et al.*, 1964). Der limitierende Faktor der Dopaminsynthese ist folglich das Enzym TH, welches Tyrosin zu L-DOPA umwandelt. Die Dopaminbiosynthese findet vor allem in den dopaminergen Neuronen der SNpc und in geringerem Maße innerhalb der dopaminergen Terminalien des Striatum statt (Mazloom & Smith, 2006). Bei Parkinson-Patienten ist die Dopaminbiosynthese durch das Absterben der dopaminergen Zellkörper innerhalb der SNpc reduziert (Zhu *et al.*, 2012). Die Dopaminsynthese ist somit zunehmend gestört, was zu einer progressiven Dopaminverarmung des Gehirns führt. Im folgenden Kapitel wird das Krankheitsbild des Morbus Parkinson genauer erläutert.

1.2.1 Degeneration des dopaminergen Systems – Morbus Parkinson

Morbus Parkinson ist eine meist altersbedingte neurodegenerative Erkrankung der Basalganglien. Durch das Absterben der dopaminergen Zellkörper in der SNpc und der VTA kommt es zu einer Funktionsstörung der Basalganglien, die zu einer

Dopaminverarmung des Striatum und somit zu einem Ungleichgewicht von Erregung und Hemmung innerhalb der sog. Basalganglienschleife führt (Lanciego *et al.*, 2012). Im gesunden Gehirn sind die Basalganglien für die Initiierung gewollter Bewegungsabläufe verantwortlich und hemmen gleichzeitig ungewollte Bewegungen (Bolam *et al.*, 2000). Abbildung 5 zeigt ein schematisch dargestelltes, vereinfachtes Modell der Basalganglienschleife im gesunden Gehirn (links) und bei Morbus Parkinson (rechts).

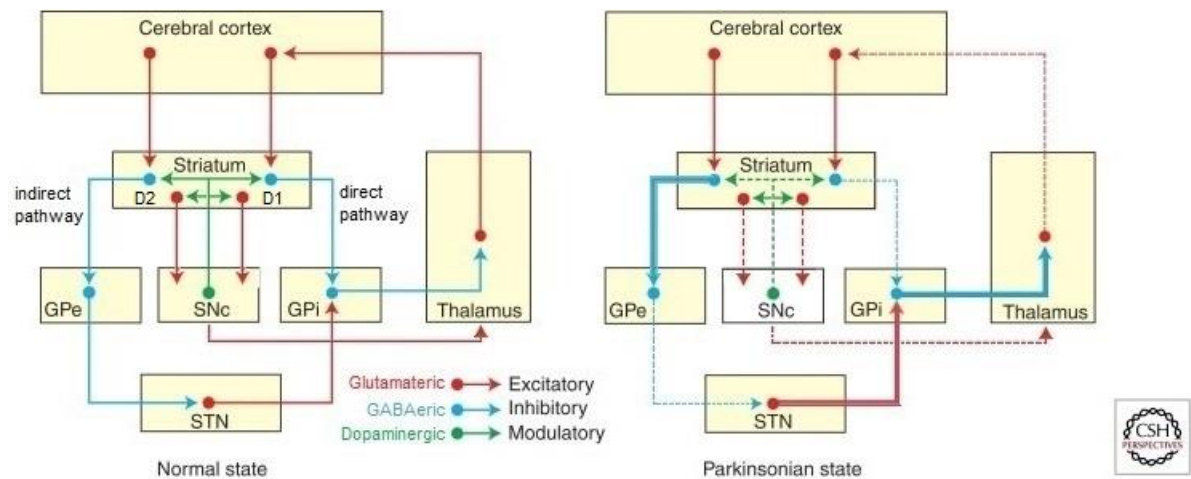


Abbildung 5: Schematisches Modell der Basalganglienschleife im gesunden Gehirn (links) und bei Morbus Parkinson (rechts).

Zu den Kerngebieten der Basalganglien gehören der Nucleus caudatus und das Putamen, die aufgrund ihrer anatomischen und funktionalen Ähnlichkeit meist als Corpus Striatum zusammengefasst werden, Globus Pallidus externus und internus (GPe und GPi), Substantia nigra pars compacta (SNpc) und der Nucleus subthalamicus (STN) (modifiziert nach Lanciego *et al.*, 2012).

Das Striatum dient als Eingangsstation der Basalganglien. Hier läuft die aus dem Cortex stammende glutamaterge (exzitatorische) und die von der SNpc eingehende dopaminerge (modulierende) Innervierung zusammen. Das Striatum sendet wiederum GABAerge (hemmende) Projektionen zu den Ausgangsarealen der Basalganglien, dem GPi und der Substantia nigra pars reticulata (SNr). Die Signalweiterleitung vom Striatum zur GPi kann über zwei verschiedene Signalwege erfolgen. Der direkte Signalweg, der exzitatorisch auf den Cortex und somit bewegungsfördernd wirkt, ist für die Initiierung gewollter Bewegungen verantwortlich. Der indirekte Signalweg, der inhibitorisch auf den Cortex und daher bewegungshemmend wirkt, dient der Inhibition ungewollter Bewegungen. Beim direkten Weg verläuft die GABAerge Signalweiterleitung vom Striatum direkt zum GPi, der ebenfalls GABAerg zum Thalamus projiziert. Die

Hintereinanderschaltung von zwei GABAergen, also hemmenden Verbindungen, führt zur Aufhebung der zweiten Inhibition durch die Erste (Disinhibition des nachgeschalteten Areals). Beim direkten Signalweg der Basalganglienschleife bedeutet dies, dass der durch den GPi grundsätzlich tonisch inhibierte Thalamus disinhibiert wird, sobald ein GABAerges Signal aus dem Striatum eintrifft. Diese Disinhibition führt wiederum zu einer umso stärkeren exzitatorischen Wirkung des Thalamus auf den durch ihn glutamaterg (erregend) innervierten Cortex. Der Eingang des exzitatorischen Glutamatsignals initiiert daraufhin die zielgerichtete, gewollte Bewegung (Lanciego, Luquin, & Obeso 2012; Cenci, Jörntell, & Petersson 2018; Lee *et al.*, 2016).

Beim indirekten Weg sind zwischen Striatum und GPi noch der GPe und der STN geschaltet. Auch im indirekten Signalweg kommt es zu einer Disinhibition durch zwei aufeinanderfolgende GABAerge Projektionen. Die GABAergen Neuronen des Striatum projizieren zunächst zum GPe, der seinerseits GABAerg mit dem STN verschaltet ist. Die Disinhibition des normalerweise tonisch inhibierten STN führt zu einer Verstärkung des vom STN an den GPi gesendeten, exzitatorischen Glutamatsignals. Dies führt dazu, dass der GPi eine noch stärkere Inhibition auf den Thalamus ausübt, dessen glutamaterge Projektion auf den Cortex somit nicht aktiviert wird. Das Ausbleiben des exzitatorischen Glutamatsignals unterdrückt folglich ungewollte Bewegungsabläufe. (Lanciego, Luquin, & Obeso 2012; Cenci, Jörntell, & Petersson 2018; Lee *et al.* 2016). Die Kontrolle und Modulierung des cortikalen motorischen Inputs erfolgt durch die SNpc über den Neurotransmitter Dopamin. Dieser kann im Striatum sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch wirken, abhängig davon, welchen Rezeptor die nachgeschalteten Neuronen exprimieren. Die Ausschüttung von Dopamin wirkt dabei aktivierend auf den direkten Signalweg und hemmend auf den indirekten.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die regulierende Funktion der Basalganglienschleife auf dem Prinzip der Disinhibition basiert, die entweder zu einer Verstärkung oder zu einer Aufhebung der im Ruhezustand vorliegenden tonischen Inhibition des Thalamus und somit des Cortex führt.

Bei Morbus Parkinson hingegen ist die regulierende Funktion der Basalganglienschleife durch die Dopaminverarmung gestört. Die genaue Ursache der dopaminergen Neurodegeneration innerhalb der SNc ist bis heute nicht bekannt, sie scheint aber in engem Zusammenhang mit in allen Krankheitsstadien auftretender Neuroinflammation

zu stehen. Der Dopaminmangel führt bei betroffenen Patienten zu Störungen in ihren Bewegungsabläufen, da der aktivierende, direkte Signalweg übermäßig gehemmt wird und die tonische Inhibition des Thalamus nicht mehr aufgehoben werden kann. Dies äußert sich in den Kardinalsymptomen Akinese (Bewegungsarmut), Rigor (Muskelsteifheit) und postulare Instabilität (Haltungsinstabilität, Gleichgewichtsstörung). Die bisher am häufigsten angewandte Therapie ist die medikamentöse Verabreichung des Dopaminvorläufers Levodopa (L-DOPA), der die Verfügbarkeit von Dopamin im Striatum steigern und somit der physiologischen Verarmung entgegenwirken soll. Langfristig führt die Verabreichung von L-DOPA jedoch zu starken Nebenwirkungen und die Krankheitsprogression kann lediglich verlangsamt, jedoch nicht aufgehalten werden.

Klinische Symptome treten erst auf, nachdem ca. 50 % der dopaminergen Neuronen abgestorben sind und der Verlust nicht mehr ausgeglichen werden kann, sodass ein offenbar vorhandener funktionaler Schwellenwert unterschritten wird (Fearnley & Lees, 1991; Cheng *et al.*, 2010). Der Krankheitsverlauf beginnt häufig bereits Jahre vor Eintritt der ersten erkennbaren Symptome. Diese Prodromalphase wird offenbar von bislang noch nicht eindeutig identifizierten Adaptions- bzw. Kompensationsmechanismen maskiert (Obeso *et al.*, 2004; Navntoft & Dreyer, 2016). Ein möglicher Kompensationsmechanismus ist die Dopaminsynthese durch serotonerge Neuronen (Brown & Gerfen, 2006). Sie exprimieren sowohl LAT1 zur Aufnahme des Dopaminprecursors L-DOPA, als auch das für die Metabolisierung zu Dopamin notwendigen Enzym AADC, wodurch die Dopaminsynthese, trotz des Absterbens der dopaminergen Neuronen, weiterhin möglich ist. Obwohl serotonerge Neuronen nur innerhalb der pränatalen Phase TH exprimieren, weisen einige Studien darauf hin, dass TH-positive und AADC-positive Neuronen, die selbst jeweils nur eines der beiden Enzyme exprimieren, miteinander interagieren und auf diese Weise ebenfalls in der Lage sind, Dopamin zu synthetisieren (Ugrumov *et al.*, 2004; Karasawa *et al.*, 2007). Serotonerge Neuronen können das synthetisierte Dopamin zwar über VMAT vesikulär speichern, das Dopaminsignal im synaptischen Spalt jedoch nicht beenden, da sie über keine Dopamintransporter zur Wiederaufnahme des Dopamins in die Präsynapse verfügen. Dies ist auch der Grund, weshalb die symptomale Therapie mit L-DOPA nur anschlägt, solange noch ausreichend dopaminerge Neuronen intakt sind, die die Dopaminkonzentration innerhalb des synaptischen Spalts regulieren und die externe

L-DOPA Zufuhr puffern können (Shin *et al.*, 2012). Ist dies bei weit fortgeschrittener dopaminerger Neurodegeneration nicht mehr der Fall, entwickeln die betroffenen Patienten vermehrt sog. L-DOPA-induzierte Dyskinesien, da die Zufuhr von zu viel Dopamin eine unverhältnismäßig starke Aktivierung des direkten Signalwegs auslöst.

1.2.2 Bildgebung des dopaminergen Systems

Die Bildgebung des dopaminergen Systems mit Hilfe der PET dient vorwiegend der Diagnose und dem Monitoring der in Kapitel 1.2.1 beschriebenen Dopaminverarmung von Parkinson-Patienten. Dabei können verschiedene Schnittstellen innerhalb des Dopaminstoffwechselweges adressiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten PET Tracer 6-[¹⁸F]FDOPA, 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]-FMT (vgl. Kapitel 1.4.1 und 1.4.2) visualisieren vorwiegend die AADC Aktivität im Striatum, also das Enzym, das Aminosäuren zu Aminen, also auch L-DOPA zu Dopamin verstoffwechselt (vgl. Abbildung 2) (Firnau *et al.*, 1973; Garnett *et al.*, 1983a; DeJesus *et al.*, 1990; Luxen *et al.*, 1992). Bei Parkinson-Patienten kann auf diese Weise die Reduktion der Dopaminsynthese in Form eines reduzierten Tracersignals innerhalb des nigrostriatalen Systems visualisiert werden.

Da Dopamin jedoch auch als Precursor für die Neurotransmitter Noradrenalin und Adrenalin fungiert und darüber hinaus nicht nur von dopaminergen, sondern auch von serotonergen Neuronen aufgenommen werden kann, ist die Differenzierung der von 6-[¹⁸F]FDOPA visualisierten Stoffwechselwege problematisch (Shin *et al.*, 2012). Auch [¹⁸F]FMT wird nicht ausschließlich von dopaminergen Neuronen aufgenommen, da auch andere monoaminerge Neuronen AADC exprimieren. Die genauen Anreicherungsmechanismen der Tracer sind auch Jahrzehnte nach ihrer Entwicklung nicht vollkommen aufgeklärt und sind daher auch Thema dieser Arbeit.

Der vermutete Zusammenhang von erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake und Neuroinflammation stellt bei der Bildgebung des Dopaminmetabolismus von Parkinson-Patienten ein besonderes Problem dar. Da Neuroinflammation bei Parkinson-Patienten häufig im nigrostriatalen System auftritt, also dort, wo man normalerweise ein reduziertes Traceruptake im Zuge der dopaminergen Degeneration erwarten würde (Vivekanantham

et al., 2015; Kaur *et al.*, 2017), bestünde die Gefahr, die Krankheitsprogression durch das inflammationsbedingte 6-¹⁸F]FDOPA Signal zu unterschätzen.

1.3 Neuroinflammation und Gliose – Immunantwort des zentralen Nervensystems

Die inflammatorische Immunantwort des Zentralnervensystems auf Pathogene, Toxine, mechanische Verletzungen oder Neurodegeneration wird allgemein als „Neuroinflammation“ bezeichnet (DiSabato, Quan & Godbout 2016). Dabei handelt es sich um ein komplexes Zusammenspiel zwischen den Immunzellen des zentralen Nervensystems und Zytokinen, den Botenstoffen, die die Neuroinflammation auf zellulärer Ebene regulieren. Sie sind in der Lage, sowohl neuroprotektive als auch neurodegenerative Wirkungskaskaden der Neuroinflammation auszulösen. Im Folgenden werden die verschiedenen an der inflammatorischen Immunantwort beteiligten Immunzellen sowie die wichtigsten Zytokine und ihre Funktion erläutert.

1.3.1 Mikroglia und Makrophagen

Mikrogliazellen gehören zur angeborenen Immunabwehr des Gehirns und sind sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz sowie im Rückenmark vorhanden (Lenz & Nelson, 2018). Dort fungieren sie als Modulatoren der inflammatorischen Immunantwort sowie als Mediator zwischen peripherer und zentraler Immunabwehr (Kim & Joh, 2006; Perry & Teeling, 2013). Mikrogliazellen sind in der Lage, selbst kleinste pathologische Veränderungen im ZNS zu detektieren. Dabei reagieren sie selbst auf kleinste Veränderungen der Homöostase und weisen eine ausgesprochen hohe Plastizität auf, die es ihnen ermöglicht, sich entsprechend der eingehenden pro- oder antiinflammatorischen Signale zu polarisieren und mit Phagozytose, Zytokinproduktion oder Antigen-Präsentation zu reagieren (Kim & Joh, 2006; Michell-Robinson *et al.*, 2015). Abbildung 6 zeigt eine Übersicht der wichtigsten in der Literatur beschriebenen Mikroglia-Phänotypen sowie die an der Mikrogliaaktivierung und -differenzierung beteiligten Signalmoleküle.

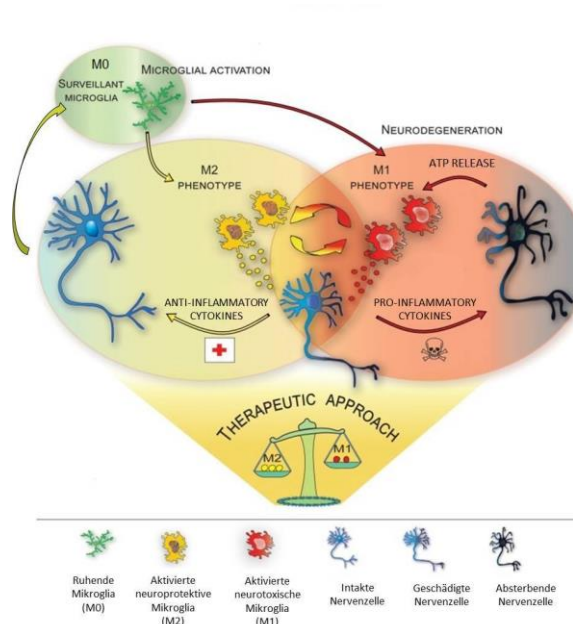


Abbildung 6: Schematische Darstellung der an der neuroinflammatorischen Immunantwort beteiligten Mikroglia-Phänotypen und ihrer Signalmoleküle (modifiziert nach Geloso *et al.*, 2017).

Im gesunden Gehirn liegen Mikrogliazellen in einem ruhenden Zustand mit ramifiziertem M0 Phänotyp vor. Dieser Zustand wird häufig als „nicht aktiviert“ bezeichnet (Fu *et al.*, 2014). Dies ist insofern irreführend, als dass auch ruhende Mikrogliazellen mit Hilfe ihrer zahlreichen Rezeptoren und Ausläufern fortwährend die Homöostase ihrer Umgebung kontrollieren und so beispielsweise auf die erhöhte ATP-Produktion von geschädigten Neuronen reagieren, indem sie z.B. Antigene zur Pathogenbekämpfung präsentieren (Orihuela *et al.*, 2016; Tang & Le, 2016). Detektieren Mikrogliazellen pathologische Veränderungen im ZNS, so gelangen sie vom ruhenden in den aktiven bzw. reaktiven Zustand, nehmen eine amöboide Form ein und immigrieren zum Ort der Schädigung (Russo & McGavern, 2015). Dort beseitigen sie geschädigtes Nervengewebe und Pathogene via Phagozytose (Fu *et al.*, 2014).

Aktivierte Mikrogliazellen ändern jedoch nicht nur ihren Phänotyp, sondern auch die Transkription ihrer Micro-DNA, die beispielsweise bestimmte Phagozytose fördernde oder neurotrophe Faktoren codiert (Ponomarev *et al.*, 2013). Auf diese Weise nehmen sie unmittelbar Einfluss auf den weiteren Verlauf und das Ausmaß der neuroinflammatorischen Immunantwort, indem sie selbst, abhängig von ihrem jeweiligen Phänotyp, pro- oder antiinflammatorische Signalmoleküle synthetisieren. Allgemein

wird zwischen dem M1- und M2-Phänotyp aktivierter Mikrogliazellen unterschieden. Der M1-Phänotyp wirkt immunstimulierend und ist assoziiert mit der Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine oder reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. TNF und IL-1 (Interleukin 1). Der M2-Phänotyp synthetisiert antiinflammatorische Signalmoleküle wie z.B. TGF- β oder IL-4 und wirkt somit neuroprotektiv (Geloso *et al.*, 2017). Er leitet die Regeneration von geschädigtem Nervengewebe und die Wiederherstellung der Homöostase ein.

Bei besonders starker oder langanhaltender Neuroinflammation sind Mikrogliazellen in der Lage, Monozyten aus der Peripherie zu rekrutieren. Sie wandern aus dem peripheren Blutkreislauf in das Gehirn ein und differenzieren sich dort zu Makrophagen, die die Mikrogliazellen temporär bei der Immunabwehr unterstützen (Zhou *et al.*, 2006). Sowohl Mikrogliazellen als auch Makrophagen können die zuvor beschriebenen Phänotypen annehmen und verfügen über die Fähigkeit, geschädigtes Gewebe durch Phagozytose zu beseitigen (Dey *et al.*, 2015). Beide Zellarten gehören somit zu dem sog. Mononukleären Phagozyten-System, bestehend aus den aus dem Knochenmark stammenden Vorläufern der Immunzellen, den im Blut zirkulierenden Monozyten und den bereits ins Gewebe eingewanderten, differenzierten Makrophagen (Hume, 2006). Die morphologische und funktionelle Unterscheidung von im Gehirn bereits ansässigen Mikrogliazellen und im Zuge einer Infektion eingewanderten Makrophagen ist bislang weder immunhistochemisch noch durch die PET möglich (London *et al.*, 2013). In der Literatur wird daher selten zwischen Mikroglia und Makrophagen differenziert, obwohl sie sich in ihrer Ontogenese deutlich unterscheiden. Im Gegensatz zu Mikrogliazellen entwickeln sich Makrophagen aus Monozyten, die von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden. Gelangen sie über den Blutkreislauf in Kontakt mit Infektionen, so differenzieren sie sich zu Makrophagen, die in das infizierte Gewebeareal einwandern (van Furth & Cohn, 1968; Perdiguero & Geissmann, 2016). Auch wenn der Ursprung der Mikrogliapopulation im Gehirn noch nicht vollständig erforscht ist, so wird weitgehend angenommen, dass sich Mikrogliazellen während der Embryogenese entwickeln und als amöboide Vorläuferzellen aus dem Dottersack in das ZNS einwandern. Erst danach nehmen sie ihren charakteristischen ramifizierten Phänotyp ein und übernehmen, komplementär zu den Makrophagen in der Peripherie, ihre Funktion als Immunzellen des ZNS (Ginhoux *et al.*, 2013).

Aktiviert Mikrogliazellen oder Makrophagen wirken dabei nie ausschließlich neuroprotektiv oder neurodegenerativ. Bei der Bekämpfung von Pathogenen oder dem Abbau von bereits zerstörtem neuronalem Gewebe wird zwar häufig auch gesundes Nervengewebe beschädigt, dies stellt jedoch sicher, dass der Ursprung der Schädigung zuverlässig und großflächig eliminiert wird. Gleichzeitig wird durch den phagozytären Abbau verhindert, dass geschädigte Nervenzellen fortlaufend proinflammatorische Signale an die Umgebung abgeben und weitere Mikrogliazellen oder Makrophagen rekrutieren, die die Immunabwehr weiter verstärken. Stattdessen werden zunehmend antiinflammatorische Signalmoleküle ausgeschüttet (Geloso *et al.*, 2017). Auf diese Weise modulieren Mikrogliazellen im gesunden Gehirn Art, Ausmaß und Verlauf der Immunreaktion. Besteht jedoch eine chronische Entzündung, beispielsweise im Zuge von neurodegenerativen Erkrankungen, so treibt der M1-Phänotyp die Neuroinflammation immer weiter voran. Das sensible Gleichgewicht aus Neuroprotektion und Neurodegeneration wird gestört und die Mechanismen zur Selbstregulierung ausgehebelt (Cherry *et al.*, 2014).

Diese hohe Anzahl der beteiligten Faktoren verdeutlicht die Komplexität der neuroinflammatorischen Immunantwort im ZNS, welche darüber hinaus stark von Art und Ursache der Schädigung abhängig ist. Michell-Robinson *et al.* weisen darauf hin, dass es, neben den klassischen M1- und M2-Phänotypen weitere krankheitsspezifische Phänotypen gibt, die möglicherweise anhand ihrer spezifischen mircoRNA- und Zytokin-Profile unterscheidbar sind. Die Entwicklung und Evaluation neuer TSPO-Liganden ist daher unbedingt notwendig, um die zugrundeliegenden krankheitsspezifischen Pathomechanismen und die ambivalente Rolle von Neuroinflammation bei der Bekämpfung und Progression von neurologischen Erkrankungen besser zu verstehen. Nur so lassen sich langfristig neue biologische Targets zur differenzierten Diagnose und spezifischen Therapie identifizieren. Die verschiedenen TSPO-Polymorphismen sind solche Targets für die Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen (Michell-Robinson *et al.*, 2015). Die Entwicklung von neuen, noch selektiveren TSPO-Liganden könnte die Differenzierung von verschiedenen mit Neuroinflammation assoziierten Pathologien erleichtern. Die Funktion von TSPO sowie die Eigenschaften der in dieser Arbeit getesteten TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 werden in Kapitel 1.5 näher erläutert.

1.3.2 Astroglia

Ein weiterer Zelltyp, der an der Aufrechterhaltung der Homöostase und der neuroinflammatorischen Immunantwort beteiligt ist, ist die Astroglia. Astrogliazellen (Astrozyten) wurde lange Zeit eine ausschließlich passive Rolle innerhalb des ZNS zugeschrieben. Neuere Studien zeigen jedoch die komplexen Signalmechanismen zwischen Astroglia, Mikroglia und Neuronen (Bélanger & Magistretti, 2009; Giaume *et al.*, 2010). Astrozyten sind beispielsweise an der Freisetzung und Wiederaufnahme von Transmittern beteiligt und reagieren sowohl bei mechanischer Schädigung als auch bei Erkrankungen des Gehirns mit Astrogliose (Verkhratsky *et al.*, 2016). In dieser reaktiven Form unterlaufen Astrozyten einige strukturelle und funktionelle Veränderungen, die stark von der Art und dem Grad der Schädigung abhängen (Sofroniew, 2009) (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 8).

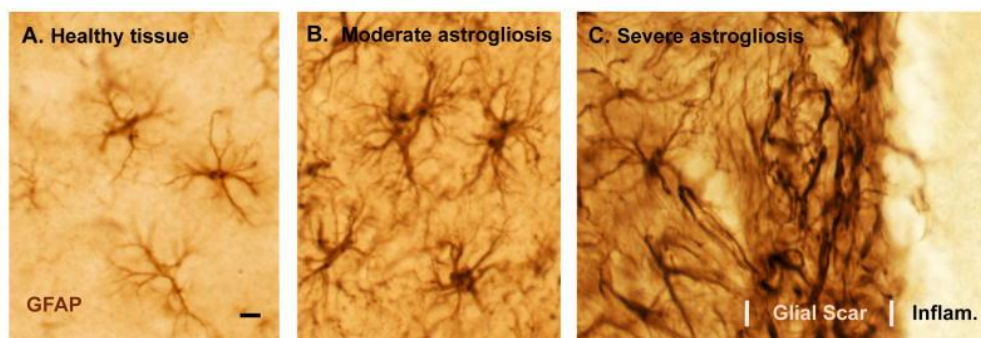


Abbildung 7: Verschiedene Stadien der reaktiven Astrogliose im Vergleich zu Astrozyten im gesunden Gehirn (Sofroniew, 2009).

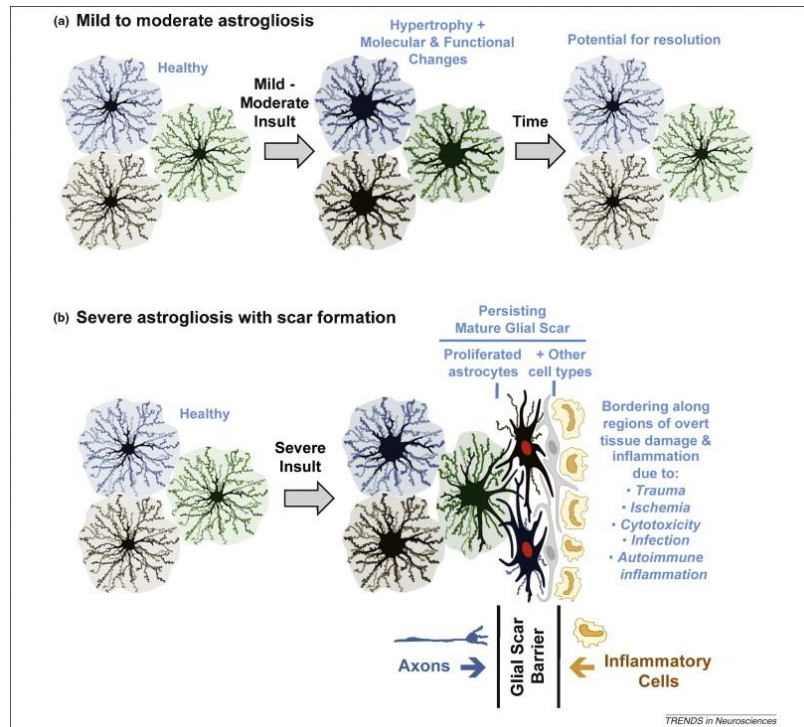


Abbildung 8: Heterogenität reaktiver Astroglieose (Sofroniew, 2009).

(a) Bei moderater neuronaler Schädigung schütten reaktive Astrozyten, ebenso wie Mikroglia oder Makrophagen, pro- und antiinflammatorische Zytokine aus, die entweder die Regeneration oder Degeneration der betroffenen Areale unterstützen. (b) Bei starker neuronaler Schädigung lagern sie sich gemeinsam mit Mikrogliazellen und einigen weiteren Zelltypen des ZNS am Ort der Schädigung an und bilden die sog. Glianarbe. Dabei handelt es sich um eine physikalische Barriere für proinflammatorische Signalmoleküle, aber auch für trophische- und Wachstumsfaktoren. Die Glianarbe sorgt damit für eine Eindämmung der Inflammation, behindert aber auch die Regeneration des Nervengewebes.

Bei der Formierung der sog. Glianarbe kommt es zu einer starken Proliferierung der Astrozyten. Sie exprimieren vermehrt das Intermediärfilament GFAP (Saures Gliafaserprotein, engl. Glial fibrillary acidic protein), um ein Zytoskelett auszubilden, das die Läsion versiegelt (Anderson *et al.*, 2014). Auf diese Weise werden eine Infektion und die weitere Ausbreitung der Schädigung verhindert. Die physikalische Barriere hält jedoch nicht nur proinflammatorische Signale zurück und unterbindet so, dass die Neuroinflammation durch die weitere Rekrutierung von Astro- und Mikrogliazellen verstärkt wird, sondern sie schottet die Region auch von trophischen Faktoren ab und verhindert so die Regenerierung von neuronalem Gewebe. Dies ist z.B. auch einer der Gründe, wieso das Rückenmark nach Durchtrennung niemals vollständig regeneriert (Shen *et al.*, 2014; Orr & Gensel, 2018).

Eine weitere Funktion von Astrozyten ist die Modulation der synaptischen Transmission. Sie sind in der Lage, Transmitter aus dem synaptischen Spalt aufzunehmen, sie auf diese

Weise zu deaktivieren oder für die erneute Ausschüttung bereitzustellen. Lange Zeit nahm man an, Astrozyten nähmen selbst keinen Einfluss auf die neuronale Signalweiterleitung und seien, im Unterschied zu Neuronen, nicht erregbar. Neuere Studien zeigten jedoch die bidirektionale Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen (Verkhatsky *et al.*, 2016; Manninen *et al.*, 2018). Astrozyten können über ihre Glutamatrezeptoren die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt detektieren und darauf mit einer gesteigerten oder verringerten Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt reagieren. Zum anderen hat die Bindung von Glutamat Einfluss auf die intrazellulären Ca^{2+} Konzentration (Ca^{2+i}) von Astrozyten (Jabs *et al.*, 1994). Dies hat wiederum Einfluss auf calciumabhängige Ionenkanäle (z.B. für K^+ und Na^+) und somit auf die extrazelluläre Homöostase (Porter & McCarthy, 1996; Fellin & Carmignoto, 2004). Über Glutamat und die glutamatgesteuerte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration können Astrozyten folglich die gerade ablaufende neuronale Aktivität detektieren. Darüber hinaus können sie diese neuronale Aktivität auch modulieren, indem sie das zuvor aufgenommene Glutamat wieder ausschütten (Malarkey & Parpura, 2008). Glutamat fungiert demnach als eine Art Gliotransmitter, der nicht nur die Kommunikation zwischen Neuronen und Astrozyten, sondern auch die weitreichende Kommunikation zwischen Astrozyten untereinander ermöglicht (Parpura & Verkhatsky, 2012).

Darüber hinaus können Astrozyten auch einen erheblichen Einfluss auf den Dopaminmetabolismus nehmen. Sie sind beispielsweise am Abbau von Dopamin beteiligt, da das Enzym MAO (vgl. Kapitel 1.2) vor allem in der äußeren Mitochondrienmembran von Astrozyten exprimiert wird (Bortolato & Shih, 2011). Zum anderen verfügen sie über LAT1, über die sie Dopamin aus dem synaptischen Spalt aufnehmen und so Einfluss auf die Signalweiterleitung nehmen können (Asanuma *et al.*, 2014).

Astrozyten modulieren jedoch nicht nur die Signalweiterleitung von Neuronen, sondern versorgen sie darüber hinaus mit Nährstoffen aus dem peripheren Blutstrom. Zusammen mit den Endothelzellen, die die Kapillaren des Gehirns ummanteln, bilden sie die Blut-Hirn-Schranke (Cabezas *et al.*, 2014). Die Blut-Hirn-Schranke sorgt für einen ausschließlich selektiven und gerichteten Stoffaustausch zwischen Peripherie und Zentralnervensystem. Astrozyten sind für diese Arbeit daher nicht nur bezüglich der

neuroinflammatorischen Immunantwort relevant, sondern auch bezüglich der Traceraufnahme und deren Abbau. Im Folgenden wird die Funktion der Astroglia im Gefüge der Blut-Hirn-Schranke erläutert.

1.3.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke ist eine physiologische Barriere zwischen dem peripheren Blutkreislauf und dem Zentralnervensystem, die aus Endothelzellen und Astrozyten besteht (vgl. Abbildung 9).

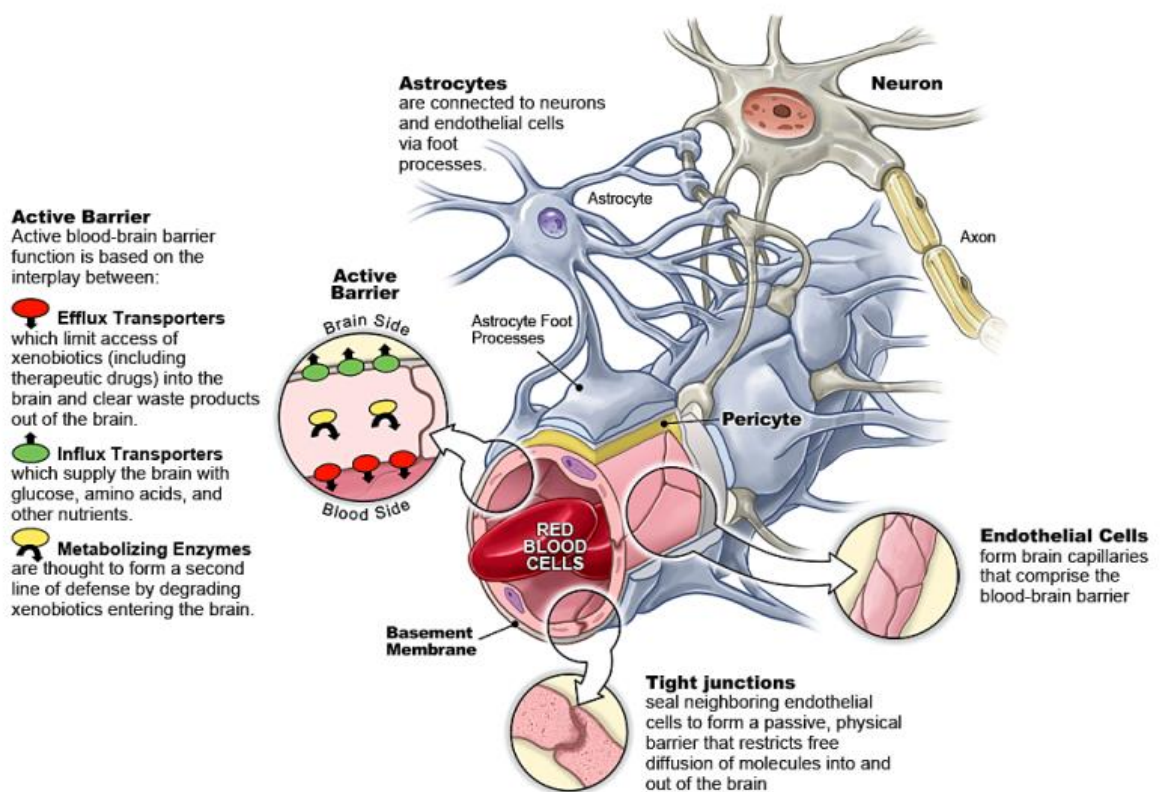


Abbildung 9: Aufbau der Blut-Hirn-Schranke. Verknüpfung von Astrozyten, Neuronen und Kapillaren (entnommen aus: <http://www.bauerhartzlab.com/research/blood-brain-barrier>, am 10.07.18).

Astrozyten bilden sternförmige Fortsätze aus, deren plattenförmige Endfüße sich an der Grenzmembran der zerebralen Kapillaren (Basallamina) anlagern, Moleküle aus dem Blut aufnehmen und an die Neuronen weiterleiten (Kim *et al.*, 2006). Die zerebralen Kapillaren setzen sich wiederum aus Endothelzellen zusammen, die über Tight Junctions verbunden sind. Diese verhindern den passiven Transport kleiner polarer Moleküle und halten so die Barrierefunktion aufrecht (Daneman & Prat, 2015). Auf der abluminalen

Seite der Endothelzellen liegen Perizyten, kontraktionsfähige Bindegewebszellen, die die Kapillaren stabilisieren und durch Kontraktion den Kapillardurchmesser verändern können (Bechmann *et al.*, 2007). Zwischen der Basallamina der Endothelzellen und den astrozytären Endknöpfen befindet sich der sog. perivaskuläre Raum. Nährstoffe und Signalmoleküle aus dem peripheren Blutstrom werden zunächst selektiv über Transporter in den perivaskulären Raum (Virchow-Robin-Raum) abgegeben, dort wiederum von den Transportern der Astrozyten aufgenommen und zielgerichtet an die Nervenzellen weitergeleitet. Umgekehrt werden z.B. toxische Metabolite oder Pathogene in den perivaskulären Raum abgegeben, von wo sie über die Transporter der Endothelzellen in den Blutstrom und die Peripherie gelangen und dort abgebaut werden können (Bechmann *et al.*, 2007).

Es gibt verschiedene Transportwege, mittels derer die Nährstoffe oder Signalmoleküle über die Blut-Hirn-Schranke gelangen können (vgl. Abbildung 10). Die Tight Junctions zwischen den Endothelzellen verhindern den passiven, parazellulären Transport von wasserlöslichen Stoffen (einschließlich polarer Tracer oder Medikamente) und sorgen dafür, dass die meisten Transportwege transzellulär und somit selektiv über Transportproteine, Rezeptoren oder Ionenkanäle führen und von diesen reguliert werden (Abbott *et al.*, 2006; Abadier & Lyck, 2017). Ausschließlich lipophile oder gasförmige Moleküle wie beispielsweise O₂ und CO₂ können frei durch die Membran diffundieren (vgl. Abbildung 10, 2.). Der Transport von Wasser erfolgt über das Transportprotein Aquaporin oder, wenn auch nur sehr begrenzt, über die Tight Junctions selbst. Hydrophile Moleküle werden zum einen über rezeptorvermittelte oder adsorptive Transzytose (vgl. Abbildung 10, 4. und 5.) zum anderen mit Hilfe von sog. Carrierproteinen über die Blut-Hirn-Schranke transportiert (vgl. Abbildung 10, 3.) (Abbott *et al.*, 2006; Abadier & Lyck, 2017). Der Transport von Glucose erfolgt dabei beispielsweise über das GLUT1 Carrierprotein, der Transport von großen neutralen L-Aminosäuren über LAT1 (Abbott *et al.*, 2006). Die Funktion des LAT1-Transporters ist für diese Arbeit von besonderem Interesse, da die zerebrale Aufnahme der verwendeten Aminosäure-Tracer 6-[¹⁸F]FDOPA, [¹⁸F]FMT und [¹⁸F]FET maßgeblich von LAT1 reguliert wird. Die LAT1 Funktion wird daher an späterer Stelle noch einmal gesondert beschrieben (vgl. Kapitel 1.4.3).

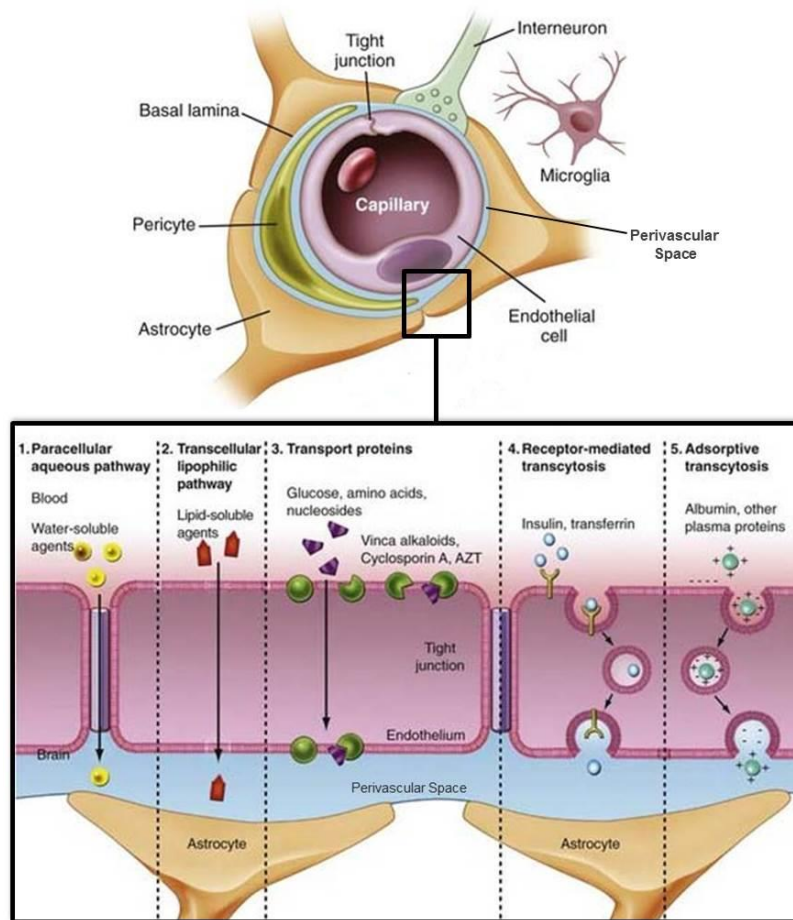


Abbildung 10: Schematisierte Detailansicht der Blut-Hirn-Schranke und der dort vorliegenden Transportmechanismen.

Der Stoffaustausch zwischen dem Lumen der Endothelzellen und den Astrozyten erfolgt über den perivaskulären Raum (Virchow-Robin-Raum). Über verschiedene Transportwege (1. - 5.) werden Nährstoffe oder Signalmoleküle aus dem Blut durch die Endothelzellen in den perivaskulären Raum transportiert. Von dort aus werden sie von den Transportern der Astrozyten (in Abbildung 10 nicht dargestellt) aufgenommen und an die Neuronen weitergeleitet. (entnommen und modifiziert aus: <https://neupsykey.com/blood-brain-barrier/>, am 10.07.18).

1.4 Aminosäure-Tracer

Die in dieser Arbeit verwendeten Tracer zur Bildgebung des dopaminergen Systems sind radiofluorierte Derivate aromatischer Aminosäuren. Sie werden über spezielle L-Aminosäure-Transporter (LAT), die in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke exprimiert werden, in das Gehirn aufgenommen (vgl. Kapitel 1.3.3). Die verwendeten Tracer gehen in den Aminosäurestoffwechsel ein und werden dort, analog zu den als Transmitter fungierenden Monoaminen Dopamin, Serotonin und Adrenalin, durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) verstoffwechselt. Auf diese

Weise bilden die radiofluorierten aromatischen Aminosäuren die AADC Aktivität und somit auch den funktionellen Status des zu untersuchenden Transmittersystems ab. In dieser Arbeit wurden die radiomarkierten Aminosäuren 3,4-Dihydroxy-6- ^{18}F -fluor-L-phenylalanin (6- ^{18}F FDOPA), *O*-(2- ^{18}F Fluorethyl)-L-tyrosin (^{18}F FET) und 5 und 6- ^{18}F Fluor-L-m-tyrosin (5- und 6- ^{18}F FMT) verwendet, deren Eigenschaften im Folgenden vorgestellt werden.

1.4.1 6- ^{18}F FDOPA

Bei 3,4-Dihydroxy-6- ^{18}F -fluor-L-phenylalanin (6- ^{18}F FDOPA) handelt es sich um ein Analogon des Dopaminvorläufers 3,4-L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) (vgl. Kapitel 1.2), das in Position 6 des aromatischen Rings mit ^{18}F markiert wird (vgl. Abbildung 11) (Firnau *et al.*, 1973; Leung, 2004).

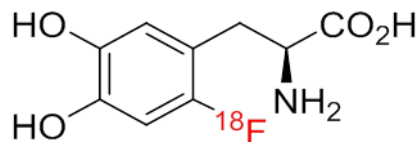


Abbildung 11: Strukturformel von 6- ^{18}F FDOPA.

6- ^{18}F FDOPA wurde Anfang der 70er Jahre von Firnau *et al.* entwickelt und war der erste Tracer, der die Bildgebung des Dopaminmetabolismus *in vivo* ermöglichte (Firnau *et al.*, 1973; Garnett *et al.*, 1983b). In der Vergangenheit erwies sich 6- ^{18}F FDOPA somit zunächst als wichtiges Diagnose- und Behandlungstool für die Parkinsonerkrankung (Kumakura & Cumming, 2009).

Die Metabolisierung von 6- ^{18}F FDOPA erfolgt analog zu der von L-DOPA (vgl. Kapitel 1.2., Abbildung 2) (The MICAD Research Team 2004). Nach intravenöser Injektion wird 6- ^{18}F FDOPA über die LAT1 der Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn aufgenommen und von AADC zu radiofluorisiertem Dopamin (6- ^{18}F FDA) dekarboxyliert. 6- ^{18}F FDA wird in den dopaminergen präsynaptischen Terminalien innerhalb des Striatum vesikulär gespeichert und so vor der weiteren Verstoffwechslung geschützt, bis es zur neuronalen Signalweiterleitung in den synaptischen Spalt ausgeschüttet wird (vgl. Abbildung 13) (Melega *et al.*, 1991). Das vesikuläre Trapping in

den präsynaptischen dopaminergen Terminalien des Striatum kann mit Hilfe der 6-[¹⁸F]FDOPA PET abgebildet werden (Leung, 2004). Eine Reduktion des striatalen 6-[¹⁸F]FDOPA Signals ermöglicht somit die Visualisierung der dopaminergen Neurodegeneration und die damit einhergehende Dopaminverarmung im Striatum bei Parkinson-Patienten.

Ein Nachteil von 6-[¹⁸F]FDOPA ist die starke periphere Verstoffwechslung (Kumakura & Cumming, 2009; Becker *et al.*, 2017). Wird 6-[¹⁸F]FDOPA bereits in der Peripherie zu 6-[¹⁸F]FDA verstoffwechselt, kann es die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr passieren, da Dopamin nicht hirngängig ist (Pardridge & Oldendorf, 1975; Reith *et al.*, 1990; Laterra *et al.*, 1999). Um die periphere Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FDOPA möglichst gering zu halten und die Hirngängigkeit des Tracers zu gewährleisten, werden in der klinischen Anwendung Inhibitoren wie z.B. Entacapone oder Carbidopa eingesetzt, die die 6-[¹⁸F]FDOPA Methylierung durch COMT und die Decarboxylierung durch AADC peripher inhibieren und so die 6-[¹⁸F]FDOPA Verfügbarkeit im Gehirn erhöhen (Männistö & Kaakkola, 1999; Bonifácio *et al.*, 2007).

Da die Inhibitoren bei richtiger Dosierung selbst nicht hirngängig sind, können die aromatischen Aminosäure-Tracer, sobald sie die Blut-Hirn-Schranke überquert haben, ungehindert zu Dopamin weiterverstoffwechselt werden (Jonkers *et al.*, 2001; Schapira, 2007). Die schlechte Hirngängigkeit von Dopamin ist auch der Grund, weshalb zur symptomalen Behandlung der progressiven Dopaminverarmung von Parkinson-Patienten nicht Dopamin selbst, sondern der Dopaminvorläufer L-DOPA als Kombinationspräparat mit COMT und AADC Inhibitoren verabreicht wird. In dieser Arbeit wurde ausschließlich der AADC Inhibitor Benserazid verwendet, um 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]FMT unter gleichen Bedingungen zu testen und die bessere Vergleichbarkeit der Daten mit alten Studien zu gewährleisten, da in der Arbeitsgruppe Benserazid zur Hemmung der AADC Aktivität etabliert war. Auf die Verabreichung eines COMT Inhibitors wurde verzichtet, da auf diese Weise getestet werden konnte, wie groß der Einfluss der COMT auf die Verstoffwechslung und die damit einhergehende Qualität der entstehenden PET Bilder ist. Dies erfolgte, indem die PET Messungen mit 6-[¹⁸F]FDOPA (ein Catecholamin und somit Substrat für COMT) mit PET Messungen verglichen wurden, die mit 5- und 6-[¹⁸F]FMT (keine Catecholamine) erfolgten.

In dieser Arbeit diente 6-[¹⁸F]FDOPA nicht nur als diagnostisches Tool, sondern es wurden vor allem die Anreicherungsmechanismen von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation im Hemiparkinsonmodell untersucht (vgl. Kapitel 2.3). Im weiteren Verlauf der Arbeit diente 6-[¹⁸F]FDOPA als Referenztracer für die Evaluation der ebenfalls zur Visualisierung des Dopaminmetabolismus eingesetzten Tracer 5- und 6-[¹⁸F]FMT im gesunden Versuchstier.

1.4.2 5- und 6-[¹⁸F]FMT

Aufgrund der in Kapitel 1.4.1 beschriebenen Limitierungen des aromatischen Aminosäure-Tracers 6-[¹⁸F]FDOPA, haben DeJesus *et al.* mit 6-[¹⁸F]Fluor-L-m-tyrosin (6-[¹⁸F]FMT) eine Alternative zu 6-[¹⁸F]FDOPA entwickelt, die einer geringeren peripheren Verstoffwechslung unterliegt und somit eine höhere Tracerverfügbarkeit im Gehirn gewährleistet (DeJesus *et al.*, 1990). Bei 6-[¹⁸F]FMT handelt es sich um ein radiofluoriertes m-Tyrosin Derivat, bei dem die Markierung mit ¹⁸F in 6-Position des aromatischen Rings erfolgt. 5-[¹⁸F]FMT wird hingegen in 5-Position des aromatischen Rings mit ¹⁸F markiert. 5- und 6-[¹⁸F]FMT sind ebenso wie 6-[¹⁸F]FDOPA in der Lage, die Aktivität der Aromatischen-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) zu visualisieren (vgl. Kapitel 1.2). Insgesamt unterliegt [¹⁸F]FMT jedoch einem geringeren enzymatischen Abbau, was gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA einige Vorteile bietet. Im Unterschied zu 6-[¹⁸F]FDOPA weist [¹⁸F]FMT keine Catecholstruktur auf und ist somit kein Substrat für die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Es unterliegt daher nur dem enzymatischen Abbau der Enzyme AADC und Monoaminoxidase (MAO) und wird nicht zusätzliche durch COMT verstoffwechselt (DeJesus *et al.*, 1990; The MICAD Research Team, 2004). Dies führt dazu, dass das striatale PET Signal nicht im gleichen Ausmaß durch die Bildung von ebenfalls radiofluorierten Metaboliten gestört wird, wie dies bei 6-[¹⁸F]FDOPA der Fall ist. Abbildung 12 zeigt die Strukturformeln von 5- und 6-[¹⁸F]FMT.

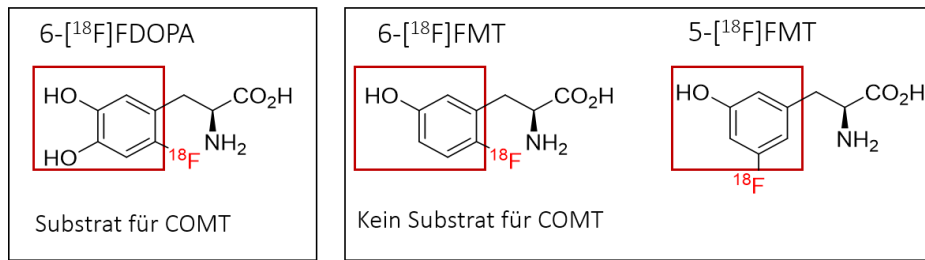


Abbildung 12: Strukturformeln von 6-[¹⁸F]FMT und 5-[¹⁸F]FMT.

Dargestellt ist 6-[¹⁸F]FDOPA (links), das aufgrund seiner Catecholstruktur ein Substrat für das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) ist. 5- und 6-[¹⁸F]FMT (rechts) weisen keine Catecholstruktur auf und werden deshalb nicht von COMT methyliert.

Abbildung 13 stellt die Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA in der Peripherie und im Gehirn gegenüber. Es handelt sich hierbei um eine vereinfachte Darstellung der verschiedenen Stoffwechselwege. Auf die Darstellung des Enzyms Phenylsulfattransferase (PST) wurde verzichtet, da die entstehenden Sulfokonjugate sowohl peripher als auch intrazerebral in nur sehr geringer Konzentration nachgewiesen werden konnten und daher in dieser Arbeit nicht berücksichtigt wurden (DeJesus *et al.*, 1997a). Da 5-[¹⁸F]FMT in dieser Arbeit zum ersten Mal präklinisch eingesetzt wurde, ist die genaue Metabolisierung noch unbekannt. In Abbildung 12 ist daher lediglich die Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT dargestellt. Bei der Darstellung der Stoffwechselwege wurden ausschließlich die Abkürzungen und Trivialnamen der Radioaminoaciden und ihrer Radiometaboliten verwendet. Die Benennung nach IUPAC Nomenklatur ist im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt.

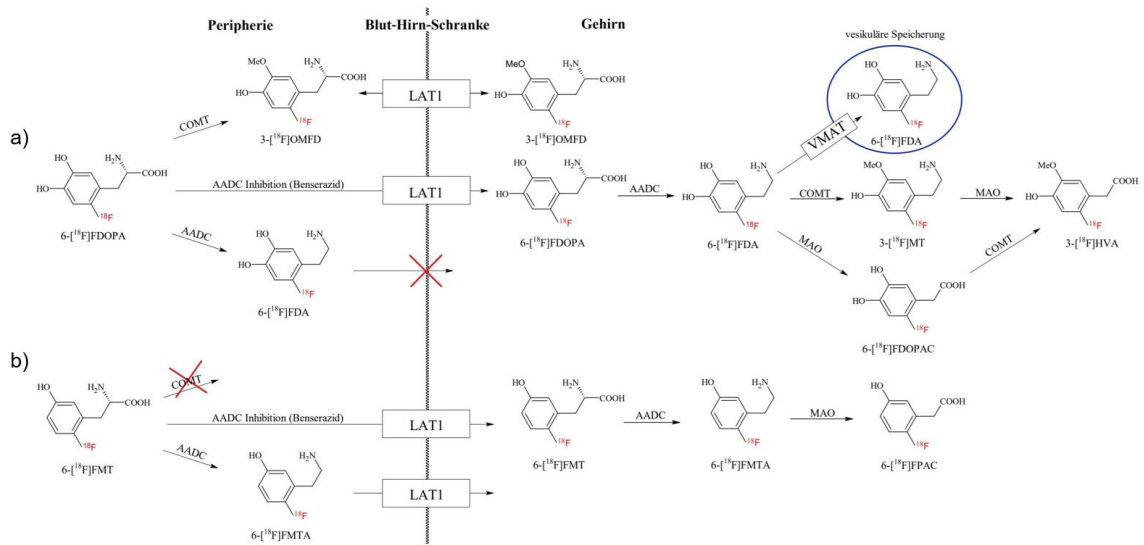


Abbildung 13: Vereinfachte Darstellung der peripheren und intrazerebralen Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT nach Inhibition der Aromatischen-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) durch Benserazid und bei ausbleibender AADC Inhibition (modifiziert nach O. T. DeJesus *et al.* 1997).

(a) 6-[¹⁸F]FDOPA Metabolismus. (b) 6-[¹⁸F]FMT Metabolismus.

6-[¹⁸F]FDOPA (vgl. Abbildung 13a) wird aufgrund seiner Catecholstruktur peripher nicht nur durch die Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC) decarboxyliert, sondern auch von dem Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) methyliert. Durch die Methylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA entsteht der bidirektional hirngängige Metabolit 6-[¹⁸F]Fluor-3-O-methylDOPA (3-[¹⁸F]OMFD), der sich diffus im Gehirn verteilt und zu einer hohen Backgroundaktivität führt (Melega *et al.*, 1991). Ohne die Verabreichung eines AADC Inhibitors wie Benserazid, würde 6-[¹⁸F]FDOPA bereits in der Peripherie überwiegend zu 6-[¹⁸F]Fluordopamin (6-[¹⁸F]FDA) decarboxyliert, welches nicht hirngängig ist (Doudet *et al.*, 1999). Durch die Verabreichung von Benserazid wird die Decarboxylierung jedoch verhindert, sodass 6-[¹⁸F]FDOPA durch LAT1 über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn gelangen kann (Melega *et al.*, 1991). Da Benserazid in der richtigen Dosierung selbst nicht hirngängig ist, unterbindet es die Decarboxylierung nur peripher (Jonkers *et al.*, 2001; Schapira, 2007). Im Gehirn wird 6-[¹⁸F]FDOPA zu 6-[¹⁸F]FDA decarboxyliert, das dann über den vesikulären Monoamintransporter (VMAT) in Vesikel aufgenommen und dort vor weiterem enzymatischem Abbau geschützt wird (DeJesus *et al.*, 1990). Die vesikuläre Speicherung erfolgt in den intakten dopaminergen Terminalien des Striatum, wodurch das 6-[¹⁸F]FDA PET Signal die

dopaminerge Integrität widerspiegelt. Nicht gespeichertes 6-[¹⁸F]FDA wird entweder von COMT methyliert oder durch das Enzym Monoaminoxidase (MAO) oxidiert (DeJesus *et al.*, 1990). Dies verursacht die Bildung der Metaboliten 6-[¹⁸F]Fluor-3-methoxytyramin (3-[¹⁸F]MT), 6-[¹⁸F]Fluor-dihydroxyphenylelessigsäure (6-[¹⁸F]FDOPAC) und 6-[¹⁸F]Fluor-3-O-methyl-homovanillinsäure (3-[¹⁸F]HVA), die sich diffus im Gehirn verteilen und dadurch das striatale 6-[¹⁸F]FDA Signal stören (Doudet *et al.*, 1999).

6-[¹⁸F]FMT ist im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA kein Substrat für COMT und wird daher peripher nur über AADC verstoffwechselt (Doudet *et al.*, 1999). Benserazid verhindert jedoch die periphere Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]FMT, sodass es erst im Gehirn von AADC zu 6-[¹⁸F]Fluor-m-tyramin (6-[¹⁸F]FMTA) decarboxyliert wird. Ohne AADC Inhibition wird 6-[¹⁸F]FMT bereits peripher zu 6-[¹⁸F]FMTA decarboxyliert, das im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDA hirngängig ist und über LAT1 in das Gehirn aufgenommen wird (Männistö & Kaakkola, 1999; Bonifácio *et al.*, 2007). Im Unterschied zu 6-[¹⁸F]FDA weist 6-[¹⁸F]FMTA eine geringe Affinität zu VMAT auf und wird daher nicht in präsynaptische Vesikel aufgenommen (Doudet *et al.*, 1999). Folglich wird es im Unterschied zu 6-[¹⁸F]FDA nicht vor enzymatischem Abbau geschützt und deshalb unmittelbar über MAO zu 6-[¹⁸F]Fluor-hydroxyphenylelessigsäure (6-[¹⁸F]FPAC) oxidiert (DeJesus *et al.*, 1997a). Die Visualisierung der dopaminergen Integrität bei der Verstoffwechslung von 6-[¹⁸F]FMT basiert folglich vor allem auf der Visualisierung der enzymatischen Aktivität. 6-[¹⁸F]FDOPA bildet darüber hinaus auch den effektiven Dopaminturnover, die Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt bzw. die Wiederaufnahme in die Präsynapse ab (Doudet *et al.* 1999; Leung 2004; Endres 2004; The MICAD Research Team). Da 6-[¹⁸F]FMT jedoch eine höhere metabolische Stabilität aufweist, werden weniger Metaboliten gebildet, die das PET Signal stören, was der entscheidende Vorteil von 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA ist (Honer *et al.*, 2006).

Bisher wurden drei Isomere von [¹⁸F]FMT synthetisiert und getestet: 2-, 4-, und 6-[¹⁸F]FMT (Melega *et al.*, 1989; DeJesus *et al.*, 1990, 1995; Gilbert *et al.*, 1995). Da das Isomer 6-[¹⁸F]FMT auf Basis der bisher durchgeführten Studien als der für die Visualisierung des Dopaminmetabolismus am besten geeignete PET Tracer eingestuft werden kann (Barrio *et al.*, 1996; DeJesus *et al.*, 1997a), wurde (neben 6-[¹⁸F]FDOPA) 6-[¹⁸F]FMT als Referenztracer für die Evaluation des in dieser Arbeit erstmals *in vivo*

getesteten 5- ^{18}F]FMT verwendet. Im Gegensatz zu dem von DeJesus *et al.* entwickelten 6- ^{18}F]FMT, wurde das von den Radiochemikern des INM-5 synthetisierte 5- und 6- ^{18}F]FMT nach der von Zlatopolskiy *et al.* entwickelte Methode der Nickel-vermittelten Radiofluorierung hergestellt (Zlatopolskiy *et al.* 2015).

Die in dieser Arbeit verwendeten PET Tracer 6- ^{18}F]FDOPA, 5- und 6- ^{18}F]FMT sind in der Lage, das dopaminerge System und die dopaminerge Integrität zu testen. Diese Visualisierung basiert jedoch auf verschiedenen Anreicherungsmechanismen und zeigt aufgrund der unterschiedlichen Metabolisierung nicht exakt das gleiche Signal in der PET (Doudet *et al.* 1999; Leung 2004; Endres 2004; The MICAD Research Team). Die Frage nach den zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen, welche Metaboliten bei der Bildgebung mit 6- ^{18}F]FDOPA 5- ^{18}F]FMT und 6- ^{18}F]FMT erfasst werden und welcher Tracer sich aufgrund dieser Mechanismen am besten für die neuronale Bildgebung eignet, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.4.3 ^{18}F]FET

O-(2- ^{18}F]Fluorethyl)-L-tyrosin (^{18}F]FET) ist eine Radioaminoäure, die in der Onkologie für die Detektion und Klassifikation von Tumoren verwendet wird. Da Tumorzellen einer höheren Proliferation unterliegen, weisen sie einen höheren Bedarf an Aminosäuren für die Proteinbiosynthese auf (Fueger *et al.*, 2010). Sowohl die Aufnahme von ^{18}F]FET in Tumorzellen als auch ihr Transport über die Blut-Hirn-Schranke erfolgt vorwiegend über LAT1 (vgl. Kapitel 1.3.3). Da eine hohe Korrelation zwischen LAT1 Expression und FET-Aufnahme besteht (Habermeier *et al.*, 2015), wurde ^{18}F]FET in dieser Arbeit zur Visualisierung der LAT1-Aktivität eingesetzt. Über die Regulierung der LAT1 Expression ist bisher nur wenig bekannt. Verschiedene Studien deuten jedoch darauf hin, dass sie sich nach dem Aminosäurebedarf der Zielstruktur richtet (Roberts *et al.*, 2008; Geier *et al.*, 2013) und durch Cholesterin moduliert werden kann (Dickens *et al.*, 2017). Darüber hinaus erlaubt ^{18}F]FET eine Differenzierung von Tumorgewebe und Neuroinflammation, da sich ^{18}F]FET nur geringfügig in Mikroglia und Makrophagen anreichert (Dunet *et al.* 2012). Da ^{18}F]FDOPA wie ^{18}F]FET über LAT1 aufgenommen wird, lässt sich anhand des Vergleichs der ^{18}F]FET und ^{18}F]FDOPA PET Messungen feststellen, ob die Anreicherung von ^{18}F]FDOPA in entzündeten Arealen mit einem erhöhten Aminosäuretransport über die

Blut-Hirn-Schranke zusammenhängt. Abbildung 14 zeigt die Strukturformel von [¹⁸F]FET.

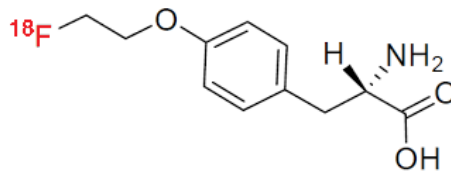


Abbildung 14: Strukturformel des radiofluorierten LAT1 Markers [¹⁸F]FET.

1.5 TSPO-Tracer

1.5.1 [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714

Bei denen in dieser Arbeit zur Visualisierung von Inflammation verwendeten Tracern [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 handelt es sich um selektive Liganden des mitochondrialen 18 kDA Translocatorproteins (TSPO), auch bekannt als peripherer Benzodiazepin Rezeptor oder engl. Triptophan-rich sensory Protein (Anholt *et al.*, 1986; Papadopoulos *et al.*, 2006a). Die Überexpression von TSPO in aktivierten Mikrogliazellen und die im gesunden Gehirn charakteristisch niedrige TSPO-Expression ermöglichen eine deutliche Differenzierung zwischen neuroinflammatorischen und gesunden Hirnarealen mit Hilfe dieser TSPO-Liganden (Braestrup *et al.*, 1977; Batarseh & Papadopoulos, 2010).

TSPO ist ein insgesamt fünf Alpha-Helices umfassendes Transmembranprotein, bestehend aus 169 Aminosäuren, das in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist (Jaremko *et al.*, 2015). Es wird vor allem in Steroid-synthetisierenden Organen wie der Nebenniere exprimiert (Batarseh & Papadopoulos, 2010). Seine genaue Funktion ist noch nicht geklärt, es ist jedoch bekannt, dass TSPO am Cholesteroltransport zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran (McEnery *et al.*, 1992; Papadopoulos *et al.*, 2006a), der Zellproliferation (Corsi & Baraldi, 2007) und an der Apoptose beteiligt ist (Veenman & Kugler, 2014). Die Verfügbarkeit von Cholesterol ist der limitierende Faktor der Steroidsynthese, weshalb lange Zeit angenommen wurde, dass ein TSPO Knock-out die Steroidsynthese deutlich beeinträchtigen und vermutlich letal wirken würde (Papadopoulos *et al.*, 2007). Benati *et al.* konnten jedoch anhand von TSPO Knock-Out Mäusen zeigen, dass ein TSPO Knock-out weder letal wirkt, noch signifikant

die Steroidsynthese beeinträchtigt und warfen so Zweifel an den bisher postulierten Eigenschaften von TSPO auf (Banati *et al.*, 2014; Barron *et al.*, 2018).

Im gesunden Gehirn wird TSPO nur im Bulbus olfactorius und im Ventrikelepithel in geringen Mengen exprimiert (Anholt *et al.*, 1984). Treten im Gehirn jedoch Entzündungen auf, beispielsweise in Folge von mechanischen Verletzung oder bei neurologischen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Gerhard *et al.*, 2006) oder Apoplexie (Gerhard *et al.*, 2005), wird TSPO auch in reaktiven Astrozyten (Kuhlmann & Guilarte, 2000, Maeda *et al.*, 2007), residenten Mikrogliazellen (Casellas *et al.*, 2002, Gavish *et al.*, 1999, Park *et al.*, 1996) und infiltrierenden Makrophagen (Rupprecht *et al.*, 2010) exprimiert. TSPO-Liganden ermöglichen auf diese Weise die Visualisierung von zerebraler Neuroinflammation.

TSPO besitzt zwei Bindungsstellen für Liganden: Die "cholesterol recognition amino acid consensus" (CRAC)-Domäne für Cholesterol-ähnliche-Liganden, sowie eine hydrophobe Bindungstasche für Benzodiazepin-ähnliche-Liganden (Midzak *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit verwendeten TSPO-Tracer [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 gehören zu den Benzodiazepin-ähnlichen-Liganden (Papadopoulos *et al.*, 2006b). Im Gegensatz zu TSPO-Liganden der ersten Generation, wie beispielsweise [¹¹C]PK11195 oder [¹¹C]PBR28, zeigen [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 eine verbesserte Spezifität und ein höheres Signal-Hintergrund-Verhältnis (im Folgenden Signal to Background Ratio genannt) (Pulagam *et al.*, 2017). Ein Nachteil ist allerdings, dass sie dem sog. TSPO-Polymorphismus (Ala147Thr-Polymorphismus) unterliegen. Dieser Polymorphismus betrifft nur eine einzige Aminosäure der Benzodiazepin-Bindungstasche (Substitution der Aminosäure Alanin durch Threonin), führt jedoch zu einer maßgeblichen Beeinflussung der Bindungsaffinität (Mizrahi *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2015).

Humanpatienten zeigen aufgrund dieses TSPO-Polymorphismus, der im Zuge einer Alteration von Exon 4 des TSPO-Gens auftritt, drei verschiedene Genotypen, die zu einer hohen (high-affinity binding (HAB)), gemischten (mixed affinity binding (MAB)) und niedrigen Bindungsaffinität (low-affinity binding (LAB)) von [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 führen. Aus diesem Grund kommt es zu einer erheblichen interindividuellen Variabilität der Traceranreicherung in neuroinflammatorischen Arealen (Mizrahi *et al.*, 2012). Beispielsweise weist [¹¹C]PBR28 eine wesentlich höhere

Bindungsaffinität für die Ala147-TSPO-Variante (HAB) auf als für Thr147-TSPO (LAB) (Owen *et al.*, 2012). Dies führt dazu, dass bei Menschen mit der Thr147-TSPO-Variante Entzündungen mit [¹¹C]PBR28 nicht visualisiert werden können. Es werden also ¹⁸F-markierte PET Tracer benötigt, die auch eine ausreichend hohe Affinität zu Thr147-TSPO aufweisen. Vielversprechende Kandidaten sind das Phenoxyphenyl-Acetamid [¹⁸F]DAA1106 und das Pyrazol-Pyrimidin-Acetamid [¹⁸F]DPA714, bei denen der rs6971-Affinitätsunterschied nur etwa bei Faktor 4 liegt (Kim *et al.*, 2016).

Wie einleitend bereits beschrieben, treten neuroinflammatorische Prozesse bei vielen neurologischen Erkrankungen auf. Deshalb wurde [¹⁸F]DAA1106 in dieser Arbeit in einem Inflammationsmodell der Ratte (ACAo Apoplexie) evaluiert und mit dem bereits klinisch etablierten Neuroinflammationstracer [¹⁸F]DPA714 verglichen. Da bei den verwendeten Long Evans Ratten bisher kein TSPO-Polymorphismus nachgewiesen wurde, konnte die Bindungsaffinität von [¹⁸F]DAA1106 zu den verschiedenen TSPO-Genotypen nicht getestet werden, sondern erfordert die zukünftige Testung im Humanpatienten. Abbildung 15 zeigt die Strukturformeln der mit ¹⁸F markierten TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714.

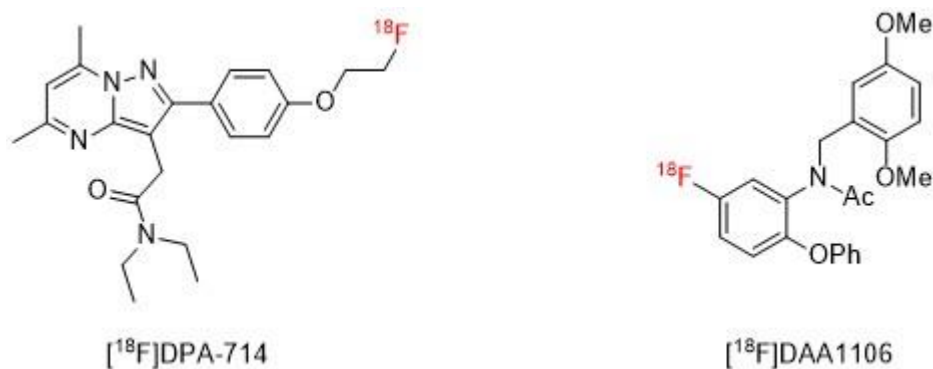


Abbildung 15: Strukturformeln der TSPO-Liganden [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106.

Bei früheren Studien wurde [¹⁸F]DAA1106 vorwiegend mit ¹¹C markiert (Zhang *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2004). Neuere Arbeiten beschreiben die Radiofluorierung von [¹⁸F]DAA1106 (Tredwell *et al.* 2014; Zhang, Kumata, und Suzuki 2007). Die Synthese des in dieser Arbeit verwendeten [¹⁸F]DAA1106 erfolgte nach einem von Zischler *et al.* entwickelten Syntheseverfahren, der Cu-vermittelten Radiofluorierung unter „minimalistischen“ Bedingungen (Zischler *et al.*, 2016). Die Herstellung und

Radiomarkierung erfolgte durch das Institut für Neurowissenschaften und Medizin (INM-5) des Forschungszentrums Jülich und das Institut für Radiochemie und Experimentelle Molekulare Bildgebung der Uniklinik Köln.

1.6 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in drei aufeinander aufbauende Teilstudien, deren Zielsetzung im Folgenden kurz erläutert wird.

1.6.1 Teilstudie I: Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation im Hemiparkinsonmodell

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob ein Zusammenhang zwischen Neuroinflammation und erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake im Hemiparkinsonmodell der Ratte besteht. Dieser Zusammenhang ist klinisch insofern relevant, als dass 6-[¹⁸F]FDOPA zum Monitoring der dopaminergen Degeneration von Parkinson-Patienten genutzt wird, die ebenso wie Hemiparkinsonratten Entzündungen im Gehirn aufweisen. Dies birgt das Risiko, die dopaminerge Neurodegeneration aufgrund der unspezifischen Anreicherung bei Neuroinflammation zu unterschätzen. Durch weitere PET Scans mit den aromatischen Aminosäure-Tracern [¹⁸F]FET und 6-[¹⁸F]FMT sowie durch im Anschluss durchgeführte immunhistochemische Färbungen sollten abschließend Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen gezogen werden.

1.6.2 Teilstudie II: Präklinische Evaluation von 5- und 6-[¹⁸F]FMT

Im Rahmen von Teilstudie II sollten 5- und 6-[¹⁸F]FMT evaluiert und mit 6-[¹⁸F]FDOPA verglichen werden. Dieser Vergleich erfolgte im Hemiparkinsonmodell der Ratte und in gesunden Tieren. Primäres Ziel war es, die Eignung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT für die Bildgebung der dopaminergen Integrität und die Visualisierung des Dopaminmetabolismus zu eruieren und so zu überprüfen, ob sie eine für die Präklinik geeignete Alternative zu 6-[¹⁸F]FDOPA darstellen.

1.6.3 Teilstudie III: Präklinische Evaluation von [¹⁸F]DAA1106

In der dritten Teilstudie wurde der in dieser Arbeit verwendete TSPO-Ligand [¹⁸F]DAA1106 mit dem bereits etablierten [¹⁸F]DPA714 verglichen. Hierzu wurden die Tracer in einem Apoplexiemodell der Ratte getestet. Ziel dieser Studie war die präklinische Evaluation der Bildgebungseigenschaften von [¹⁸F]DAA1106, die bei Durchführung der Studie noch nicht in der Literatur beschrieben war. Des Weiteren wurden die beiden Tracer in gesunden Ratten verglichen, um ihre Bindungsaffinität zu physiologisch exprimiertem TSPO zu quantifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltung

Sämtliche in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit männlichen Ratten (*Rattus norvegicus*) des Züchters Janvier (Genest St Isle, Frankreich) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Tiere des Zuchtstamms Long Evans, die zum Lieferzeitpunkt ca. 12 Wochen alt und 300-400g schwer waren. Sie wurden jeweils zu viert in IVCs (individuell ventilierte Käfige, engl. individually ventilated cages) (NextGen, Ecoflow, Phantom, Allentown) gehalten, eingestreut mit staubarmem Fichtengranulat (sniff® FS14, H1505-29) und Baumwollnestlets (Plexx®, 14010). Der Tierhaltungsraum ist auf 20-24°C klimatisiert und weist eine Luftwechselrate von 6-8 Mal pro Stunde auf. Die relative Luftfeuchtigkeit liegt in einem Bereich von 45-65 % rH. Da Ratten nachtaktiv sind, ist der Lichtzyklus invertiert (Dunkelphase von 8-20 Uhr, Hellphase von 20-8 Uhr). Die Tiere werden mit gamma bestrahltem Haltungsfutter (ssniff®) und Wasser ad libitum gefüttert. Bei Bedarf (abhängig vom Belastungsgrad der Tiere) wurden Langnippeltränken eingesetzt und das Futter direkt im Käfig platziert, um die Wasser- und Nahrungsaufnahme zu erleichtern. Die Einschätzung der Belastung erfolgte mindestens ein Mal am Tag auf Basis der dafür konzipierten Score Sheets. Der Käfigwechsel und die Gewichtskontrolle erfolgten einmal wöchentlich. Zur Vermeidung und Therapie postoperativer Schmerzen wurde eine Wundschmerz-Analgesie mit 4 mg/kg Carprofen (Handelsname Rimadyl®) s.c. über 72 h nach Bedarf durchgeführt. Die erste Applikation erfolgt bereits intraoperativ. Zusätzlich wurden die Tiere vor allen Benserazid- und Rimadyl-Injektionen gewogen, um die dem Körpergewicht entsprechende Applikationsmenge zu bestimmen.

2.2 Anästhesie

Neben den Operationen, PET und MRT Messungen wurden auch alle Tracer-, Benserazid- und Analgetika-Injektionen unter Vollnarkose durchgeführt, um den Stress der Tiere auf ein Minimum zu reduzieren. Da es sich bei Ratten um eine nicht-emetische Spezies handelt, ist Fasten vor der Narkose nicht nötig. Bei allen Narkosen wurde die Körpertemperatur überwacht und mit einem wasserbeheizten Wärmekissen auf 37 °C gehalten.

Zur Einleitung der Narkose wurde das Versuchstier in eine verschließbare Inhalationsbox (Medres[®], Köln, Deutschland) gesetzt und ein Gasgemisch aus 5 % Isofluran (Actavis[®], Morpeth, UK) in 30 % O₂ und 70 % Luft eingeleitet. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz (Überprüfung des Lidschluss- und des Zwischenzehenreflexes) wurde die Isoflurankonzentration auf 1,5-2,5 % reduziert und das Versuchstier auf das Wärmepad des Operationstischs bzw. des PET oder MRT Scanners gelegt. Durch einen Warmwasserdurchfluss wurde das Tier gewärmt, sodass die Körpertemperatur bei konstant 37 °C lag. Die Aufrechterhaltung der Narkose während Operationen oder Messungen erfolgte über eine Atemmaske, die über Mund und Nase der Ratte platziert wurde. Um die Atmung des Versuchstieres zu überwachen und die Isoflurankonzentration bei Bedarf entsprechend anzupassen, wurde das Versuchstier auf ein Druckkissen gelegt, das die Atemfrequenz durch das Heben und Senken des Brustkorbs mechanisch detektiert und an einen Computer überträgt. Die Kontrolle der Temperatur erfolgte über eine Rektalsonde, die vor dem Einführen mit Vaseline bestrichen wurde. Diese war zusätzlich an den Warmwasserzufluss gekoppelt, sodass die Temperatur optimal reguliert werden konnte.

2.3 Das 6-OHDA Hemiparkinsonmodell der Ratte

Das 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) Hemiparkinsonmodell ist ein gut etabliertes Kleintiermodell zur Erforschung von motorischen oder biochemischen Dysfunktionen der Morbus Parkinson Erkrankung (Ungerstedt, 1971). Viele der bis heute gewonnenen Erkenntnisse über Ursache und Verlauf sowie Behandlung der Parkinsonerkrankung wurden durch die Generierung von Tiermodellen wie das 6-OHDA Hemiparkinsonmodell der Ratte gewonnen (Blandini *et al.*, 2008; Duty & Jenner, 2011). Es hat den Vorteil, dass die Neurodegeneration mit relativ geringem Aufwand und unabhängig von genetisch erzeugten Dispositionen hervorgerufen werden kann. Zur Generierung des Modells wurde den Versuchstieren mit Hilfe eines stereotaktischen Rahmens 6-OHDA unilateral entweder in das Striatum oder in das mediale Vorderhirnbündel (MFB) injiziert, um eine Läsion im nigrostriatalen Signalweg zu induzieren (Tieu, 2011). Die Strukturformel des Neurotoxins 6-OHDA ist in Abbildung 16 dargestellt.

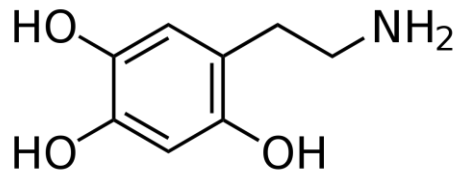


Abbildung 16: Strukturformel des Neurotoxins 6-OHDA.

6-OHDA ist ein hydroxyliertes Analogon des Neurotransmitters Dopamin, das über DAT in die Präsynapsen nigrostriataler dopaminergener Neuronen aufgenommen wird und dort die Degeneration des Neurons entlang des Axons induziert (Tieu 2011). Die zugrundeliegenden biochemischen Prozesse sind noch nicht vollständig erforscht. Es ist jedoch bekannt, dass 6-OHDA im Zytosol akkumuliert, die Mitochondrien schädigt und so die Atmungskette stört. Die darauffolgende Bildung freier Radikale induziert vermehrt oxidativen Stress der dann final zum Zelltod der dopaminergen Zellkörper führt (Schober, 2004). Wie bereits erwähnt, werden in den dopaminergen Zellköpern die Enzyme exprimiert, die an der Dopaminsynthese innerhalb der dopaminergen Neuronen beteiligt sind (vgl. Kapitel 1.2). Das Absterben der dopaminergen Neuronen führt zu einer unilateralen Dopaminverarmung des von der Substantia nigra innervierten Striatum und somit zur Ausbildung der Parkinsonschen Krankheit. Die Applikation des Neurotoxins muss per intrazerebraler Injektion erfolgen, da 6-OHDA nicht hirngängig ist (Kostrzewa & Jacobowitz, 1974; Joers *et al.*, 2014). In Abbildung 17 sind die Injektionsstellen innerhalb des Rattengehirns schematisch und im MRT Bild dargestellt.

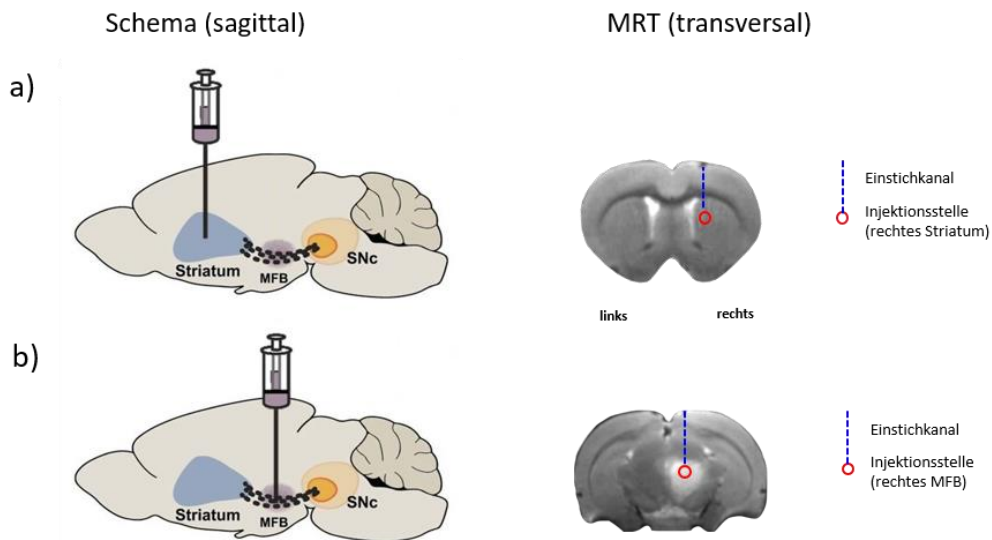


Abbildung 17: Injektionsstellen des 6-OHDA zur Generierung des Hemiparkinsonmodells.

Der gewählte Injektionsort ist abhängig von der angestrebten Läsionsstärke. Während die Injektion ins Striatum (a) meist nur eine partielle Läsion der SNpc und somit weniger stark ausgeprägte parkinsonähnliche Symptome hervorruft, bewirkt die Injektion in das mediale Vorderhirnbündel (MFB). (b) eine stärkere Läsion der dopaminergen Zellkörper in der Substantia nigra und resultiert daher in einer stärkeren Dopaminverarmung des Striatum (modifiziert nach De Jesús-Cortés *et al.* 2015).

Da nur eine Hemisphäre betroffen ist, bleibt der Leidensdruck der Tiere gering und die Krankheitssymptome sind weniger stark ausgeprägt. Eine bilaterale Injektion führt zu hohen Todesraten der Versuchstiere und ist somit nicht praktikabel (Ungerstedt, 1971). Der gewählte Injektionsort ist abhängig von der angestrebten Läsionsstärke. Die Injektion ins Striatum (vgl. Abbildung 17a) bewirkt meist nur eine partielle Läsion und somit weniger stark ausgeprägte Symptome sowie ein langsames Zellsterben innerhalb der Substantia nigra. Die Injektion in das MFB (vgl. Abbildung 17b) ruft eine stärkere Läsion der dopaminergen Zellkörper in der Substantia nigra und somit auch eine stärkere Dopaminverarmung des Striatum hervor (Rodrigues *et al.*, 2001; Hald & Lotharius, 2005). Auch wenn die Injektion in das Striatum zu einem langsameren Zellsterben führt, erfolgt die dopaminerge Neurodegeneration ungleich schneller als bei Humanpatienten. Das Modell bildet zwar die Symptome des Morbus Parkinson ab, jedoch nicht die charakteristische, langsame Krankheitsprogression (Martí *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit war das primäre Ziel der Operation das Hervorrufen einer mit der Operation einhergehenden Neuroinflammation. Somit war die Injektionsstelle des 6-OHDA abhängig von dem Hirnareal in dem die Entzündung hervorgerufen werden sollte und nicht von der intendierten Stärke der dopaminergen Neurodegeneration.

Es wurde zunächst das Striatum für die 6-OHDA Injektion und somit als das Hirnareal gewählt, in dem die Neuroinflammation induziert werden sollte (vgl. Abbildung 17a). Anhand des gleichzeitigen Auftretens von Neuroinflammation und Dopaminverarmung im gleichen Hirnareal (Striatum) sollte untersucht werden, ob Neuroinflammation eine Anreicherung des Dopamintracers 6-[¹⁸F]FDOPA bewirkt und somit die zu erwartende Reduktion des Dopaminsignals im Striatum überlagert und maskiert. Dieses Risiko bestünde auch bei Humanpatienten, da die Neurodegeneration bei Morbus Parkinson ebenfalls mit Neuroinflammation einhergeht.

Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse auch in einem anderen Hirnareal als dem Striatum reproduzieren lassen, wurde im zweiten Teil der Studie das MFB läsioniert (vgl. Abbildung 17b). Der Ablauf der Operationen der beiden Hemiparkinsonmodelle unterscheidet sich nur durch den Ort der Injektion und somit der induzierten Entzündung. Die Injektion im Striatum induziert die Entzündung genau dort, wo man auch den Rückgang der dopaminergen Innervation im Zuge der Operation erwarten würde, nämlich im Striatum. Die Injektion in das MFB bewirkt zwar ebenfalls eine zunehmende Degeneration der dopaminergen Terminalien im Striatum, da die dopaminergen Axone im MFB verlaufen, die Entzündung wird jedoch nur am Ort der Injektion, also im MFB induziert. Rein physiologisch reichert sich 6-[¹⁸F]FDOPA nicht im MFB an. Dies ermöglichte die Differenzierung des physiologischen und des inflammationsbedingten 6-[¹⁸F]FDOPA Signals.

Zur Erzeugung der dopaminergen Neurodegeneration wurden dem Versuchstier 12 µg 6-OHDA in 3 µl NaCl ins Striatum bzw. 21 µg 6-OHDA in 3 µl NaCl ins MFB injiziert. Hierfür wurde die zu operierende männliche Long Evans Ratte zunächst in eine verschließbare Narkosebox (Medres GMBH) gesetzt, in die über einen Kunststoffschlauch das Inhalationsanästhetikum Isofluran eingelassen wurde. Sobald das Versuchstier chirurgische Toleranz erreichte (Überprüfung des Zwischenzehenreflexes) wurde es auf ein Wärmepad im stereotaktischen Rahmen (vgl. Abbildung 18) (NEUROSTAR®) überführt. Durch einen Warmwasserdurchfluss wurde das Tier gewärmt, sodass die Körpertemperatur konstant bei 37 °C lag. Herzschlag und Körpertemperatur wurden während der gesamten Messung überwacht. Die Aufrechterhaltung der Isofluran-Narkose erfolgt über eine Atemmaske, wie in Kapitel 2.2 beschrieben.



Abbildung 18: Vollautomatischer stereotaktischer Rahmen für Ratten (entnommen aus: <https://i2.wp.com/robot-stereotaxic.com/wp-content/uploads/2014/07/drillrobot.jpg>, am 10.11.2018)

Zu Beginn der Operation wurde die Operationsstelle geschoren. Daraufhin wurde eine sagittale Inzision vorgenommen und der Schädelknochen freigelegt. Anschließend wurde eine unilaterale stereotaktische Trepanationsbohrung 3 mm lateral (Striatum) bzw. 1,2 mm lateral und 4,4 mm caudal (MFB) ausgehend von Bregma vorgenommen (vgl. Abbildung 19). Die Injektion erfolgte 5 mm (Striatum) bzw. 7,9 mm (MFB) ventral der Dura Mater. Hierfür wurde eine 28G-Nadel mit einer 10 µl Hamilton-Spritze verwendet. Damit die Flüssigkeit nicht entlang des Einstichkanals entweichen konnte, wurde die Hamilton-Spritze mindestens 10 Minuten vor und 10 Minuten nach Applikation *in situ* belassen. Der stereotaktische Rahmen war mit einem Computer verbunden, über dessen Tastatur sowohl der Bohrer (Eingabe der Bohrloch-Koordinaten) als auch die Hamilton-Spritze (Geschwindigkeit und Volumen der Injektion) gesteuert werden konnten. Das System umfasste außerdem einen 3D-Rattenhirnatlas, weshalb die Kalibrierung der Koordinaten sehr genau erfolgte. Nach Beendigung der Infusion wurde die Nadel langsam (1 mm/Min) zurückgezogen. Danach wurde die Trepanationsbohrung mit Knochenwachs verschlossen, der Wundabschluss vernäht und mit Betaisodona® behandelt, um postoperativen Wundinfektionen vorzubeugen.

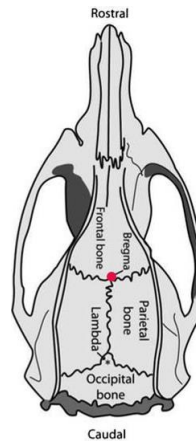


Abbildung 19: Schematische Darstellung eines Rattenschädels zu Lokalisation von Bregma (modifiziert nach: *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1998).

Zur Analgesie erfolgte die erste Rimadylgabe (100 μ l subkutan) bereits während der Operation, noch bevor das Tier in einem Einzelkäfig aus der Narkose erwachte. Die Rimadylbehandlung wurde am zweiten und dritten Tag nach der Operation fortgesetzt. Einen Tag nach der Operation wurden die Tiere in einem 7-Tesla-Kleintier-MRT untersucht (vgl. Kapitel 2.5), um den Erfolg der Operation und die Injektionsstelle zu überprüfen.

2.4 Das ACAo Apoplexiemodell der Ratte

Die Erzeugung einer fokalen ischämischen Apoplexie durch die transiente Okklusion der Arteria cerebri anterioris (ACAo) ist ein gut etabliertes Rattenmodell zur Untersuchung der mit Apoplexie einhergehenden neurologischen Prozesse (Ward *et al.*, 1998; Endepols *et al.*, 2015).

Zur Okklusion der ACA) wurden 150 pmol Endothelin-1 (ET-1) in 3 μ l NaCl gelöst und stereotaktisch in unmittelbare Nähe des supracallosalen Abschnitts der ACA injiziert (Endepols et al. 2015). ET-1 ist ein Vasokonstriktor, der physiologisch in vaskulären Endothelzellen exprimiert. Er ist der wirksamste Vasokonstriktor der insgesamt drei Subtypen (ET 1 bis 3). Durch die Bindung an G-Protein-gekoppelte Endothelinrezeptoren nimmt ET-1 Einfluss auf die Kontraktion der Endothelzellen und spielt somit eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Durchblutung von Geweben und

Organen. In der verwendeten Dosierung unterbindet ET-1 den zerebralen Blutfluss im Bereich der ACA nahezu vollständig. Erst nach 4 Stunden erreicht der zerebrale Blutfluss wieder Ausgangsniveau (Endepols *et al.*, 2015).

Die ACA ist für die Blutversorgung des frontalen und präfrontalen Cortex sowie Teilen des Motorcortex und des primären sensorischen Cortex verantwortlich. Ein Verschluss der ACA führt beim Menschen einerseits zu vermindertem Handlungsantrieb, wie der geminderten Fähigkeit zu gewollten Bewegungsabläufen und andererseits zur Beeinträchtigung kognitiver Funktionen, wie beispielsweise der Sprachfunktion, der Entscheidungsfindung oder des Erinnerungsvermögens (Nagaratnam *et al.*, 1998; Kumral *et al.*, 2002; Endepols *et al.*, 2015). Im Gegensatz zu dem wesentlich häufiger genutzten MCAo Apoplexiemodell, das durch die Okklusion der Arteria cerebri media generiert wird, verursacht das ACAo Modell eine weniger starke Beeinträchtigung der Motorik, da der primäre Motorcortex von der MCA und nicht von der ACA versorgt wird. Das hat den Vorteil, dass Motivations- und Kognitionsaufgaben im Anschluss an die Induzierung der Apoplexie geringfügiger durch die Bewegungseinschränkungen der Tiere beeinträchtigt sind und der Leidensdruck der Tiere wesentlich geringer ist (Ward *et al.*, 1998). Abbildung 20 zeigt die ACA und MCA in der ventralen Ansicht eines Rattenhirns.

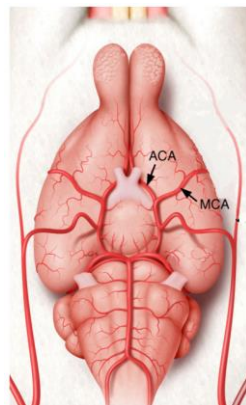


Abbildung 20: Schematische Darstellung der ACA und MCA innerhalb des Rattengehirns (ventrale Ansicht) (modifiziert nach Crumrine *et al.*, 2011).

Vor der Operation wurde die männliche Long Evans Ratte zunächst wie bereits in Kapitel 2.3 beschrieben auf die Operation vorbereitet und im stereotaktischen Rahmen positioniert. Daraufhin wurde eine sagittale Inzision zur Freilegung des Schädelknochens

und eine stereotaktische Trepanationsbohrung 1,5 mm anterior zu Bregma vorgenommen. Die Injektion erfolgte 3,3 mm ventral der Dura Mater in den pericallosalen Bereich der ACA. Hierfür wurde eine 28G-Nadel mit einer 10 µl Hamilton-Spritze verwendet. Damit die Flüssigkeit nicht entlang des Einstichkanals entweichen konnte, wurde die Hamilton-Spritze nach Injektion mindestens 10 Minuten *in situ* belassen. Danach wurde die Nadel langsam (1 mm/Min) zurückgezogen. Da die Kanüle beim Einführen den Sinus sagittalis passiert, kam es nach der Injektion häufig zu einer venösen Blutung. Nach dem Stoppen der Blutung wurde das Bohrloch mit Knochenwachs verschlossen. Die Überwachung des Tieres während der Operation, die Analgesie, sowie die Nachsorge der Operationswunde erfolgte wie unter 2.3 bereits beschrieben. Einen Tag nach der Operation wurden die Tiere in einem 11,7 Tesla Kleintier-MRT untersucht, um die Läsionsgröße und -lokalisierung nach ACA Läsion zu ermitteln. Abbildung 21 zeigt den Injektionsort des ET-1 im pericallosalen Bereich der ACA im Transversalschnitt eines Ratten MRT Bildes.

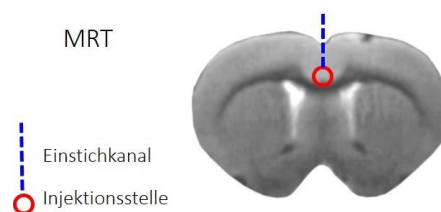


Abbildung 21: Injektionsstellen des ET-1 zur Generierung des ACAo Apoplexiemodells dargestellt in einem MRT Bild (Transversalschnitt).

Die Schwere der durch den Infarkt ausgelösten neuronalen Schädigung hängt dabei deutlich von der neuroinflammatorischen Immunantwort ab (Iadecola & Anrather, 2011; Hawkins *et al.*, 2017). Bereits Minuten nach der Okklusion triggert der reduzierte Blutfluss die Einwanderung von aktivierten Mikrogliazellen und Makrophagen, begleitet von einem erhöhten Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen, die die Inflammation weiter verstärken.

Die im Rahmen dieser Studie durchgeführte ACAo Operation hatte jedoch nicht die Untersuchung der zuvor beschriebenen Dysfunktionen, sondern die Untersuchung der mit der Ischämie einhergehenden Inflammation zum Ziel. Sie diente als Inflamationsmodell, in dem die Bildgebungseigenschaften des Neuroinflammations-

tracers [^{18}F]DAA1106 mit denen des bereits etablierten Benchmarktracers [^{18}F]DPA714 verglichen wurden.

2.5 Durchführung der Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) wurde spätestens 24 Stunden nach der Operation durchgeführt. Die Aufnahme eines strukturellen MRT Bildes für jedes Versuchstier diente der Lokalisierung der Läsion. Auf diese Weise konnte auch der Erfolg der Operation überprüft werden. Bei gesunden Versuchstieren erfolgte die MRT Messung spätestens einen Tag vor der ersten PET Messung. Des Weiteren dienten die MRT Bilder mit ihrer hohen räumlichen Auflösung als anatomische Grundlage für die Coregistrierung und Auswertung der PET Bilder.

Narkose und Fixierung erfolgten wie in Kapitel 2.2 beschrieben. Es wurde kein zusätzliches Kontrastmittel verwendet. Die MRT Messungen erfolgten mit einem 11,7 T Kleintier MRT Scanner (Bruker BioSpin[®], Billerica, USA) und der zugehörigen Software Paravision 5.1 (Bruker BioSpin[®]). Zunächst wurde mit Hilfe eines Positionsscans die richtige Position des Rattenhalters ermittelt, sodass der Kopf der Ratte exakt im Field of View, also zwischen Empfängerspule (Bruker, Biosping[®]) und Resonator (Durchmesser: 72mm) positioniert war. Die Bildrekonstruktion erfolgte über eine T2-gewichtete Rapid Aquisition Spin Echo-Sequenz mit einer Wiederholungsrate von 8 und einer Repetitionszeit von 6500 ms. Die daraus resultierenden MRT Aufnahmen bestehen aus 58 Schnitten einer Schnittdicke von 0,5 mm.

2.6 Durchführung der Positronen-Emissions-Tomographie

Alle PET Messungen wurden mit dem Kleintier PET Scanner Siemens[®] microPET Focus 220 (Concorde Microsystems[®], Knoxville, TN, USA) durchgeführt. Die physikalische Auflösung des verwendeten PET Scanners beträgt 1,4 mm. Narkose sowie Überwachung der Atmung und der Körpertemperatur erfolgten wie unter 2.2 bereits beschrieben. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde die Ratte von der Narkosebox auf den OP Tisch überführt. In eine der lateralen Schwanzvenen wurde ein Katheter gelegt, über den der Tracer zu Beginn des Emissions Scans injiziert wurde. Die Tracerapplikation erfolgte

nach dem Microdosing-Prinzip; dies bedeutet, dass die Dosis so gering bemessen ist, dass der Stoffwechsel nicht beeinflusst wird. Der Positronenemitter ^{18}F besitzt eine Halbwertszeit von 109,7 Min und wurde mit einer maximalen Aktivität von 75 MBq bei Ratten eingesetzt. Die Dauer des Scans variierte abhängig von der jeweils durchgeführten Studie und dem injizierten Radiotracer. Die applizierte Tracermenge war abhängig von der für einen Messtag zu Verfügung stehenden Tracermenge bzw. Gesamtaktivität, lag jedoch immer in einem Rahmen von 50 bis 75 MBq. In Kapitel 2.7 sind die verwendeten Radiotracer, das Messprotokoll, die applizierte Aktivität sowie die verwendete Tierzahl (n) für alle im Rahmen der drei Teilstudien durchgeführten PET Experimente aufgeführt.

Im Anschluss an den Emission Scan wurde ein Transmission Scan durchgeführt, mit dessen Hilfe eine Schwächungskorrektur (engl. „Attenuation Correction“) der Bilder erfolgte. Dabei wird die Abschwächung der Gammastrahlung durch das umliegende Gewebe und die Halterung bestimmt, in der die Ratte während des Scans liegt. Die Schwächungskorrektur ist notwendig, da der Körper der Ratte einen Teil der nach einem Zerfallsereignis ausgestrahlten γ -Quanten absorbiert und sie somit nicht detektiert werden können. γ -Quanten von Zerfallsereignissen, die im Körperinneren stattfinden, müssen mehr Gewebeschichten durchdringen als jene, die näher an der Körperoberfläche stattfinden. Somit wird eine grundsätzlich höhere Aktivität an der Körperoberfläche als im Körperinneren gemessen.

Während des Transmission Scans rotiert eine externe Cobaltquelle um den Körper der Ratte und emittiert Photonen. Gemessen werden die γ -Quanten, die an den der Cobaltquelle gegenüberliegenden Detektoren auftreffen. Da die Aktivität der Cobaltquelle bekannt ist, kann aus der Differenz zwischen ausgesendeter und registrierter Strahlung die Abschwächung in jedem Punkt des Körpers berechnet werden. Die Rekonstruktion der PET Bilder erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms (microPET Manager 2.5.0, Siemens Preclinical Solutions[®], Knoxville, USA) nach der OSEM3D/MAP-Methode und ergab Voxelgrößen von $0,38 \times 0,38 \times 0,82 \text{ mm}^3$ (Qi *et al.*, 1998).

Um bei der Aufnahme der PET Bilder möglichst gleiche Voraussetzungen zu schaffen, wurden allen Tieren wenn möglich 75 MBq injiziert. Aufgrund der Experimente mit lebenden Tieren und vielen weiteren Einflussfaktoren konnte die Zeitdifferenz zwischen

Aufziehen und Injektion der 75 MBq geringfügig zwischen den Messungen variieren. Aus diesem Grund war der radioaktive Zerfall zum Zeitpunkt der Injektion unterschiedlich weit fortgeschritten und es wurde nicht immer exakt die gleiche Radioaktivitätsmenge injiziert. Um diese Unterschiede anzugleichen, wurden alle Bilder intensitätsnormiert. Ziel der Intensitätsnormierung ist es, dass alle PET Bilder einer Studie, die mit dem gleichen Tracer gemessen wurden, die gleiche relative Intensität aufweisen, um sie für die weitere Auswertung vergleichbar zu machen. Das Vorgehen bei der Intensitätsnormierung wird in Kapitel 2.6.1 erläutert.

2.6.1 Intensitätsnormierung

Die Intensitätsnormierung der PET Daten erfolgte mit Hilfe des Imaging Software Tool Vinci (Vollmar *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurden, abhängig davon, welche Intensitätsnormierung die beste Vergleichbarkeit gewährleistete, verschiedene Methoden zur Intensitätsnormierung verwendet.

Zum einen ist es möglich, die PET Bilder auf ein bestimmtes Referenzareal zu normieren, das ein möglichst geringes Traceruptake, also nur Backgroundaktivität zeigt. Arndt *et al.* bezeichnen diese Methode als „Ratio Method“ (Arndt *et al.*, 1996). Dabei dient der durchschnittliche Uptake in diesem Areal als Referenzwert, durch den das gesamte PET Bild dividiert wird. Für jeden Voxel wird folglich der Quotient (engl. ratio) aus dem Uptake des Voxels und des durchschnittlichen Uptakes innerhalb des Referenzareals (Backgroundaktivität) gebildet, sodass man den SUVR (engl. standardized uptake value ratio) erhält. Alle Voxel mit einem Wert über 1 liegen somit über Backgroundniveau und weisen folglich eine Traceranreicherung auf. Diese Methode hat den Vorteil, dass sich anhand der Werte sofort ablesen lässt, ob die Traceraufnahme innerhalb des zu untersuchenden Hirnareals (VOI für engl. Volume of Interest) erhöht oder erniedrigt ist. In Abbildung 22 sind die in einer VOI erfassten Referenzareale dargestellt.

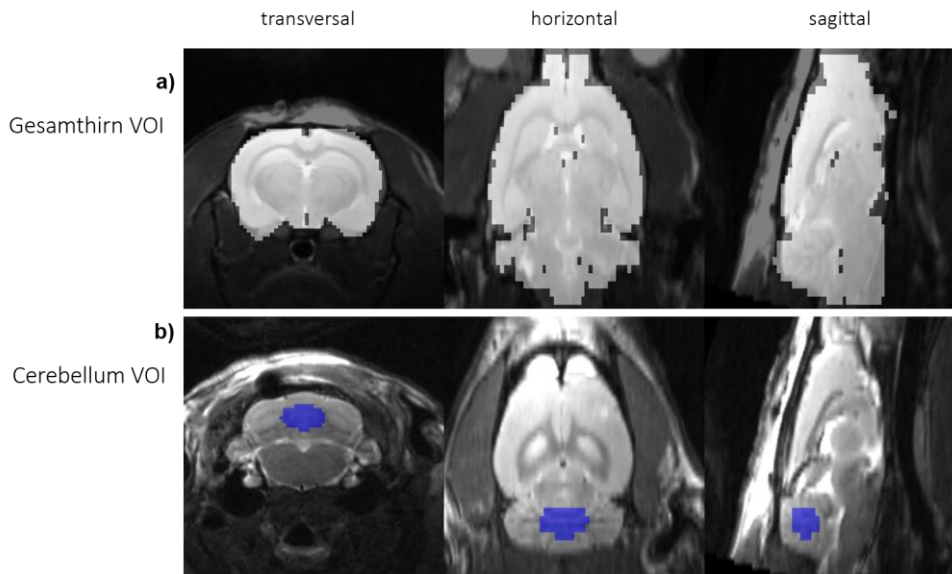


Abbildung 22: Referenzareale zur Intensitätsnormierung der PET Bilder.

(a) Gesamthirn VOI, die zur Intensitätsnormierung und zur Bestimmung der Backgroundaktivität der [^{18}F]DAA1106 und [^{18}F]FET PET Bilder verwendet wurde. (b) Cerebellum VOI, die zur Intensitätsnormierung und zur Bestimmung der Backgroundaktivität der [^{18}F]FDOPA PET Bilder verwendet wurde. Um zu verhindern, dass das Referenzareal durch periphere Einstrahlung überlagert wird, wurde nur der zentral gelegene Teil des Cerebellum erfasst und nicht die äußeren Ränder.

Die Intensitätsnormierung anhand des SUVR erfolgte in Teilstudie I, da hier der Fokus des Tracervergleichs vor allem auf der Lokalisation und Korrelation der Tracer [^{18}F]DAA1106 und 6- ^{18}F]FDOPA lag und nicht auf einer VOI-basierten Quantifizierung zum Vergleich der Bildgebungseigenschaften. Dies ist jedoch in Teilstudie II und III der Fall, da hier Tracer miteinander verglichen werden, die den gleichen physiologischen bzw. pathologischen Prozess visualisieren. Um zu eruieren, welcher dieser Tracer für die Visualisierung am besten geeignet ist, ist eine genaue Quantifizierung verschiedener Parameter notwendig, wie beispielsweise der Backgroundaktivität selbst. Diese entspräche bei der Intensitätsnormierung anhand des SUVR immer 1 und lässt einen direkten Vergleich nicht zu, weshalb die Quantifizierung mithilfe des SUVR in diesem Fall nicht geeignet war. Die in Teilstudie II und III erhobenen PET Daten wurden deshalb auf die injizierte Dosis in % normiert (%ID).

Die injizierte Dosis wurde über eine Zerfallskorrektur aus der initialen Aktivität und der Zeit zwischen Aufziehen der Spritze und der Injektion des Tracers nach folgender Formel berechnet:

$$N(t) = N(0) * e^{(-t * \ln 2 / T)}$$

$N(t)$ = Aktivität zum Zeitpunkt der Tracerinjektion

$N(0)$ = Aktivität nach Aufziehen der Spritze

t = Zeit (Min) zwischen dem Aufziehen der Spritze und Tracerinjektion

T = Halbwertszeit von ^{18}F (109,8 Min)

Da die Rohdaten in Bq/g ausgegeben werden, liegen die PET Bilder nach der Division durch die injizierte Dosis und der Multiplikation mit 100 in der Einheit %ID/g vor. Daraufhin werden sie mit dem Körpergewicht des Versuchstiers multipliziert, sodass man schließlich die Einheit %ID erhält. Die Einheit %ID ermöglicht die genaue Quantifizierung und den Vergleich des Uptakes innerhalb eines Hirnareals. Das genaue Vorgehen bei der Auswertung der erhobenen PET Daten wird im nächsten Kapitel beschrieben.

2.6.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der PET Daten erfolgte mit Hilfe des Imaging Software Tools Vinci (Vollmar *et al.*, 2007). Bevor mit der eigentlichen Auswertung begonnen werden konnte, mussten die PET Bilder zunächst coregistriert, also in die exakt gleiche Position gebracht werden. Dies ist Grundvoraussetzung, um die auf den PET Bildern erfasste Traceranreicherung später auch den richtigen Hirnarealen zuordnen zu können. Hierzu wird zunächst ein Rattenatlas in das Programm eingeladen (Swanson, 1998), dessen Position als Referenz für alle weiteren in das Programm eingeladenen MRT und PET Bilder dient. Danach werden die MRT Bilder mit dem Atlas und daraufhin die PET Bilder mit ihrem individuellen MRT coregistriert. Ist die Coregistrierung abgeschlossen, erfolgt die Intensitätsnormierung wie unter 2.6.1 beschrieben, um die PET Daten für die weitere

Analyse vergleichbar zu machen. Die weitere Auswertung der Daten erfolgte per Korrelations- oder VOI-Analyse.

Für die VOI-Analyse wurde für alle relevanten Hirnareale VOIs erstellt, indem diese entlang der anatomischen Grenzen des gewünschten Hirnareals eingezeichnet wurden. Eine weitere Möglichkeit ist die Generierung einer elliptischen, oder quadratischen VOI durch das Programm, die daraufhin über das gewünschte Referenzareal gelegt werden kann. Der Vergleich der Tracer erfolgte anhand der durchschnittlichen Aktivität bzw. der Anreicherung des Tracers innerhalb der betrachteten VOI, die für jedes Versuchstier ausgelesen und dann über die Gesamtzahl der Versuchstiere gemittelt wurde. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Unterschiede im Anreicherungsverhalten der Tracer signifikant waren, wurde ein abhängiger t-Test in Excel durchgeführt. Das Signifikanzniveau α wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte anhand der über alle Versuchstiere gemittelten PET Bilder und VOI Aktivitäten. Die innerhalb der einzelnen Teilstudien analysierten Parameter bzw. Hirnareale werden in Kapitel 2.7 für jede Teilstudie noch einmal genauer erläutert.

Für die im Rahmen von Teilstudie I erhobenen Daten wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Bei der Korrelationsanalyse werden die Werte aller Voxel eines mit Tracer A aufgenommenen PET Bildes mit den zugehörigen Voxelwerten des mit Tracer B aufgenommenen PET Bildes hinsichtlich ihrer linearen Abhängigkeit verglichen. Hierfür wird für jeden Voxel der Korrelationskoeffizient r errechnet. r ist ein Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs von zwei Merkmalen (in diesem Fall die Aktivität eines Voxels von Tracer A und Tracer B). r kann einen Wert zwischen 1 und -1 annehmen, wobei ein Wert von 1 einen vollständig positiven und -1 einen vollständig negativen linearen Zusammenhang zwischen den beiden Tracern innerhalb des betrachteten Voxels bedeutet. Eine positive Korrelation lag folglich dann vor, wenn eine erhöhte Aktivität des Tracers A mit einer erhöhten Aktivität des Tracers B oder eine niedrige Aktivität des Tracers A mit einer niedrigen Aktivität des Tracers B innerhalb des betrachteten Voxels einherging. Eine negative (inverse) Korrelation lag dann vor, wenn eine erhöhte Anreicherung des einen mit einer geringfügigen oder ausbleibenden Anreicherung des anderen Tracers einherging. Auf diese Weise konnte überprüft werden, ob sich die verglichenen Tracer in gleichem Maße in einem Hirnareal anreicherten oder nicht.

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse (r-Werte für jeden Voxel) wurden farbcodiert in einer sog. r-Karte dargestellt und auf ein MRT projiziert. Voxel mit signifikanten positiven Korrelationen wurden in rot, Voxel mit signifikanten negativen Korrelationen in blau abgebildet. Bei der Farbcodierung (Skalierung der r-Karte) wurde die Schwelle so festgesetzt, dass die r-Karte nur Voxel zeigte, bei denen die Korrelation auch signifikant war ($p < 0,05$).

Da für jeden Voxel des Gehirns, das insgesamt 18450 Voxel umfasst, ein solcher statistischer Test durchgeführt wurde, ergab sich das Problem des multiplen Testens. Je mehr Hypothesen an einem Datensatz getestet werden, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit, dass sich zufällige Signifikanzen ergeben. Dies nennt man Alphafehler-Kumulierung. Aus diesem Grund wurde jede in dieser Arbeit berechnete r-Karte mithilfe der Threshold Free Cluster Enhancement Methode (TFCE) korrigiert und über einen Permutationstest gethresholdet (Smith & Nichols, 2009).

2.7 Studiendesign

2.7.1 Teilstudie I: Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation im Hemiparkinsonmodell

Um die Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA in neuroinflammatorischen Arealen zu untersuchen, wurden Vergleichsmessungen mit 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106 in zwei verschiedenen Hemiparkinsonmodellen (Injektion ins MFB oder ins Striatum) durchgeführt. Die PET Messungen erfolgten eine (t1) und vier Wochen (t2) nach der 6-OHDA Injektion und der somit induzierten Neuroinflammation.

Für die [¹⁸F]DAA1106 PET Messungen wurden 75 MBq des Tracers in einem Gemisch aus 0,9 % NaCl und Polyethylenglycol PEG-400 (Mischungsverhältnis 1:1) gelöst und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl aufgefüllt. Die Hinzugabe von PEG-400 war erforderlich, um die Löslichkeit des stark lipophilen Tracers in NaCl zu gewährleisten. Die [¹⁸F]DAA1106 PET Messung begann zeitgleich mit der intravenösen Tracerinjektion und dauerte 30 Minuten (vgl. Abbildung 23).

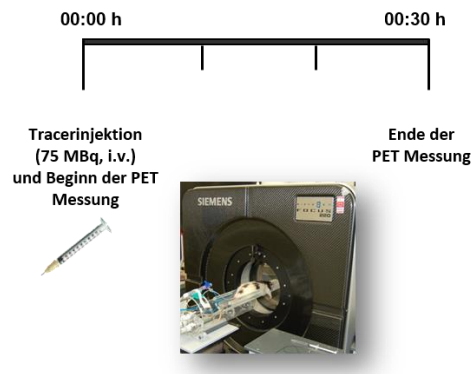


Abbildung 23: Zeitlicher Ablauf der $[^{18}\text{F}]$ DAA1106 Messungen in Teilstudie I.

Für die 6- $[^{18}\text{F}]$ FDOPA PET Messung wurde den Versuchstieren eine Stunde vor der 6- $[^{18}\text{F}]$ FDOPA-Injektion der AADC Inhibitor Benserazid (15mg/kg) in 0,5ml 0,9 % NaCl-Lösung intraperitoneal injiziert. Die darauffolgende 6- $[^{18}\text{F}]$ FDOPA Injektion (75 MBq in 0,5ml 0,9 % NaCl) erfolgte eine halbe Stunde vor Beginn der PET Messungen unter kurzer Narkose intravenös in die Schwanzvene. Das Versuchstier verblieb daraufhin bis zum Start der Messung in seinem Käfig. Die PET Messung dauerte wie bei den $[^{18}\text{F}]$ DAA1106 Scans 30 Minuten (vgl. Abbildung 24).

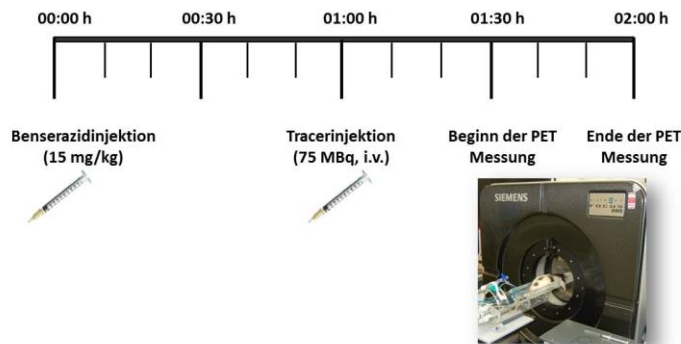


Abbildung 24: Zeitlicher Ablauf der 6- $[^{18}\text{F}]$ FDOPA Messungen in Teilstudie I.

Wie einleitend bereits erläutert, adressieren radiofluorierte Dopaminanaloga wie 6- $[^{18}\text{F}]$ FDOPA keine Targetstruktur, sondern sie sind Stoffwechselftracer und gehen als Dopaminvorläufer selbst in den Dopaminstoffwechsel ein. Bei sofortigem Start der Messung nach Tracerinjektion würden nur Transport- und Stoffwechselfvorgänge, nicht aber die vesikuläre Transmitterspeicherung in der Präsynapse im Summenbild der PET

Messung abgebildet. Vorexperimente innerhalb der Arbeitsgruppe zeigten, dass das Messzeitfenster 30 bis 60 min nach Tracerinjektion für die Visualisierung des präsynaptischen Trappings von 6- ^{18}F FDA am besten geeignet ist. Zwischen 30 und 60 Min scheint die zentrale Decarboxylierung von 6- ^{18}F FDOPA zu 6- ^{18}F FDA sowie dessen präsynaptisches Trapping innerhalb der dopaminergen Terminalien des Striatum abgeschlossen zu sein, weshalb die ersten 30 Minuten nach Tracerinjektion bewusst nicht erfasst werden und die Messung erst 30 Minuten nach Injektion gestartet wird.

Um die zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen zu untersuchen, wurden Vergleichsmessungen von ^{18}F FET und 6- ^{18}F FDOPA im MFB Hemiparkinsonmodell durchgeführt. Für die ^{18}F FET PET Messung musste kein zusätzlicher Inhibitor verabreicht werden, da ^{18}F FET zwar hirngängig ist, aber nicht weiter verstoffwechselt wird. Somit mussten die Versuchstiere nach der Tracerinjektion auch nicht eingelagert werden. Die ^{18}F FET Injektion (75 MBq in 0,5 ml 0,9 % NaCl) erfolgte in die Schwanzvene. Die PET Messung wurde mit der Injektion gestartet und dauerte 30 Minuten (vgl. Abbildung 25).

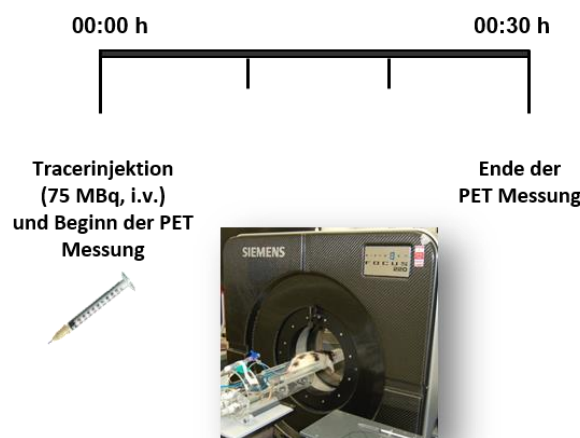


Abbildung 25: Zeitlicher Ablauf der ^{18}F FET Messungen in Teilstudie I.

2.7.1.1 Intensitätsnormierung und Auswertung

Für die Intensitätsnormierung der innerhalb von Teilstudie I erhobenen 6- ^{18}F FDOPA Daten wurde die in 2.6.1 dargestellte Cerebellum VOI ausgelesen. Das durchschnittliche Uptake innerhalb dieser VOI wurde als Backgroundniveau festgelegt und als Referenzwert verwendet. Das Cerebellum eignet sich zur Normalisierung von

6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen besonders gut, weil es nur eine geringe dopaminerge Innervation aufweist und sich das 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake somit interindividuell kaum unterscheidet, d.h. bei allen gemessenen Tieren gleichermaßen niedrig ist. Dies wird daher auch in der Literatur als anerkannte Methode beschrieben (Pangapoulos *et al.*, 1991).

Da es sich bei [¹⁸F]DAA1106 um einen experimentellen Tracer handelt, der bisher ausschließlich in der Präklinik eingesetzt wurde, liegt noch kein allgemein anerkanntes Referenzareal bei der Intensitätsnormierung von [¹⁸F]DAA1106 PET Bildern vor. Daher wurde das globale [¹⁸F]DAA1106 Uptake innerhalb der Gesamthirn VOI (vgl. Kapitel 2.6.1, Abbildung 22a) als Referenzwert zur Intensitätsnormierung verwendet. Ebenso wurde bei der Intensitätsnormierung der [¹⁸F]FET PET Bilder verfahren.

Die statistische Auswertung von Teilstudie I erfolgte durch eine Korrelationsanalyse wie in Kapitel 2.6.2 beschrieben. Ziel dieser Korrelationsanalyse war die Identifizierung der Hirnareale, in denen ein linearer Zusammenhang zwischen erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA und erhöhtem [¹⁸F]DAA1106 Uptake vorlag. Da eine signifikante Korrelation jedoch auch dann besteht, wenn eine sehr geringe Anreicherung des Tracers A mit einer sehr geringen Anreicherung des Tracers B einhergeht, wurde eine VOI erstellt, die nur Hirnareale umfasst, die eine normierte Aktivität >1, also eine Traceranreicherung aufwiesen. Diese VOI wurde mit der r-Karte multipliziert. Der untere Grenzwert der r-Karte wurde entsprechend einer t-Wert Tabelle so skaliert, dass sie nur signifikante positive Korrelationen zeigte, die auf eine gleichsam erhöhte Traceranreicherung und nicht auf das Ausbleiben der Anreicherung in gleichen Arealen zurückzuführen war. Die Analyse der [¹⁸F]FET PET Messungen erfolgte per VOI-Analyse. Hierzu wurde die Traceranreicherung im Bereich der Läsion mit einer das MFB umfassenden VOI (vgl. Abbildung 27b) bestimmt.

2.7.2 Teilstudie II: Präklinische Evaluation von 5- und 6-[¹⁸F]FMT

Neben dem unspezifischen 6-[¹⁸F]FDOPA Signal in neuroinflammatorischen Arealen zeigten die 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen immer wieder eine hohe Backgroundaktivität und starke Einstrahlung aus der Peripherie, was die Quantifizierung erschwerte. Dies machte den Bedarf an geeigneten alternativen Tracern für die Bildgebung der Dopaminsynthese deutlich. In Teilstudie II wurden deshalb die Bildgebungseigenschaften der 6-[¹⁸F]FDOPA Analoga 5- und 6-[¹⁸F]FMT evaluiert und mit 6-[¹⁸F]FDOPA verglichen.

Zur Inhibition der peripheren AADC Aktivität wurde Benserazid verabreicht. Auf die Inhibition von COMT wurde verzichtet, da auf diese Weise getestet werden konnte, wie groß der Einfluss der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) auf die Verstoffwechslung und die damit einhergehende Qualität der entstehenden 6-[¹⁸F]FDOPA PET Bilder ist. Dies erfolgte, indem die PET Messungen mit 6-[¹⁸F]FDOPA (ein Catecholamin und somit Substrat für COMT) mit PET Messungen verglichen wurden, die mit den beiden radiofluorierten Tyrosinanaloga 5- und 6-[¹⁸F]FMT (ihrerseits keine Substrate für COMT) durchgeführt wurden.

Zunächst wurde der Vergleich von 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA im MFB Hemiparkinsonmodell durchgeführt. Das erste Vergleichskriterium war die Eignung der Tracer zur Differenzierung der läsierten (6-OHDA Injektion) und der gesunden Hemisphäre. Hierzu musste eine ausreichend fortgeschrittene Degeneration der dopaminergen Zellkörper gewährleistet sein, weshalb die Messung ausschließlich zum späteren Zeitpunkt (t₂), also 4 Wochen nach 6-OHDA Injektion stattfand. Die 6-[¹⁸F]FMT PET Messungen und die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen in Teilstudie II erfolgten nach dem Messprotokoll, das in Teilstudie I bereits beschrieben wurde (vgl. Kapitel 2.7.1).

Als nächstes folgte die vergleichende Evaluation der Bildgebungseigenschaften von 6-[¹⁸F]FDOPA, 6-[¹⁸F]FMT und 5-[¹⁸F]FMT. Bei diesem Experiment sollte der Einfluss von Neuroinflammation ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden die Messungen ausschließlich in gesunden Tieren durchgeführt. Der Messzeitpunkt t₂ fiel folglich weg.

Im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA gab es zum Zeitpunkt dieser Experimente noch kein etabliertes Messprotokoll für 5- und 6-[¹⁸F]FMT, weshalb diesmal auch der zeitliche

Verlauf der Traceranreicherung von Interesse war, um das optimale Messzeitfenster für zukünftige Messungen zu eruieren. Aus diesem Grund wurden die PET Messungen sofort nach Tracerinjektion (75 MBq in 0,5 ml 0,9 % NaCl, i.v.) gestartet und liefen über einen Zeitraum von zwei Stunden. Die Benserazidinjektion (15mg/kg in 0,5 ml 0,9 % NaCl i.p.) erfolgte bei allen drei Tracern jeweils eine Stunde vor Tracerinjektion. Des Weiteren sollte der Einfluss von Benserazid auf die Verstoffwechslung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT untersucht werden, wodurch die Messungen einmal mit und einmal ohne vorangegangene Benserazidinjektion durchgeführt wurden. Abbildung 26 zeigt den zeitlichen Ablauf der vergleichenden PET Messungen mit 6-[¹⁸F]FDOPA, 5- und 6-[¹⁸F]FMT.

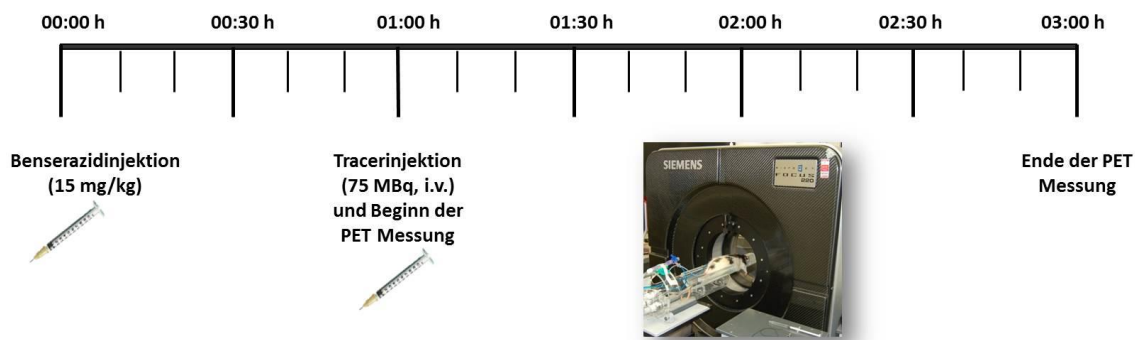


Abbildung 26: Zeitlicher Ablauf der vergleichenden PET Messungen von 6-[¹⁸F]FDOPA, 5- und 6-[¹⁸F]FMT im Rahmen von Teilstudie II.

2.7.2.1 Intensitätsnormierung und Auswertung

Die Intensitätsnormierung des Vergleichs von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell erfolgten auf %ID, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Die Auswertung der Messungen erfolgte per VOI-Analyse der über die Messdauer von 30 Minuten erstellten Summenbilder. Zum einen wurde die Signalstärke innerhalb des gesunden, linken Striatum ermittelt (vgl. Abbildung 27a). Außerdem erfolgte die Quantifizierung des Signals innerhalb des rechten, läsierten Striatum (Hemiparkinson). Dies wurde anhand einer VOI durchgeführt, die exakt der Striatum VOI in Abbildung 27a entsprach, jedoch das rechte, läsierte Striatum umfasste. Aus diesem Grund ist jene VOI nicht wiederholt dargestellt. Das Backgroundniveau wurde anhand des durchschnittlichen Traceruptakes innerhalb der Cerebellum VOI ermittelt

(vgl. Abbildung 22b). Außerdem wurde die Signal to Background Ratio errechnet. Darüber hinaus wurde die Traceranreicherung im Bereich des läsierten MFB (vgl. Abbildung 27b) und das periphere Traceruptake bestimmt. Letzteres erfolgte anhand der Signalstärke innerhalb einer VOI, die im Bereich der Nackenmuskulatur platziert wurde (vgl. Abbildung 27c).

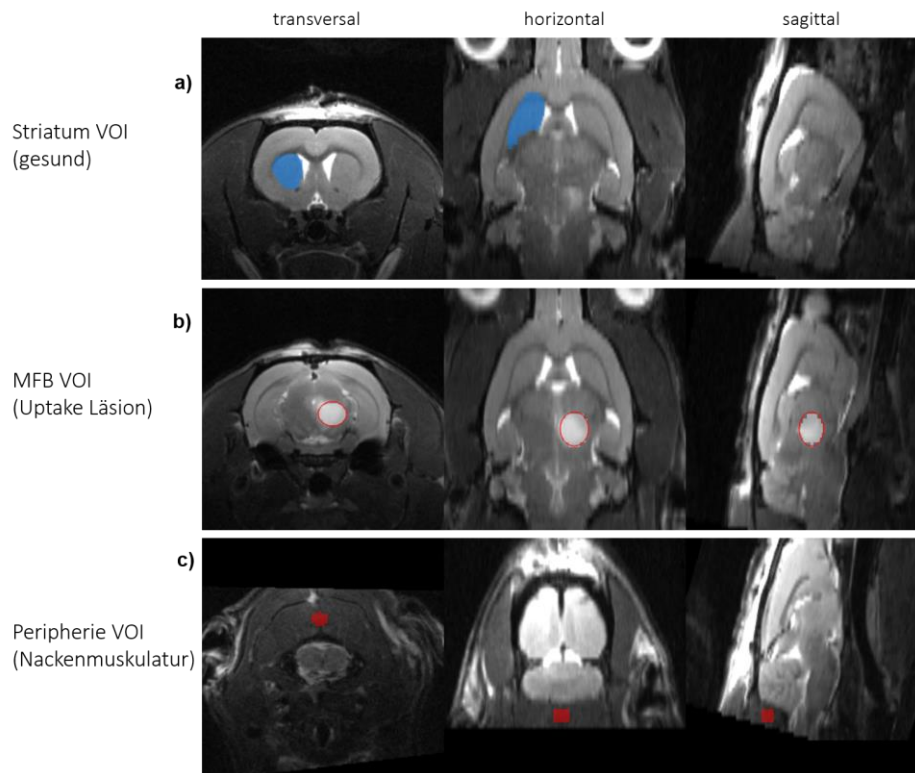


Abbildung 27: VOIs zur Quantifizierung des Tracersignals im Hemiparkinsonmodell.

(a) Striatum VOI zur Quantifizierung der striatalen Traceranreicherung innerhalb der gesunden Kontrollhemisphäre. (b) MFB VOI zur Quantifizierung der Traceranreicherung im Bereich der Läsion. (c) VOI innerhalb der Nackenmuskulatur zur Quantifizierung der peripheren Traceranreicherung.

Die Intensitätsnormierung des Vergleichs von 6- ^{18}F FDOPA, 5- und 6- ^{18}F FMT in gesunden Ratten erfolgte auf %ID, wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben. Die Auswertung der Messungen erfolgte per VOI-Analyse der über die Messdauer von 30 Minuten erstellten Summenbilder. Hier sollten zum einen Biodistribution und Bildgebungseigenschaften bei vorangegangener AADC Inhibition und ohne AADC Inhibition untersucht werden. Dies erfolgte anhand der über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden gemittelten PET Bilder. Für die Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Traceranreicherung wurde die zweistündige Messung in vier aufeinanderfolgende Zeitfenster von jeweils 30 Minuten

aufgeteilt. Daraufhin wurde für jedes dieser Zeitfenster ein Summenbild erstellt. Da die Summenbilder nur eine eingeschränkte Aussage über den zeitlichen Verlauf der Traceranreicherung zulassen, wurden im nächsten Schritt sog. Zeitaktivitätskurven (engl. Time-Activity-Curve) erstellt. Hier wurden zum einen die Aktivität im Striatum, zum anderen die Backgroundaktivität über die gesamte Messdauer von zwei Stunden aufgetragen. Zur Erstellung dieser Zeitaktivitätskurven wurde die zweistündige Messung in 28 Zeitfenster unterteilt, für die jeweils ein Summenbild erstellt wurde. Daraufhin wurde die Traceranreicherung innerhalb der untersuchten Hirnareale für jedes dieser PET Bilder bestimmt. Dies erfolgte ebenfalls per VOI-Analyse. Dafür wurden die gleichen VOIs verwendet, wie zuvor bei der Untersuchung der Biodistribution.

2.7.3 Teilstudie III: Präklinische Evaluation von [¹⁸F]DAA1106

Die PET Messungen zur Untersuchung der Tracerdistribution im Apoplexiemodell wurden eine Woche nach ET-1 Injektion oberhalb der ACA durchgeführt. Sie dienten der Evaluation und dem Vergleich der TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714. Da auch hier der zeitliche Verlauf der Traceranreicherung von Interesse war, starteten die Messungen mit Tracerinjektion (50-70 MBq in 0,5 ml 0,9 % NaCl, i.v.) und dauerten zwei Stunden, wie in Abbildung 28 dargestellt. Um eine Aussage über den Einfluss der physiologischen TSPO-Expression auf die Quantifizierung treffen zu können, wurden die Messungen mit [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gleicher Weise mit gesunden Ratten wiederholt.

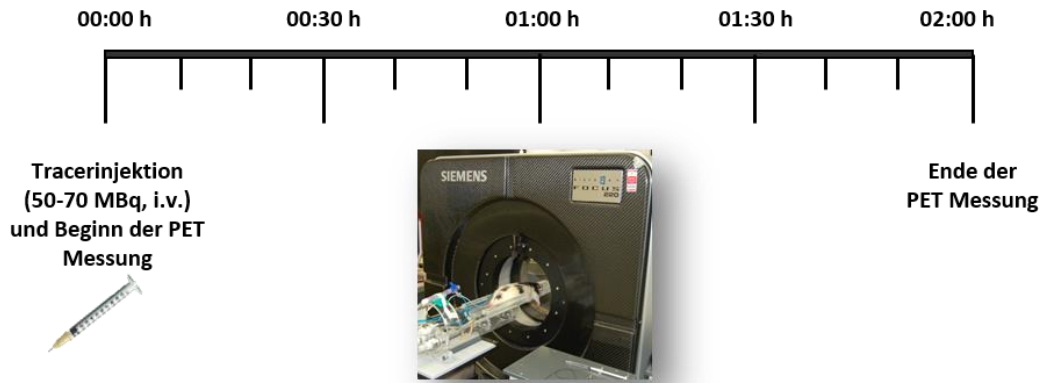


Abbildung 28: Zeitlicher Ablauf der vergleichenden PET Messungen von $[^{18}\text{F}]\text{DAA1106}$ und $6\text{-}[^{18}\text{F}]\text{FDOPA}$ im Rahmen von Teilstudie III.

2.7.3.1 Intensitätsnormierung und Auswertung

Die Intensitätsnormierung der innerhalb von Teilstudie III erhobenen $[^{18}\text{F}]\text{DAA1106}$ und $[^{18}\text{F}]\text{DPA714}$ PET Bilder im Apoplexiemodell erfolgten auf %ID, wie in 2.6.1 beschrieben. Für die Untersuchung der Biodistribution und Eruiierung der Bildgebungseigenschaften wurde zunächst eine VOI-Analyse der Summenbilder über zwei Stunden durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die durchschnittliche Traceranreicherung innerhalb der Läsion ermittelt. Dies erfolgte anhand der Apoplexie VOI, die in Abbildung 29a dargestellt ist. Zur Ermittlung der durchschnittlichen Backgroundaktivität wurde ein Areal gewählt, das weder eine $[^{18}\text{F}]\text{DPA714}$ noch eine $[^{18}\text{F}]\text{DAA1106}$ Anreicherung aufwies. Dies war im unteren Bereich des Striatum der Fall. In diesem Bereich wurde entsprechend Abbildung 29b eine VOI gesetzt. Darüber hinaus wurde die Signal to Background Ratio errechnet und die periphere Traceranreicherung bestimmt. Zur Bestimmung der peripheren Traceranreicherung wurde erneut eine VOI innerhalb der Nackenmuskulatur verwendet (vgl. Abbildung 27c). Die VOI zur Quantifizierung des Traceruptakes im Knochen wurde über dem Schultergürtel platziert. Da dieser Bereich zwar innerhalb des Field of Views (FOV) des PET Scanners, jedoch nicht des MRTs lag, kann die Knochen VOI im Folgenden nicht im MRT Bild dargestellt werden.

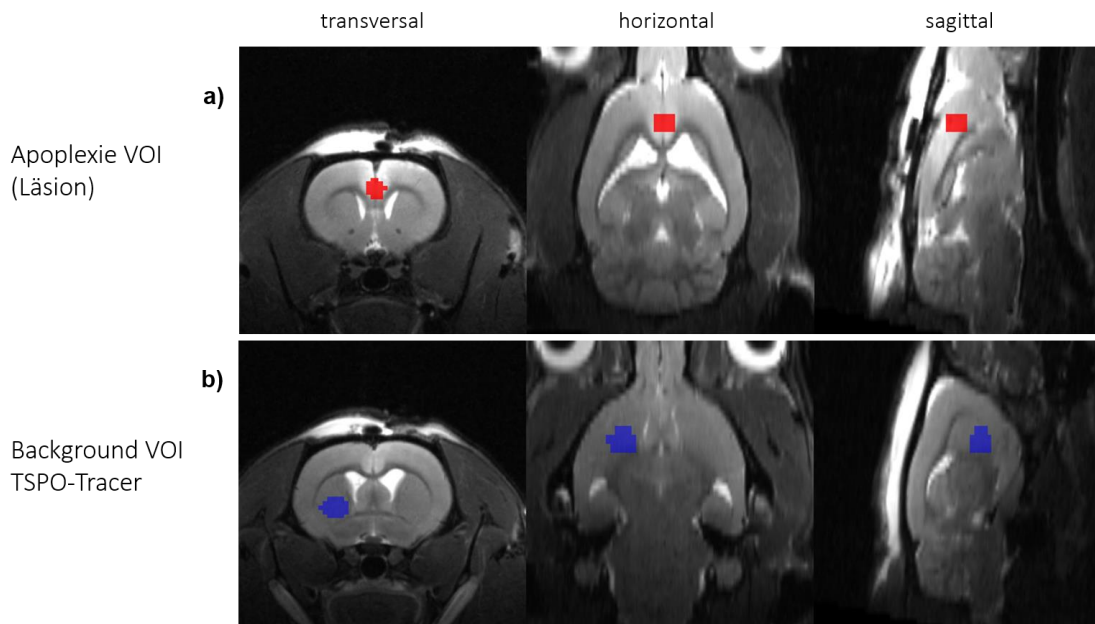


Abbildung 29: VOIs zur Quantifizierung des Tracersignals im Apoplexiemodell.

(a) VOI zur Quantifizierung der [^{18}F]DAA1106 und [^{18}F]DPA714 Anreicherung im Bereich der Läsion (Apoplexie) und (b) zur Bestimmung der Backgroundaktivität. Hierfür wurden die PET Bilder beider Tracer über alle Tiere gemittelt und eine VOI dort platziert, wo das insgesamt niedrigste Tracersignal zu erkennen war. In diesem Fall war das niedrigste Signal im Striatum.

Daraufhin erfolgte die Analyse des zeitlichen Verlaufs der Traceranreicherung. Hierfür wurde die zweistündige Messung in vier aufeinanderfolgende Zeitfenster von jeweils 30 Minuten aufgeteilt und für jedes der Zeitfenster ein Summenbild erstellt. Daraufhin wurden Zeitaktivitätskurven für die Traceranreicherung im Bereich der Läsion und für die Backgroundaktivität über die gesamte Messdauer von zwei Stunden erstellt. Die Erstellung der Zeitaktivitätskurven erfolgte wie bereits in Kapitel 2.7.2.1 beschrieben. Hierfür wurden die gleichen VOIs verwendet, wie zuvor bei der Auswertung der Summenbilder über zwei Stunden.

2.8 Perfusion und Gehirnentnahme nach Versuchsende

Am Tag nach Abschluss der einzelnen Teilstudien erfolgte die transcorticale Perfusion mit Fixativ und anschließender Gehirnentnahme. Die Narkotisierung erfolgte wie unter Kapitel 2.2 beschrieben. Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurde die zu perfundierende Ratte mit dem Brustkorb nach oben auf einer Styroporplatte fixiert und in

eine Perfusionswanne zum Auffangen des Bluts und der Perfusionsflüssigkeit platziert. Danach wurde das Brustbein ertastet, der Bauchraum unterhalb des Brustbeins geöffnet und eine laterale Inzision vorgenommen. Dabei war darauf zu achten, weder das Zwerchfell oberhalb des Bauchraums, noch die im Bauchraum befindlichen Organe zu verletzen. Nun wurde das Zwerchfell vorsichtig aufgeschnitten und der Brustkorb durch zwei sagittale Inzisionen rechts und links durch den Brustkorb geöffnet. Die Rippen wurden dabei auf beiden Seiten bis hin zum Schlüsselbein durchtrennt. Daraufhin konnte das Herz freigelegt werden, indem man das Brustbein vorsichtig nach vorne klappte. Gewebe oder Fett, das zwischen Brustkorb und Herz lag, wurde dabei entfernt. Mittels einer Knopfsonde, die über einen Schlauch an eine Perfusionspumpe (PLP330, Behr Labor Technik[®]) angeschlossen war, wurden zunächst 500 ml phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) (Roti[®]fair PBS 7.4, Carl Roth) und anschließend 500 ml des Fixativs (4 % Paraformaldehyd (PFA) (Paraformaldehyde P6148, Sigma-Aldrich[®]) in PBS (pH 7,4) durch das Herz in den Körperkreislauf der Ratte gepumpt. Hierzu wird die Knopfsonde in das posteriore Ende des linken Ventrikels gestochen und bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Als Abfluss wird das rechte Atrium durch einen Einschnitt geöffnet und daraufhin die Perfusionspumpe eingeschaltet. Wenige Sekunden nach Einfließen des Fixativs erliegt die spontane Atmung und der Tod des Versuchstieres tritt ein. Nach der Perfusion wird das Gehirn entnommen. Dieses wird nach Entnahme weitere 24 h in PFA Perfluorlösung nachfixiert und dann zur Kryoprotektion für 1 bis 2 Tage in Saccharoselösung (30 % Saccharose in PBS) gelegt. Danach wird das Gehirn in Methylbutan, das zuvor durch flüssigen Stickstoff auf -50°C bis -60°C gekühlt wurde, schockgefroren und bis zur Anfertigung der Kryoschnitte in einem Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt.

2.9 Immunhistochemie

Zur Verifizierung der [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans in Teilstudie I wurden immunhistochemische Färbungen mit den Antikörpern Anti-Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1), einem Antikörper zur Visualisierung von Neuroinflammation, und Anti-TH (Anti-Tyrosinhydroxylase), einem Antikörper zur Visualisierung der dopaminergen Neurodegeneration, angefertigt. Für die Antikörperfärbungen wurden Kryoschnitte der zuvor entnommenen und

schockgefrorenen Rattenhirne angefertigt. Die Anfertigung der Schnitte erfolgte mit einem Kryostat der Marke Leica (CM1950, Leica Biosystems). Die Gehirnproben mussten zunächst zugeschnitten werden. Hierzu erfolgte ein Coronalchnitt durch das Cerebellum, um eine gerade Schnittfläche zu erhalten, die mit Hilfe eines Einbettmediums (Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound, Sakura) auf der Objektplatte fixiert wurde. Nach Gefrieren des OCT wurde die Objektplatte in den Objektkopf eingespannt und Schnitte einer Dicke von 30-35 µm angefertigt. Die Schnitte wurden auf raumtemperierte Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhäsionsobjektträger) aufgezogen (3 Schnitte pro Objektträger) und bis zur Anfertigung der immunhistochemischen Färbungen in einem Gefrierschrank bei -80°C aufbewahrt.

2.9.1 Antikörperfärbung mit Anti-Iba1

Anti-Iba1 Rabbit (rabbit polyclonal, 019-19741, wako chemicals®) ist ein polyklonaler Antikörper, der aus dem Blutserum immunisierter Kaninchen gewonnen wurde und der spezifisch an den Allograft inflammatory Factor 1 (AIF-1) bindet. In neuerer Literatur wird dieses Protein als Ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) bezeichnet. Iba1 wird ausschließlich im Zytoplasma von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Die Expression wird im Zuge von Neuroinflammation hochreguliert, was die Unterscheidung von ruhender und aktivierter Mikroglia und Makrophagen ermöglicht (Sasaki *et al.*, 2001; Ohsawa *et al.*, 2004).

Vor den immunhistochemischen Färbungen wurden die Schnitte zunächst über Nacht in einem -20°C Gefrierschrank gelagert. Danach wurden sie weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, um eine bessere Haftung auf dem Objektträger zu erzielen. Die Antikörperfärbungen mit Iba1 wurden nach einem an Ito *et al.* angelehnten Protokoll durchgeführt (Ito *et al.*, 2001). Bevor mit der Färbung begonnen wurde, wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer platziert und mit einem Wachsstift (PAP pen, Sigma-Aldrich®) umrandet, damit die aufpipettierten Flüssigkeiten nicht vom horizontal gelagerten Objektträger herunterfließen konnten. Zunächst wurden die Schnitte zur Nachfixierung 24 Stunden mit 4 % PFA (Paraformaldehyde P6148, Sigma-Aldrich®) in PBS (Roti®fair PBS 7.4, Carl Roth) bei 4°C in einem Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das PFA abgegossen und die Schnitte 5 Minuten mit PBS gewaschen. Auf das im ursprünglichen Protokoll nach (Ito *et al.*, 2001) vorgesehene

Quenchen mit 3 % H_2O_2 wurde verzichtet, da sich die Schnitte dabei häufig von den Objektträgern lösten. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen und somit zur Reduktion der Backgroundfärbung wurden auf jeden Objektträger mindesten 400 μ l 5 % Normal Goat Serum in PBS und 0,1 % Triton X-100 (Triton™ X-100 T8787, Sigma-Aldrich®) pipettiert und dann bei Raumtemperatur in der geschlossenen feuchten Kammer für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Primärantikörper Iba1 aufgetragen. Vorheriges Waschen mit PBS würde zu einem schlechteren Blocken unspezifischer Bindungen führen und ist daher zu unterlassen. Der Primärantikörper Anti-Iba1 Rabbit wurde bei jeder Färbeprozedur frisch angesetzt. Dies erfolgte in einer Verdünnung von 1:1000 in 1 % Ziegennormalserum (NGS). Für jeden Objektträger wurden 400 μ l verwendet. Die Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper dauerte 24 Stunden bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Schnitte zunächst 5 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurde der Sekundärantikörper (Goat Anti-Rabbit-IgG BA-100, Vector Laboratories) in einer Verdünnung von 1:100 in 1 % NGS und PBS aufgetragen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Vectastain ABC angesetzt, indem je 2,5 ml PBS mit einem Tropfen Substanz A (Avidin) und einem Tropfen Substanz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase) gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach Ablauf der 30-minütige Inkubationszeit des Primärantikörpers wurden die Schnitte erneut 5 Minuten mit PBS gewaschen und daraufhin 30 Minuten mit dem vorbereiteten Vectastain ABC inkubiert. Als nächstes wurden die Schnitte erneut mit PBS gewaschen. Die Anfärbung der Schnitte erfolgte mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB) Lösung. Zu Beginn der Studie wurden für die DAB Färbung zunächst Tabletten ohne Metallverstärkung (DAB-Tabletten D42923, Sigma-Aldrich®) genutzt, später jedoch DAB Tabletten mit Metallverstärkung durch Cobaltchlorid ($CoCl_2$) (DAB Tabletten D42923, Sigma-Aldrich®), da diese ein wesentlich besseres Ergebnis erzielten. Das ist auch der Grund, wieso einige Schnitte aufgrund des Cobaltchlorids eine bläuliche Färbung aufweisen (vgl. Abbildung 33 und Abbildung 34) und andere nicht (vgl. Abbildung 38 und Abbildung 39). Aufgrund der gesundheitsschädlichen Eigenschaften von DAB erfolgte das Ansetzen der Lösung unter einem Abzug. Hierfür wurde eine DAB Tablette in 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurde eine H_2O_2 Tablette (2 mg/ml) hinzugegeben, durch die die Farbreaktion gestartet wurde. Die Inkubation der Schnitte mit DAB Lösung sollte nicht länger als 10 Minuten andauern. Eine längere Inkubationszeit würde zu einer starken Backgroundfärbung

führen und die Differenzierung von Backgroundfärbung und Mikrogliazellen bzw. Makrophagen erschweren. Nach Ablauf der 10-minütigen Inkubationszeit wurde das DAB in einen separaten, speziell für die DAB Entsorgung vorgesehenen Abfallbehälter abgegossen und es erfolgte eine Waschung mit PBS. Im Anschluss folgte die Trocknung der Schnitte mit Hilfe einer Alkoholreihe nach folgendem Ablauf: 2 Min in 70 % Ethanol (Ethanol absolut, für HPLC ≥ 99.8 %, Sigma-Aldrich[®]), 2 Min in 96% Ethanol, 2 Min in 100 % Ethanol, 2 Min in 100 % Ethanol, 2 min in Roti-Histol (Roti[®]-Histol, Carl Roth). Danach wurden die Schnitte einzeln mit einer Pinzette aus dem Roti-Histol Bad genommen. Nach dem Abtropfen des Objektträgers wurden die Schnitte mit je einem Tropfen Entellan (Entellan[®] 1.07960, Sigma-Aldrich[®]) benetzt und mit Deckgläsern eingedeckt. Die Trocknung der eingedeckten Schnitte erfolgte über Nacht unter einem Abzug. Bevor die Schnitte unter dem Mikroskop betrachtet werden konnten, mussten etwaige Entellanrückstände vorsichtig entfernt werden. Hierzu wurden die Objektträger kurz in ein 70 % Isopropanol Bad (2-Propanol ≥ 99.0 %, VWR ChemicalsTM) gestellt. Daraufhin konnten die Rückstände mit einer Rasierklinge entfernt werden. Für die Betrachtung der Schnitte wurde das Mikroskop Leica DM6000 genutzt.

Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten mit der integrierten Software Leica Application Suite (LAS). Nachdem die Skalierung der mikroskopischen Aufnahmen automatisch durch das Programm eingefügt wurde, wurde die Korrektheit der Skalierungen manuell mit einem Objektmikrometer geprüft. Die durch das Programm eingefügte Skalierung entsprach der des Objektmikrometers und wurde daraufhin für alle mikroskopischen Aufnahmen verwendet.

2.9.2 Antikörperfärbung mit Anti-TH

Anti-Tyrosinhydroxylase (TH) ist ein Antikörper, der an das Enzym Tyrosinhydroxylase bindet, welches in den dopaminergen Zellkörpern der Substantia Nigra exprimiert wird und für die Verstoffwechslung von Tyrosin zu L-DOPA verantwortlich ist (vgl. Kapitel 1.2). Ratten mit unilateraler 6-OHDA Injektion zeigen eine geringere Anzahl dopaminergere Zellkörper und weisen folglich auch eine geringere TH Färbung auf. Mit TH Färbungen kann somit die Integrität der dopaminergen Zellkörper und die TH Aktivität im Striatum visualisiert werden (Mazloom & Smith, 2006). Die Antikörperfärbung erfolgte mit Hilfe eines HRP (Meerrettichperoxidase

engl. horseradish peroxidase) mouse anti-Immunglobulin (IgG) Substrat Kits (Vectastain ABC-Kit, Vector Laboratories).

Die Vorbereitung der Schnitte auf die TH Färbung erfolgte wie bereits zuvor beschrieben. Die Schnitte wurden zunächst auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ überführt und daraufhin für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Für eine gleichmäßige Verteilung der aufpipettierten Flüssigkeiten wurde auch diesmal ein PAP pen verwendet und die Färbeprozedur erfolgte in einer feuchten Kammer. Die Nachfixierung mit 4 % PFA dauerte 10 Minuten. Danach wurde mit 0,5 % H_2O_2 in Aqua dest. inkubiert, das nach einer Stunde abgegossen wurde. Daraufhin folgten drei Waschschrte mit PBS für eine Dauer von jeweils 10 Minuten. Nach dem Waschen wurde das Blocking Serum aus dem ABC Kit aufgetragen. Hierzu wurden 3 Tropfen Normal Horse Serum (NHS) (im ABC Kit enthalten) in 10 ml PBS mit 0,5 % Triton-X 100 gemischt. Im Gegensatz zu Iba1 wurden die Schnitte bei der TH Färbung nach dem Blocken drei Mal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Danach wurde der Primärantikörper (monoklonaler mouse-anti-TH antibody, Sigma Aldrich[®]) aufgetragen, der in einer Verdünnung von 1:5000 in PBS mit 0,1 % NHS angesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über Nacht.

Am nächsten Tag wurde erneut dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS gewaschen. Dann erfolgte die Behandlung der Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper Anti-Mouse-IgG (im ABC Kit enthalten). Hierzu wurden zwei Tropfen des Sekundärantikörperserums in 10 ml PBS pipettiert und auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Daraufhin wurde erneut dreimal für jeweils 10 Min mit PBS gewaschen. Währenddessen erfolgte das Ansetzen der Vectastain ABC Lösung, für die 2 Tropfen der Substanz A (Avidin) mit 2 Tropfen Substanz B (biotinylierte Meerrettich Peroxidase) mit 1 % Polyethylenglycol in 10 ml PBS gemischt und für 30 Minuten stehen gelassen wurde. Nach dem Waschen wurde die ABC Lösung auf die Schnitte pipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Schnitte erneut dreimal für 10 Minuten mit PBS gewaschen. Schließlich erfolgte die DAB Färbung und die Entwässerung durch eine Alkoholreihe und Roti-Histol (vgl. Kapitel 2.9.1), woraufhin die Schnitte in Entellan eingedeckt und über Nacht im Abzug getrocknet und schließlich gereinigt wurden.

3 Ergebnisse Teilstudie I: Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation im Hemiparkinsonmodell

3.1 Eine Woche nach striataler Injektion

Das Messkollektiv der Ratten, bei denen 6-OHDA striatal injiziert wurde, umfasste insgesamt 11 Ratten. Diese wurden nachträglich entsprechend der Stärke ihrer neuroinflammatorischen Immunantwort in zwei Gruppen eingeteilt. Die Versuchsgruppe umfasste 5 Tiere, deren [¹⁸F]DAA1106 PET Scans eine starke neuroinflammatorische Immunantwort zeigte. Die Kontrollgruppe zeigte hingegen keine oder nur eine schwache Neuroinflammation und umfasste insgesamt 6 Tiere.

3.1.1 PET bei starker Neuroinflammation

Eine Woche nach Injektion (t1) des 6-OHDA zeigten die 5 Ratten, bei denen mit [¹⁸F]DAA1106 eine starke Inflammation detektiert werden konnte, eine ebenso starke 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung. Diese waren colokalisiert um den Einstichkanal im rechten primären Motorcortex (im Folgenden Cortex genannt) und im rechten Corpus Striatum (im Folgenden Striatum genannt) (vgl. Abbildung 30b und Abbildung 30c). Die contralaterale Hemisphäre zeigte hingegen keine Neuroinflammation und auch keine 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im Cortex. Trotz vorangegangener 6-OHDA Injektion, konnte keine Reduktion des 6-[¹⁸F]FDOPA Uptakes gegenüber der gesunden Hemisphäre detektiert werden.

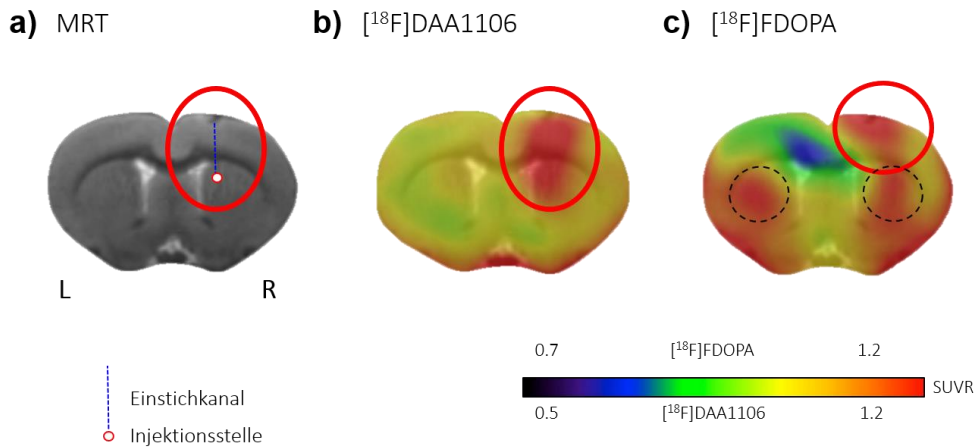


Abbildung 30: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA bei starker neuroinflammatorischer Immunantwort eine Woche nach 6-OHDA Injektion (Transversalschnitt).

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des Einstichkanals im Cortex sowie der Injektionsstelle im Striatum. (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=5). Das erhöhte [¹⁸F]DAA1106 Uptake visualisiert die Neuroinflammation um die Einstichstelle im Cortex und die Injektionsstelle im Striatum (rot umkreist). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=5). Zu erkennen ist ein im Vergleich zur contralateralen Kontrolle unverändertes 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake im Striatum (schwarz umkreist) und ein erhöhtes 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake im Cortex (rot umkreist), welches direkt um die Einstichstelle lokalisiert ist.

3.1.2 PET bei schwacher Neuroinflammation

Eine Woche nach Injektion (t1) des 6-OHDA zeigten die 6 Ratten, bei denen mit [¹⁸F]DAA1106 keine oder nur eine schwache Inflammation detektiert wurde (vgl. Abbildung 30b) auch kein erhöhtes 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake um den Einstichkanal und die Injektionsstelle, sondern ausschließlich das gegenüber der contralateralen Hemisphäre unveränderte Uptake im Striatum (vgl. Abbildung 31c).

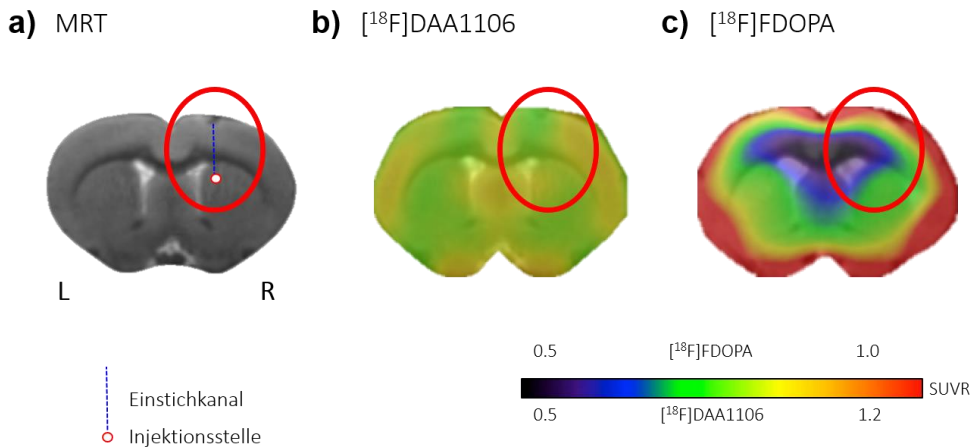


Abbildung 31: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA bei schwacher neuroinflammatorischer Immunantwort eine Woche nach 6-OHDA Injektion (Transversalschnitt).

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des Einstichkanals im Cortex sowie der Injektionsstelle im Striatum. (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=6). Nach der 6-OHDA Injektion kam es zu keiner neuroinflammatorischen Immunantwort. (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen (n=6). Analog zur [¹⁸F]DAA1106 PET Messung zeigte auch die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messung kein erhöhtes Traceruptake im Vergleich zur contralateralen Kontrolle.

3.1.3 Korrelationsanalyse zwischen 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106

Um den beobachteten Zusammenhang von Neuroinflammation und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung auf seine statistische Signifikanz zu prüfen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen [¹⁸F]DAA1106- und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake über alle 11 Tiere berechnet. Dass die Versuchstiere mit schwacher Neuroinflammation in die Stichprobe für die Korrelationsanalyse eingeschlossen werden, ist insofern legitim, als dass sich hierdurch nur das Streuungsmaß der Stichprobe verändert. Das Ergebnis der Korrelationsanalyse ist in Abbildung 32 in Form einer für multiples Testen korrigierten r-Karte dargestellt, die auf ein MRT projiziert wurde.

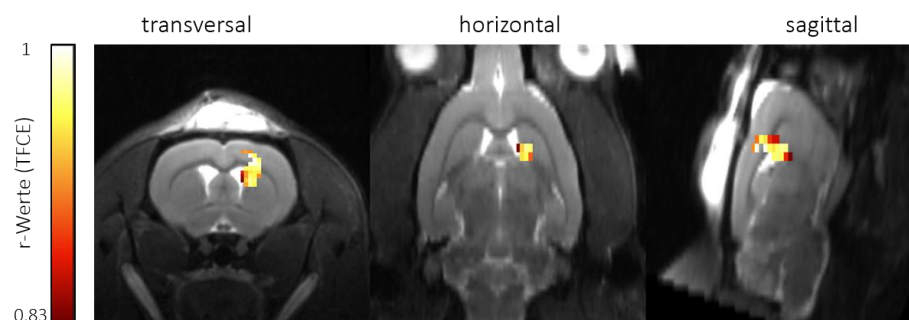


Abbildung 32: Signifikante Korrelationen zwischen [¹⁸F]DAA1106 - und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake eine Woche nach 6-OHDA Injektion ins rechte Striatum in allen drei Schnittebenen.

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,5$ ergab sich entsprechend der Freiheitsgrade ($df=9$) ein kritischer r-Wert von 0,83. Die Korrelationsanalyse zeigte eine signifikante positive Korrelation im Bereich der Einstichstelle im Cortex und der Injektionsstelle im Striatum.

3.1.4 Immunhistochemie bei starker Neuroinflammation

Um die Spezifität des bisher nur experimentell eingesetzten Inflammationstracers [¹⁸F]DAA1106 zu überprüfen, wurden immunhistochemische Färbungen der Ratten angefertigt, die im PET eine starke [¹⁸F]DAA1106 Anreicherung im Bereich der Läsion zeigten. Mit Hilfe des Antikörpers Anti-Iba1 wurde das in aktivierten Mikrogliazellen überexprimierte Protein Iba1 angefärbt und der auf diese Weise visualisierte Ort der Neuroinflammation mit den [¹⁸F]DAA1106 Anreicherungen der PET Bilder verglichen (vgl. Abbildung 33).

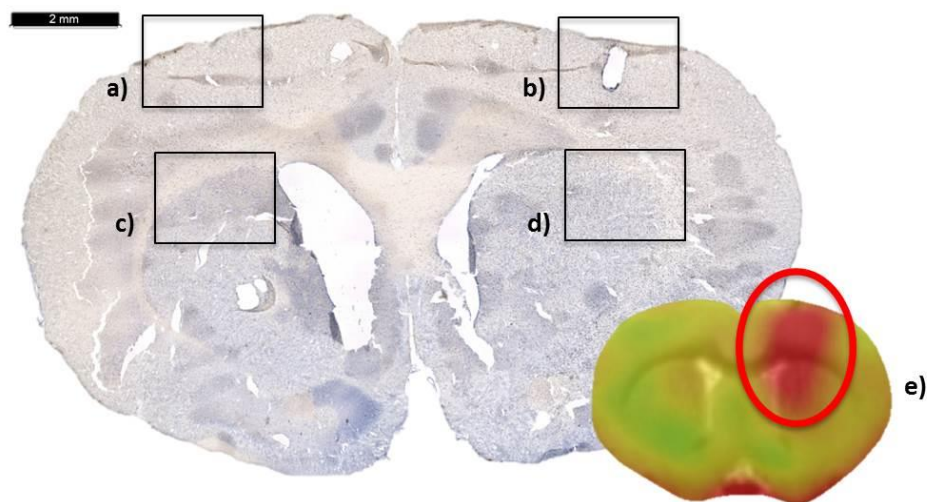


Abbildung 33: Übersicht der Iba1 Färbung eines Transversalschnitts durch das Striatum eine Woche nach 6-OHDA Injektion (Skalierung 2mm).

(a) Linker contralateraler Cortex (Kontrolle). (b) Einstichkanal im rechten läsierten Cortex. (c) Contralaterales Striatum (Kontrolle). (d) Injektionsstelle im rechten läsierten Striatum. (e) Zugehöriges PET Bild des gleichen Tieres, das anhand des [¹⁸F]DAA1106 Uptakes eine starke Neuroinflammation zeigte.

Verglichen wurden der Einstichkanal im Cortex (Abbildung 33b) sowie das läionierte Striatum (Abbildung 33d) mit den entsprechenden contralateralen Arealen (Abbildung 33a und c), die als gesunde Kontrolle dienten. Abbildung 34 zeigt jene Hirnareale in der Detailansicht. Die ipsilaterale Hemisphäre zeigt dabei eine deutlich stärkere Anfärbung einer hohen Anzahl von Mikrogliazellen, sowohl um den Einstichkanal im Cortex (Abbildung 34b) als auch im läionierten Striatum (Abbildung 34d). Die contralaterale Hemisphäre zeigt hingegen eine deutlich schwächere Anfärbung der in geringerer Anzahl vorliegenden Mikrogliazellen (Abbildung 34 a und c).

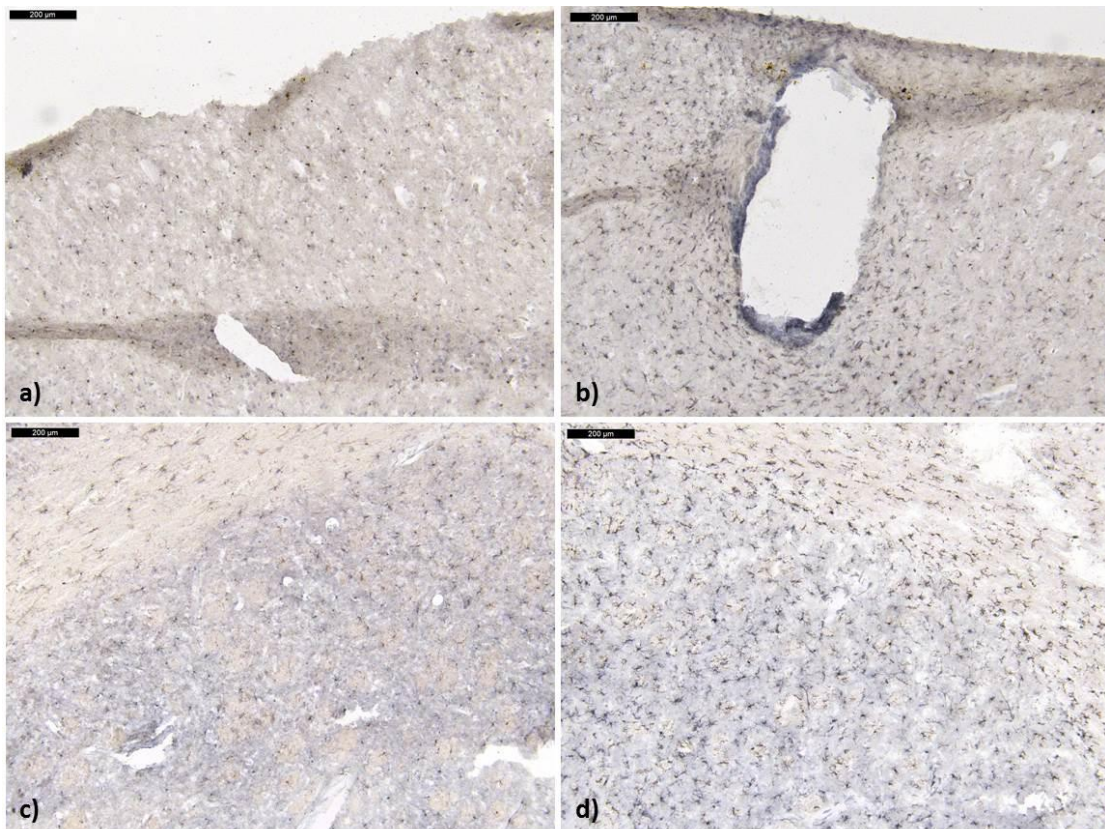


Abbildung 34: Detailansicht der Iba1 Färbung eines Transversalschnitts durch das Striatum eine Woche nach 6-OHDA Injektion (Skalierung 200 µm).

(a) Contralateraler linker Cortex (Kontrolle) mit schwacher Iba1 Färbung und geringerer Anzahl von Mikrogliazellen. (b) Läsionierter Cortex mit starker Iba1 Färbung, der den oberen Teil des Einstichkanals und die um ihn lokalisierten zahlreichen Mikrogliazellen zeigt. (c) Contralaterales linkes Striatum (Kontrolle) mit schwacher Iba 1 Färbung und geringerer Anzahl von Mikrogliazellen. (d) Läsioniertes Striatum mit starker Iba1 Färbung und höherer Anzahl von Mikrogliazellen.

Des Weiteren wurde die Mikrogliaaktivierung um die Injektionsstelle und die gleiche Region in der contralateralen Hemisphäre untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt. Auch hier zeigt die läsionierte Hemisphäre eine deutlich stärkere Iba1 Immunreaktivität als die contralaterale Hemisphäre. Um die Injektionsstelle sind zahlreiche Mikrogliazellen eingewandert, die im Gegensatz zu den Mikrogliazellen in der oberen Aufnahme eine eher amöboide Form aufweisen. Die im oberen Teil befindlichen Mikrogliazellen weisen eine starke Ramifizierung auf. Diese ist auf der contralateralen Seite nicht zu erkennen.

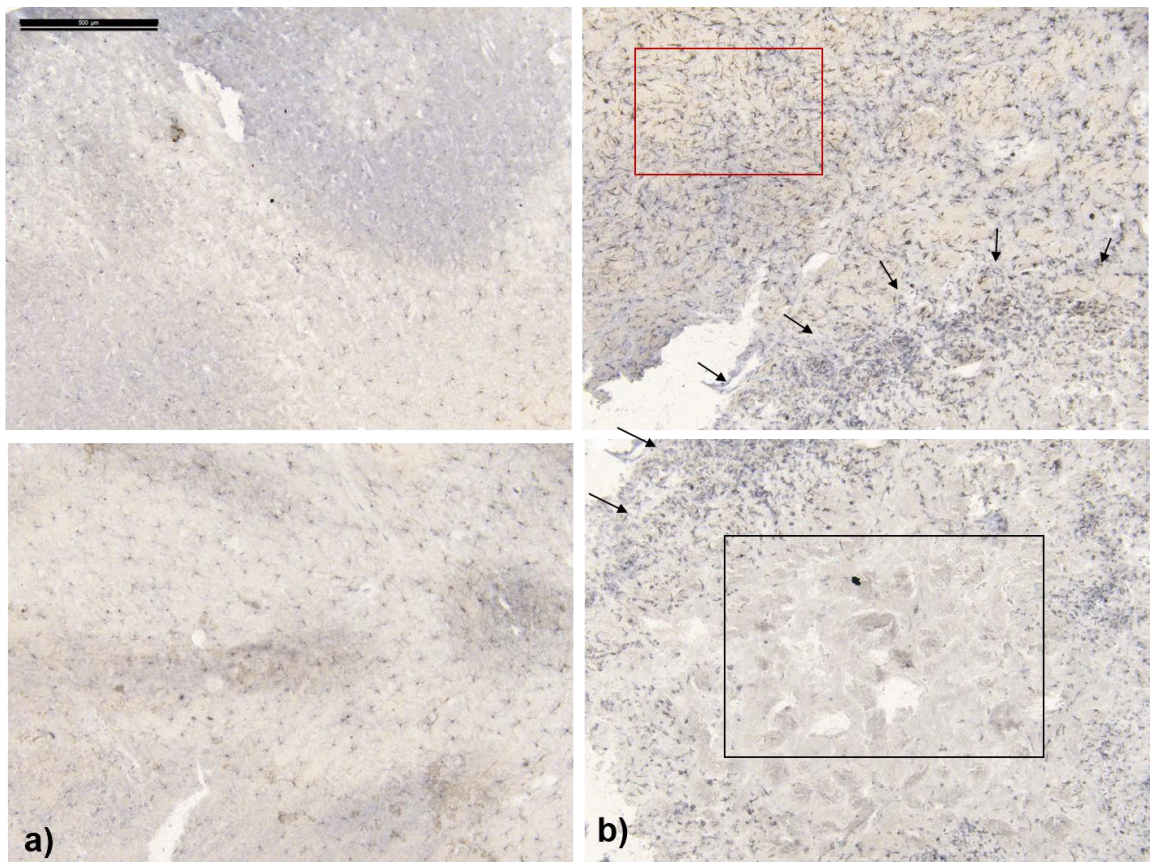


Abbildung 35: Detailansicht der Iba1 Färbung eines Transversalschnitts durch die Injektionsstelle im rechten Striatum eine Woche nach 6-OHDA Injektion (Skalierung 500 µm).

(a) Contralaterales linkes Striatum (Kontrolle) mit schwacher Iba1 Färbung und geringer Anzahl an schwach ramifizierten Mikrogliazellen. (b) Injektionsstelle im Striatum (schwarze Umrandung) mit zerstörtem neuronalen Gewebe, das von immigrierten Mikrogliazellen umgeben ist (schwarze Pfeile). Oberhalb der Läsion weisen die Mikrogliazellen eine starke Ramifizierung auf (rote Umrandung).

Um den Phänotyp der Mikrogliazellen genauer bestimmen zu können, wurden abschließend weitere Bilder mit stärkerer Vergrößerung aufgenommen. Diese sind in Abbildung 36 aufgeführt.

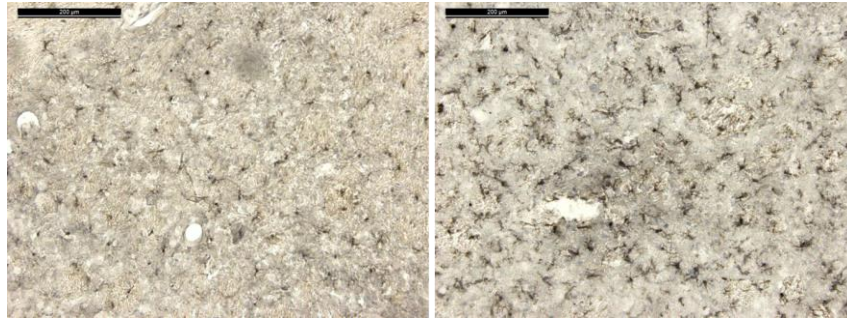


Abbildung 36: Vergleich des Phänotyps der Mikrogliazellen innerhalb des gesunden Striatum (links) und des läsierten Striatum im Bereich der 6-OHDA Läsion (rechts) (Skalierung 200 µm).

Vergleicht man die Mikrogliazellen des gesunden und des läsierten Striatum, so fällt die deutlich stärkere Färbung und Ramifizierung der Mikrogliazellen im Bereich der Läsion auf. Der in der Literatur beschriebene, für aktivierte Mikrogliazellen charakteristische amöboide Phänotyp ist hingegen nicht zu erkennen. Die geringere Anfärbung im contralateralen Striatum weist auf eine schwächere Iba1-Expression hin. Die Mikrogliazellen der contralateralen Hemisphäre liegen vermutlich im ruhenden Zustand vor. Auch sie weisen einen ramifizierten Phänotyp auf, allerdings ist die Ramifizierung deutlich schwächer als die der aktivierten Mikrogliazellen im Bereich der Läsion.

3.2 Vier Wochen nach striataler Injektion

Da bei den Tieren mit schwacher Neuroinflammation (n=6) bereits eine Woche nach der Operation weder ein erhöhtes 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake noch eine [¹⁸F]DAA1106 Anreicherung festgestellt werden konnte, wurden die PET Messungen bei diesen Tieren nach vier Wochen nicht wiederholt. Zum Versuchszeitpunkt t2 wurden somit nur die 5 Versuchstiere im PET gemessen, die zu t1 eine Neuroinflammation aufwiesen (vgl. 3.1.1). Die Ergebnisse der PET Messungen zu Versuchszeitpunkt t2 sind im Folgenden aufgeführt.

3.2.1 PET bei starker Neuroinflammation

Vier Wochen nach der Operation (t2) war immer noch eine [¹⁸F]DAA1106 Anreicherung um die Einstichstelle im Cortex und die Injektionsstelle im Striatum zu erkennen (Abbildung 37). Die Anreicherung war im Vergleich zur ersten Woche post Op (t1) deutlich schwächer (SUVR 0,9 gegenüber 1,2) und lag nominal nicht über Backgroundniveau. Das 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake in den zuvor genannten Arealen war im Vergleich zur contralateralen Hemisphäre zwar erhöht (SUVR 0,9 gegenüber 0,7), verglichen mit t1 jedoch reduziert (SUVR 0,9 gegenüber 1,2). Auch wenn sowohl die [¹⁸F]DAA1106 als auch die 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung in den läsierten Arealen zurückging, schien die [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung nicht im gleichen Maße colokalisiert zu sein, wie dies noch zu t1 der Fall war. Des Weiteren wiesen die Messungen vier Wochen nach der Operation eine höhere Backgroundaktivität auf, sodass die ausgelesenen SUVRs im Bereich der Läsion nicht über Backgroundniveau lagen. Außerdem konnte auch vier Wochen nach 6-OHDA Injektion keine Reduktion des Dopamin Turnovers innerhalb des Striatum der läsierten Hemisphäre nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden vier Wochen nach der Operation nicht nur die [¹⁸F]DAA1106 PET Bilder mithilfe der immunhistochemischen Färbungen überprüft, sondern auch die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Bilder (vgl. Kapitel 3.2.3).

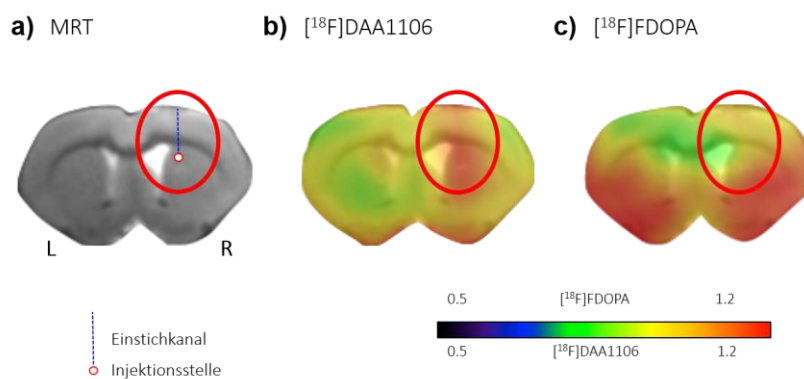


Abbildung 37: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA bei starker neuroinflammatorischer Immunantwort vier Wochen nach 6-OHDA Injektion (Transversalschnitt).

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des Einstichkanals im Cortex sowie der Injektionsstelle im Striatum. (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=5). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=5).

3.2.2 Korrelationsanalyse zwischen 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,5$ ergab sich entsprechend der Freiheitsgrade ($df=3$) ein kritischer r-Wert von 0,88 den keiner der Gehirnvoxel erreichte. Wie bereits bei der Sichtung der PET Bilder zu vermuten war, ergab die Analyse des [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptakes vier Wochen nach striataler 6-OHDA Injektion im Unterschied zu t1 somit keine signifikante Korrelation (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Immunhistochemie bei starker Neuroinflammation

Vier Wochen nach der Operation wurden ebenfalls Kryoschnitte der Rattenhirne angefertigt, um die [¹⁸F]DAA1106 und die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Bilder zu verifizieren. Zunächst wurden Antikörperfärbungen mit Anti-Iba1 angefertigt, um den auf diese Weise lokalisierten Ort der Neuroinflammation mit den von Neuroinflammation betroffenen Arealen zu vergleichen, die durch [¹⁸F]DAA1106 visualisiert wurden. Abbildung 38 zeigt die Übersicht eines mit Iba1 gefärbten Transversalschnitts durch das Striatum vier Wochen nach 6-OHDA Injektion.

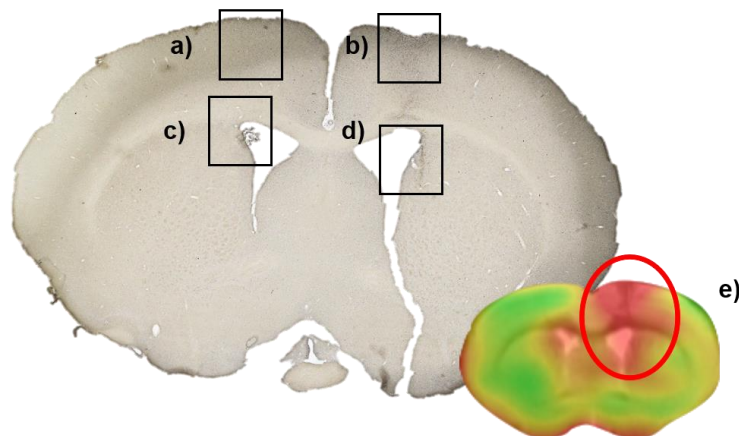


Abbildung 38: Übersicht der Iba1 Färbung eines Transversalschnitts durch das Striatum vier Wochen nach 6-OHDA Injektion.

(a) Linker contralateraler Cortex (Kontrolle). (b) Einstichkanal im rechten läsierten Cortex. (c) Contralaterales Striatum (Kontrolle). (d) Injektionsstelle im rechten läsierten Striatum (e) Zugehöriges PET Bild des gleichen Versuchstieres, das anhand des [¹⁸F]DAA1106 Uptakes eine starke Neuroinflammation zeigte.

Verglichen wurden die Antikörperfärbung um den Einstichkanal im Cortex und das durch die 6-OHDA Injektion läionierte Striatum mit den entsprechenden contralateralen Arealen der linken Hemisphäre, die als gesunde Kontrolle dienten. Eine Detailansicht jener Hirnareale ist in Abbildung 39 dargestellt. Das durch das Eindringen der Hamilton-Spritze geschädigte Gewebe und die umliegenden Mikrogliazellen sind auch vier Wochen nach der Operation noch zu erkennen (Abbildung 39d). Verglichen mit der Kontrollhemisphäre scheint nur im Cortex eine größere Anzahl von Mikrogliazellen in den Bereich der Läsion immigriert zu sein. Darüber hinaus weisen die Mikrogliazellen eine stärkere Iba1 Immunreaktivität und einen stärker ramifizierten Phänotyp auf. Im Striatum zeigt die Iba1 Färbung nur im direkten Umfeld des Einstichkanals eine stärkere Färbung und eine höhere Anzahl von Mikrogliazellen, die jedoch weniger ramifiziert sind. Verglichen mit der Antikörperfärbung der Hirnschnitte, die eine Woche nach der 6-OHDA Injektion angefertigt wurden (vgl. Abbildung 34), scheint die Intensität der Färbung abgenommen zu haben. Auch die Kontrollseite zeigt eine insgesamt schwächere Iba1 Färbung und eine geringere Ramifizierung, nicht nur gegenüber der läionierten Hemisphäre, sondern auch gegenüber der Kontrollhemisphäre zu t1.

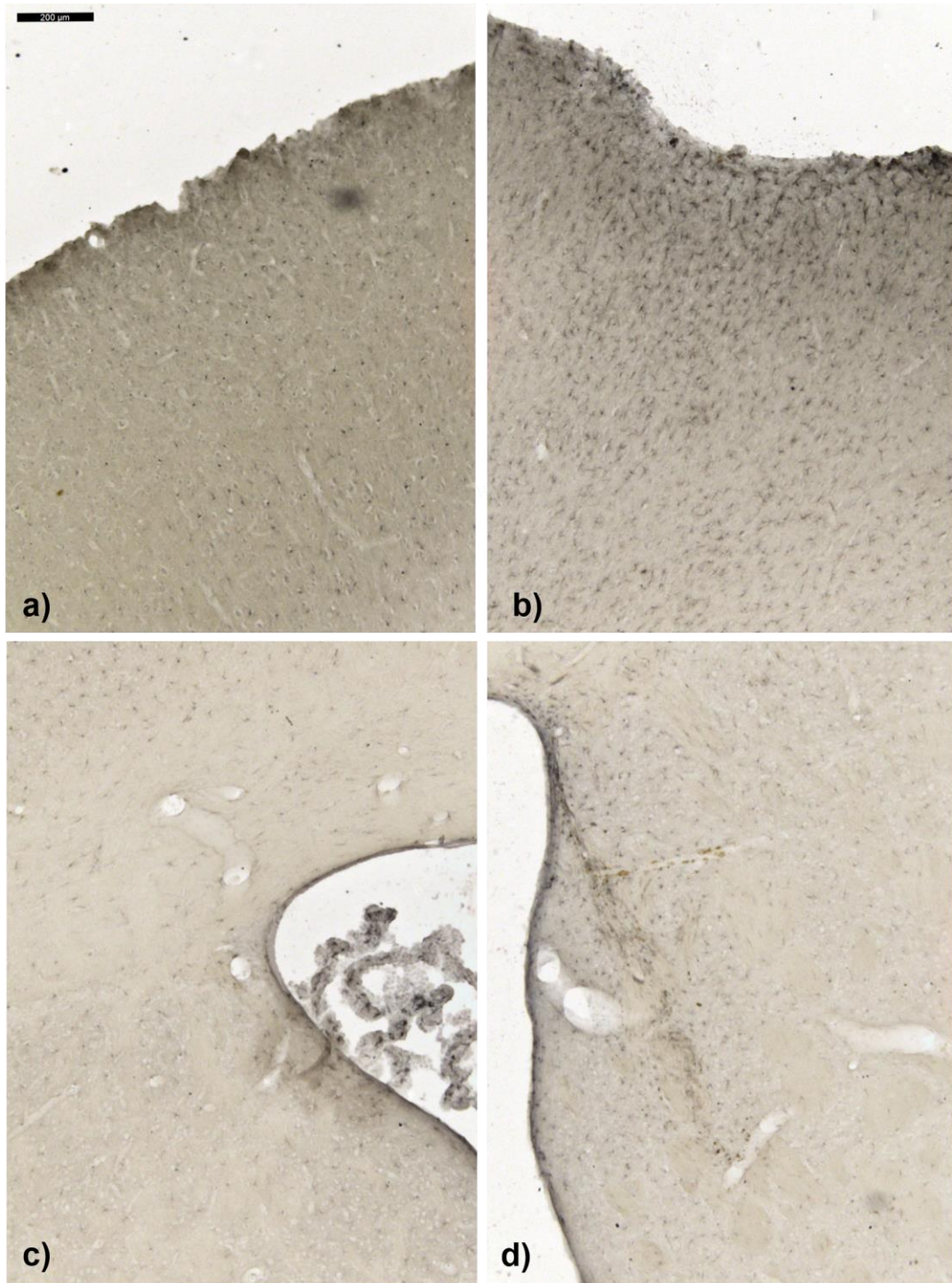


Abbildung 39: Detailansicht der Iba1 Färbung eines Transversalschnitts durch das Striatum vier Wochen nach 6-OHDA Injektion (Skalierung 200 µm).

(a) Contralateraler linker Cortex (Kontrolle) mit schwacher Iba1 Färbung und geringerer Anzahl von Mikrogliazellen. (b) Läsionierter Cortex mit starker Iba1 Färbung. (c) Contralaterales linkes Striatum (Kontrolle) mit schwacher Iba 1 Färbung und geringerer Anzahl von Mikrogliazellen. (d) Läsioniertes Striatum mit schwacher Iba1 Färbung, das den unteren Teil des Einstichkanals und die um ihn lokalisierten Mikrogliazellen zeigt.

Darüber hinaus wurden Hirnschnitte durch die Substantia nigra mit dem Antikörper Anti-TH angefärbt. Auf diese Weise können die dopaminergen Zellkörper innerhalb der Substantia nigra visualisiert werden. Es sollte kontrolliert werden, ob die 6-OHDA Injektion erfolgreich war und zu einem Untergang der dopaminergen Zellkörper innerhalb der Substantia nigra geführt hat. Die Ergebnisse der TH Färbung sind in Abbildung 40 und Abbildung 41 dargestellt.

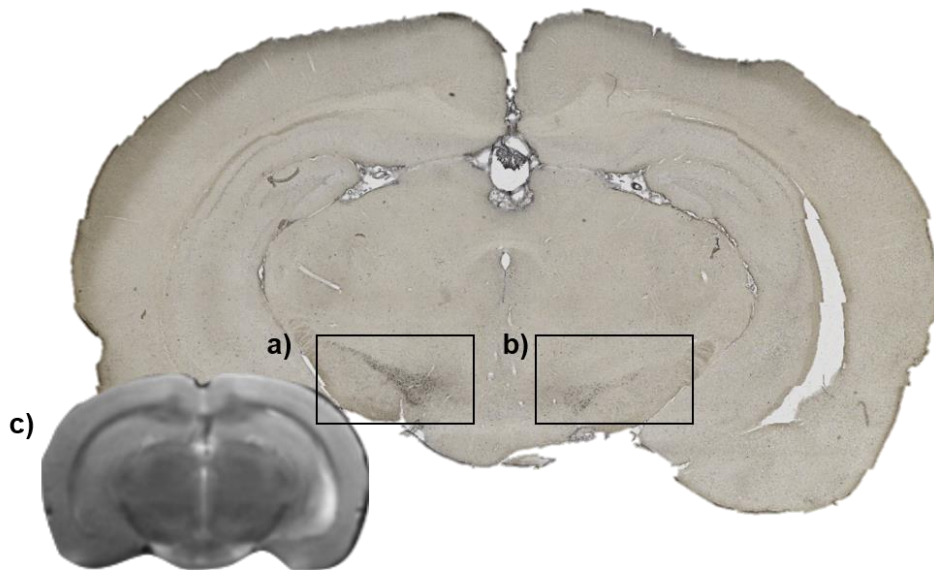


Abbildung 40: Übersicht der TH Färbung eines Transversalschnitts durch die Substantia nigra vier Wochen nach 6-OHDA Injektion.

(a) Gesunde Substantia nigra der Kontrollhemisphäre mit hoher TH Aktivität (b) Läsionierte Substantia nigra der rechten Hemisphäre mit reduzierter TH Aktivität. (c) MRT des gleichen Versuchstiers.

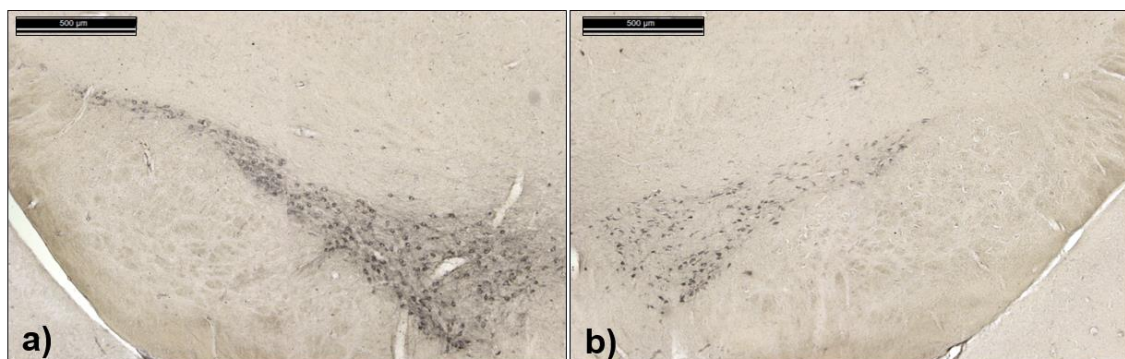


Abbildung 41: Detailansicht der mit dem Antikörper Anti-TH angefärbten Substantia nigra der contralateralen (Kontrolle) und der läsierten rechten Hemisphäre (Skalierung 500 µm).

(a) Unveränderte TH Aktivität in der Substantia nigra der gesunden Kontrollhemisphäre. (b) Läsionierte Substantia nigra mit verringerter TH Aktivität.

Die angefärbten Schnitte durch die Substantia nigra zeigten eine deutlich geringere Zahl dopaminerger Zellkörper und somit eine deutlich schwächere TH Färbung innerhalb der läsierten Hemisphäre (vgl. Abbildung 40b und Abbildung 41b) gegenüber der gesunden Kontrollhemisphäre (vgl. Abbildung 40a und Abbildung 41a). Um zu überprüfen, ob die Reduktion der dopaminergen Zellkörper auch zu einer Reduktion der TH Aktivität im Striatum führt, wurden als nächstes Schnitte durch das Striatum mit Anti-TH gefärbt. Das Ergebnis dieser Färbung ist in Abbildung 42 dargestellt.

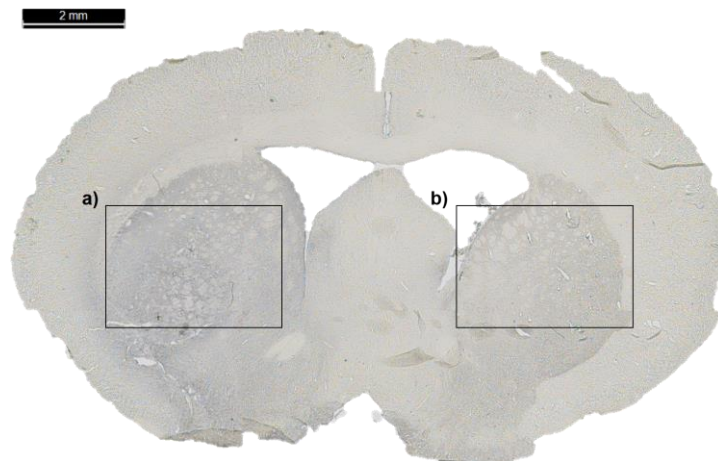


Abbildung 42: Übersicht der TH Färbung eines Transversalschnitts durch das Striatum vier Wochen nach 6-OHDA Injektion und Mittelwert des 6-[¹⁸F]FDOPA Scans vier Wochen nach 6-OHDA Injektion. (a) TH Färbung des Striatum bei unveränderter TH Aktivität in der linken Kontrollhemisphäre. (b) Geringfügig schwächere TH Färbung des rechten Striatum der läsierten Hemisphäre, die auf eine Reduzierung der TH Aktivität hindeuten könnte.

Vergleicht man die TH Färbung der linken und der rechten Hemisphäre, so ist eine geringfügig schwächere Farbintensität innerhalb des rechten läsierten Striatum zu erkennen. Das Ergebnis ist jedoch nicht eindeutig und auch die TH Färbung anderer Transversalschnitte durch das Striatum ergaben keine eindeutige Reduktion der striatalen TH Aktivität (Daten nicht gezeigt).

3.3 Eine Woche nach Injektion in das mediale Vorderhirnbündel

Weil die PET Messungen nach 6-OHDA Injektion ins Striatum auch nach vier Wochen keine deutliche Reduktion des 6-[¹⁸F]FDOPA Signals zeigten, sollte die mangelnde Differenzierbarkeit zwischen der unspezifischen, vermeintlich durch Neuroinflammation induzierten 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung und der spezifischen, physiologischen

6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im Striatum umgangen werden. Aus diesem Grund wurde im folgenden Experiment das mediale Vorderhirnbündel als Injektionsort für 6-OHDA gewählt, wo im Gegensatz zum Striatum kein spezifisches, physiologisches 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake zu erwarten war. Dafür wurden die PET Messungen mit 8 Ratten wiederholt, bei denen 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel injiziert wurde. Um sicherzugehen, dass mit der Operation auch eine Entzündung induziert wird, wurden die 6-OHDA Injektionen ins MFB wieder mit dem manuellen stereotaktischen Rahmen durchgeführt. Danach trat bei allen operierten Ratten eine Entzündung um die Injektionsstelle und den Einstichkanal auf, weshalb im Folgenden nur PET Ergebnisse bei starker Neuroinflammation aufgeführt sind.

3.3.1 PET bei starker Neuroinflammation

Da nach Injektion in das mediale Vorderhirnbündel nicht nur das Tracersignal im Bereich der Läsion, sondern auch die Dopaminverarmung im Striatum von Interesse war, sind im Folgenden alle PET Bilder in der transversalen, horizontalen und sagittalen Ebene dargestellt. Abbildung 43 zeigt die Ergebnisse der PET Messungen vier Wochen nach 6-OHDA Injektion in das rechte MFB.

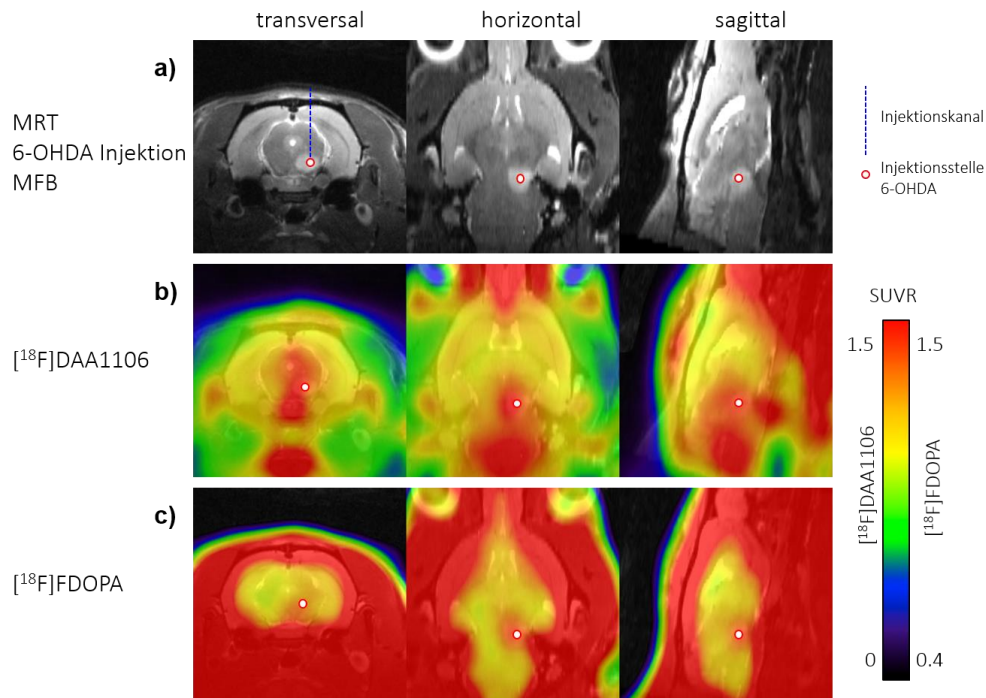


Abbildung 43: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA eine Woche nach 6-OHDA Injektion ins rechte mediale Vorderhirnbündel in allen drei Schnittebenen.

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des läsierten MFB. (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=8). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=8).

Eine Woche nach Injektion (t1) des 6-OHDA in das rechte MFB zeigten die acht Ratten eine deutliche Anreicherung des Tracers [¹⁸F]DAA1106 um den Einstichkanal und die Injektionsstelle im MFB der läsierten Hemisphäre. Die contralaterale Hemisphäre zeigte hingegen keine [¹⁸F]DAA1106 Anreicherung (vgl. Abbildung 43b). Auch das über die acht Tiere gemittelte 6-[¹⁸F]FDOPA PET Bild (vgl. Abbildung 43c) zeigte ein gegenüber der ipsilateralen Hemisphäre erhöhtes 6-[¹⁸F]FDOPA-Uptake insbesondere im Bereich der Läsion, dessen Position anhand des MRTs deutlich zu erkennen ist (vgl. Abbildung 43a). Bei dem 6-[¹⁸F]FDOPA Signal in den Randbereichen des Gehirns handelt es sich um das Signal der peripheren 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung, das aufgrund der niedrigen Skalierung bis in die Randbereiche des Gehirns einstrahlt.

Auch in der zweiten PET Studie schienen sich die durch [¹⁸F]DAA1106 Uptake gekennzeichneten neuroinflammatorischen Areale mit den Arealen zu überschneiden, in denen eine 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung zu erkennen war. Der beobachtete Zusammenhang wurde im Folgenden auf seine Signifikanz geprüft.

3.3.2 Korrelationsanalyse zwischen 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106

Um die statistische Signifikanz der gleichermaßen für [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA beobachteten Anreicherung im MFB zu überprüfen, wurde erneut eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Die Traceraufnahme galt nur dann als erhöht, wenn der SUVR Wert über 1,05 lag. Um positive Korrelationen auszuschließen, die auf das Einhergehen einer niedrigen 6-[¹⁸F]FDOPA mit einer niedrigen [¹⁸F]DAA1106 Aufnahme zurückzuführen sind, wurde die r-Karte mit einer VOI multipliziert, die nur Voxel mit einem SUVR $\geq 1,05$ umfasste. Das Ergebnis der Korrelationsanalyse ist in Abbildung 30 in Form einer für multiples Testen korrigierten r-Karte dargestellt, die auf ein MRT projiziert wurde.

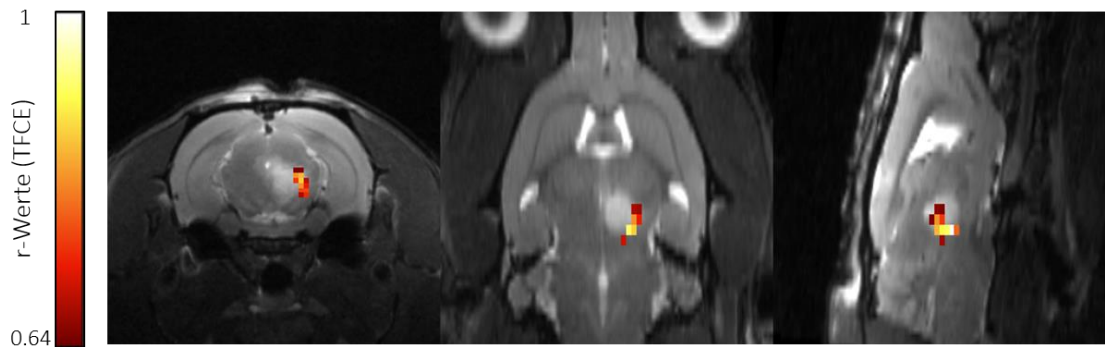


Abbildung 44: signifikante Korrelationen zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake eine Woche nach 6-OHDA Injektion ins rechte mediale Vorderhirnbündel.

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,5$ ergab sich entsprechend der Freiheitsgrade ($df=6$) ein kritischer r-Wert von 0,64. Die Korrelationsanalyse ergab eine signifikante positive Korrelation der Anreicherung von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA, die am Rand der Läsion lokalisiert war.

3.3.3 Vergleich mit [¹⁸F]FET

Auch die Erhebung der PET Daten bei läsiertem MFB erfolgte in mehreren Etappen, weshalb die [¹⁸F]FET Messungen bisher nur an zwei Versuchstieren durchgeführt wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

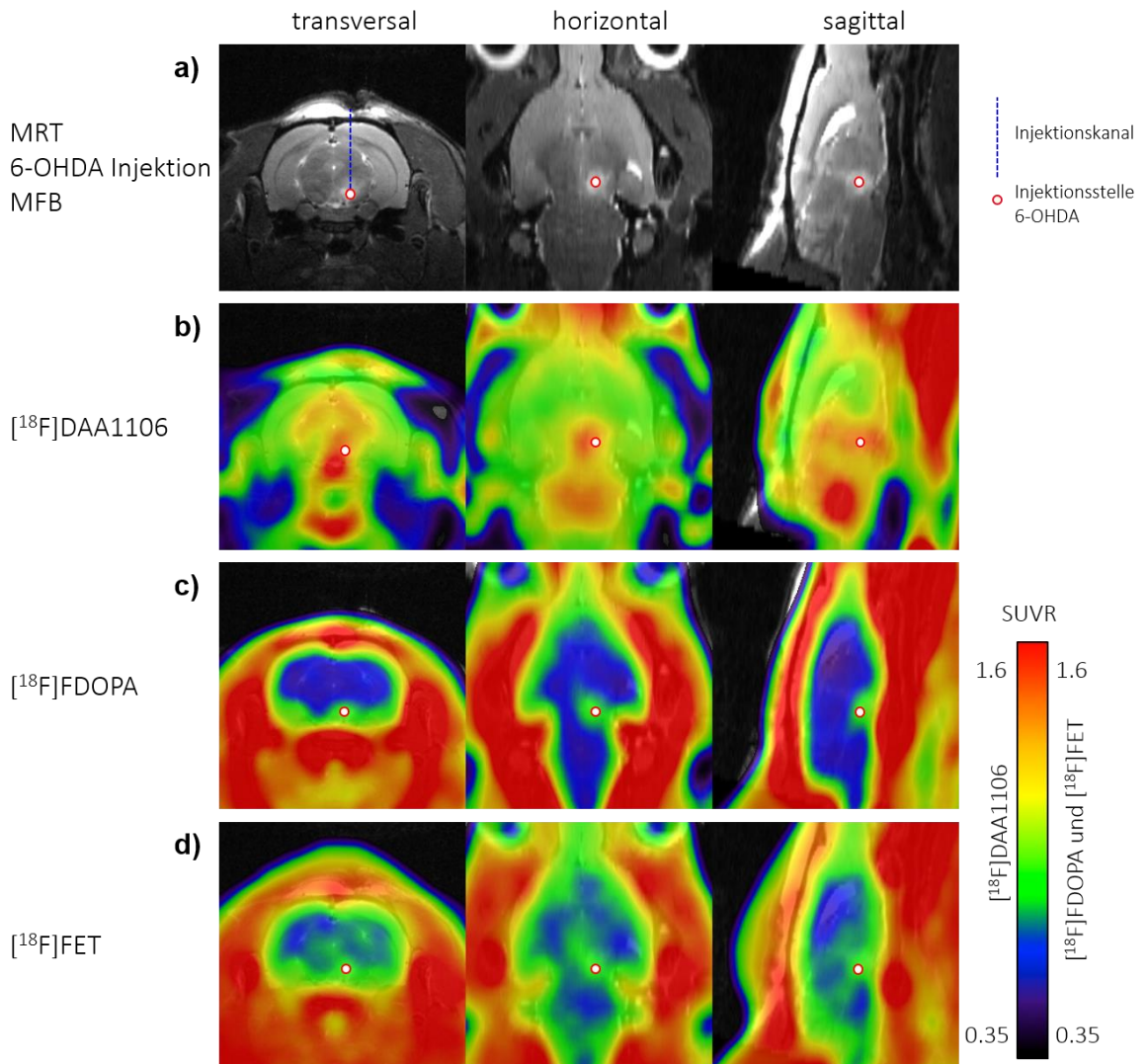


Abbildung 45: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106, 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]FET im Bereich des läsierten MFB in allen drei Schnittebenen.

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des läsierten MFB
 (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=2). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=2).
 (d) Mittelwert der [¹⁸F]FET Messungen (n=2).

Im Bereich des läsierten MFB ist rein visuell eine Anreicherung aller drei Tracer zu erkennen. Die Quantifizierung mithilfe einer die Läsion umfassenden VOI ergab jedoch, dass nur das [¹⁸F]DAA1106 Uptake (SUVR 1,48), nicht aber das [¹⁸F]FET Uptake (SUVR 0,8) oder das 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake (SUVR 0,63) im Bereich der Läsion über Backgroundniveau lag. Eine statistische Auswertung war aufgrund des kleinen Stichprobenumfangs (n=2) nicht möglich.

3.4 Vier Wochen nach Injektion in das mediale Vorderhirnbündel

Durch Schwierigkeiten bei der Tracerlieferung konnten nicht alle Versuchstiere, die zu t1 gemessen wurden, auch zu t2 gemessen werden. Der Stichprobenumfang vier Wochen nach der Operation lag deshalb nur bei vier Versuchstieren. Die Ergebnisse der [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen sind in Abbildung 46 dargestellt.

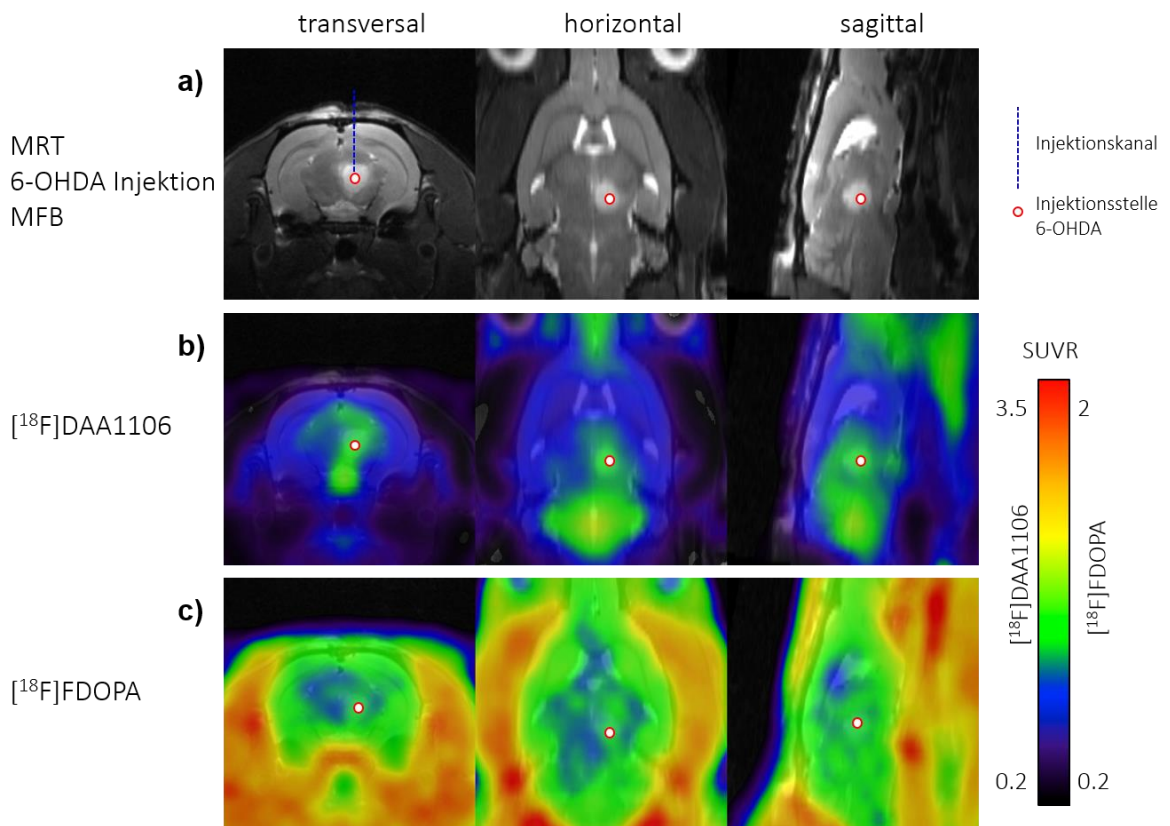


Abbildung 46: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA vier Wochen nach 6-OHDA Injektion ins rechte MFB in allen drei Schnittebenen.

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des Einstichkanals sowie der Injektionsstelle im rechten MFB. (b) Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen (n=4). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=4).

Auch vier Wochen nach der Operation war im Bereich der Injektionsstelle noch eine [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung zu erkennen. Diese war allerdings schwächer als zu t1 und der 6-[¹⁸F]FDOPA Scan weist eine sehr hohe Backgroundaktivität auf, weshalb nominal auch keine 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im Bereich der Läsion festzustellen war (SUVR 0,85). Der SUVR von [¹⁸F]DAA1106 im Bereich der Läsion lag bei 1,2. Der Zusammenhang von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA wurde im Folgenden durch eine Korrelationsanalyse überprüft.

3.4.1 Korrelationsanalyse zwischen 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106

Bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,5$ ergab sich entsprechend der Freiheitsgrade (df=2) ein kritischer t-Wert von 4,3, den keiner der Gehirnvoxel erreichte und weshalb weder der kritische r-Wert noch eine r-Karte berechnet wurde. Wie bereits die Sichtung der PET Bilder vermuten ließ, ergab die Analyse des [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptakes vier Wochen nach striataler 6-OHDA Injektion im Unterschied zu t1 keine signifikante Korrelation (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion Teilstudie I: Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation im Hemiparkinsonmodell

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die beobachtete Anreicherung des Dopamintracers 6-[¹⁸F]FDOPA in neuroinflammatorischen Hirnarealen untersucht werden. Dieser Zusammenhang ist klinisch insofern relevant, als dass 6-[¹⁸F]FDOPA zum Monitoring der dopaminergen Degeneration von Parkinson-Patienten genutzt wird. Während die Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA im Striatum auf ein intaktes dopaminerges System hindeutet, bedeutet die ausbleibende Anreicherung, dass die dopaminergen Terminalien des Striatum bereits zerstört und die Parkinsonerkrankung fortgeschritten ist. Mit der dopaminergen Degeneration gehen jedoch auch Entzündungsprozesse einher. Während der ersten systematischen Vergleichsmessungen des zu evaluierenden Neuroinflammationstracers [¹⁸F]DAA1106 und dem bereits etablierten Tracer 6-[¹⁸F]FDOPA zeigte 6-[¹⁸F]FDOPA ein unspezifisches Signal in den von Neuroinflammation betroffenen Arealen. Dies birgt die Gefahr einer Maskierung der Dopaminverarmung, sobald die Neuroinflammation in Hirnarealen auftritt, in denen man bei fortgeschrittener Parkinsonerkrankung eigentlich eine Reduktion der 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung erwarten würde, wie beispielsweise innerhalb des Striatum. Um die Hypothese einer Maskierung der Dopaminverarmung durch Neuroinflammation zu untersuchen, wurde ein Rattenmodell benötigt, das (ebenso wie der Krankheitsverlauf humaner Parkinson-Patienten) von dopaminergem Neurodegeneration bei gleichzeitiger Neuroinflammation charakterisiert ist. Hierfür wurden zwei verschiedene Varianten des Hemiparkinsonmodells der Ratte gewählt (vgl. Kapitel 2.3). Zunächst wurde das Neurotoxin 6-OHDA striatal injiziert, um die bei Humanpatienten auftretende Dopaminverarmung bei colokalierter Neuroinflammation zu untersuchen. Durch die Injektion wird eine Läsion im nigrostriatalen Signalweg hervorgerufen, die einerseits die charakteristische Dopaminverarmung, andererseits eine Entzündung im Bereich der Läsion verursacht. Im zweiten Teil der Studie wurde 6-OHDA in das mediale Vorderhirnbündel (MFB) injiziert, um eine Differenzierung des unspezifischen 6-[¹⁸F]FDOPA Signals im Bereich der Entzündung und des spezifischen 6-[¹⁸F]FDOPA Signals im Striatum zu ermöglichen. Die Ergebnisse von Teilstudie I werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Eine Woche nach striataler Injektion

4.1.1 Einfluss des stereotaktischen Rahmens auf die Neuroinflammation

Das Messkollektiv der Ratten, bei denen die 6-OHDA Injektion im Striatum erfolgte (n=11), zeigte eine unterschiedlich starke neuroinflammatorische Immunantwort als Reaktion auf die Injektion. Da jedem Tier exakt die gleiche Menge des Neurotoxins injiziert wurde, konnte dies als Störfaktor ausgeschlossen werden. Da 6-OHDA sowohl licht- als auch hitzeempfindlich ist, unterliegt es einer schnellen Autooxidation. Die Oxidation des 6-OHDA vor der Injektion würde dazu führen, dass es im Gehirn der Ratte nicht länger neurotoxisch wirkt. Um dies zu vermeiden, wurde die angesetzte Lösung sofort in einer lichtundurchlässigen Box auf Eis gelagert und sie wurde nie länger als 6 Stunden verwendet. Die 6-OHDA Oxidation lässt sich anhand der Verfärbung der klaren Lösung in ein rötliches Braun erkennen. Diese Verfärbung konnte in keinem der Experimente beobachtet werden, wodurch die frühzeitige, extrazelluläre Autooxidation des 6-OHDA als Grund für die ausbleibende Neuroinflammation ebenfalls ausgeschlossen werden konnte (Thiele *et al.*, 2012).

Entgegen der Erwartung hatte der genutzte stereotaktische Rahmen offenbar einen Einfluss auf die Stärke der Neuroinflammation. Der genutzte stereotaktische Rahmen ist, neben der Verwendung neuer Versuchstiere, nach bisherigem Kenntnisstand der einzige Faktor, der sich bei der Durchführung der Operationen unterschied und somit einen Einfluss auf die Ergebnisse gehabt haben könnte.

Zu Beginn der Experimente bestand nur Zugang zu einem manuellen stereotaktischen Rahmen. Die stärkere Immunantwort könnte retrospektiv also auf die Nutzung des manuellen stereotaktischen Rahmens zurückgeführt werden. Hier wurde das Loch in der Schädeldecke manuell mit einem Zahnarztbohrer gebohrt und auch das Einführen der Injektionsnadel erfolgte durch das Drehen einer Stellschraube per Hand. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit bestand Zugang zu einem vollautomatischen stereotaktischen Rahmen der Firma Neurostar. Nach der Operation mithilfe des Neurostars zeigten die Tiere jedoch keine oder nur eine sehr schwache Neuroinflammation. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie deuten somit daraufhin, dass die 6-OHDA Injektion und die darauffolgende dopaminerge Neurodegeneration im toxinbasierten Hemiparkinsonmodell nicht zwingend mit Neuroinflammation einhergeht. Die Neuroinflammation scheint viel mehr von der Durchführung des operativen Eingriffs

abzuhängen. Dies muss bei der Nutzung des 6-OHDA Hemiparkinsonmodells zukünftig berücksichtigt werden, da sehr viele Studien toxinbasierte Kleintiermodelle der Parkinsonerkrankung nutzen, um den Einfluss neuer Medikationen auf die Dopaminverarmung, aber auch auf die Neuroinflammation zu testen (Jenner, 2008; Duty & Jenner, 2011; Real *et al.*, 2017; Trigo-Damas *et al.*, 2018). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hemiparkinsonmodell gewählt, um die bei Parkinson-Patienten gleichzeitig auftretende Neurodegeneration und Neuroinflammation zu simulieren. Dies war anhand der 6 Versuchstiere ohne Neuroinflammation jedoch nicht möglich. Diese wurden deshalb als Kontrollen genutzt, mit deren Hilfe gezeigt werden konnte, dass ohne Neuroinflammation auch keine vermehrte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung auftritt. Um hier jedoch eine finale Aussage treffen zu können, sind weiterführende PET Messungen und immunhistochemische Färbungen notwendig.

Zum einen wurde der Erfolg der Operation, also die Reduktion der dopaminergen Zellkörper in der Substantia nigra, bislang nur anhand TH Färbungen der Rattenhirne gezeigt, deren [¹⁸F]DAA1106 PET Scan eine Woche nach Operation eine Entzündung indizierte, und nicht anhand der Hirne, die keine Neuroinflammation im PET zeigten. Zum anderen wurden die Tiere, die zu t1 keine Entzündung aufwiesen, zu t2 nicht noch einmal im PET gemessen, da der Fokus des Experiments auf der Kolo-kalisation von [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung lag. Bezüglich der Eignung des Hemiparkinsonmodells zur Untersuchung von Neuroinflammation wäre es sinnvoll gewesen, die Neuroinflammation auch nach vier Wochen zu überprüfen. Besonders vor dem Hintergrund, dass Neuroinflammation in der aktuellen Forschung als einer der bedeutendsten Pathomechanismen des Morbus Parkinson gilt und somit eine hohe Nachfrage an geeigneten Modellen besteht (Gao *et al.* 2008; Tansey und Goldberg 2010; Gao *et al.* 2011; Gelders, Baekelandt & Van der Perren 2018). Mit einer weiteren Messreihe zu t2 hätte beispielsweise untersucht werden können, ob die Neuroinflammation im Zuge der Krankheitsprogression zu einem späteren Zeitpunkt auftritt.

Obwohl neurotoxinbasierte Hemiparkinsonmodelle die klinischen Symptome sehr gut abbilden (Duty & Jenner, 2011), mangelt es nach wie vor an geeigneten Modellen zur Untersuchung der Krankheitsprogression (Jenner, 2008). Im Falle des hier vorliegenden Experiments war das spätere Auftreten der Neuroinflammation jedoch insofern

unwahrscheinlich, als dass das Absterben der dopaminergen Zellkörper in toxinbasierten Tiermodellen abrupt geschieht und, ungleich der Erkrankung bei Humanpatienten, kein langsam fortschreitender Prozess ist. Die Degeneration im Zuge der Läsionierung des Striatum kommt der langsamen Krankheitsprogression im Humanpatienten noch am nächsten (Rodrigues *et al.*, 2001; Hald & Lotharius, 2005). Studien belegen jedoch, dass auch nach striataler Injektion bereits nach 5 Tagen ca. 30 % der dopaminergen Zellkörper abgestorben sind (Jackson-Lewis *et al.*, 1995; Zuch *et al.*, 2000; Pulagam *et al.*, 2017). Folglich hätte die dopaminerge Neurodegeneration zum Messzeitpunkt t1 bereits sichtbar sein müssen.

Auch wenn die zugrundeliegenden Ursachen der fortschreitenden dopaminergen Neurodegeneration noch nicht final geklärt sind, wird zunehmend darüber diskutiert, ob Neuroinflammation auch eine Ursache und nicht nur eine Folge der Krankheitsprogression ist (Tansey & Goldberg, 2010; Wang *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2017). Dabei bezieht sich diese Debatte nicht nur auf Humanpatienten, sondern auch explizit auf das Voranschreiten der Neurodegeneration im Hemiparkinsonmodell (Cebrián *et al.*, 2015). Da in dieser Arbeit selbst bei akutem oxidativen Stress kurz nach der Injektion keine Neuroinflammation detektiert werden konnte, gab es somit auch keinen Mechanismus, der das Zellsterben und die sich selbst verstärkende Neuroinflammation begünstigt hätte. Deshalb wurde sich abschließend gegen den zusätzlichen PET Scan zu t2 entschieden.

Die Gehirne der Versuchstiere wurden bereits nach einer Woche entnommen, um die ausbleibende Entzündung auch immunhistochemisch überprüfen und die fehlende Spezifität des Tracers ausschließen zu können. Die Kontrolle durch zusätzliche Iba1 Färbungen wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt und steht daher aktuell noch aus.

4.1.2 Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA

Eine Woche nach der 6-OHDA Injektion wiesen die Versuchstiere, deren [¹⁸F]DAA1106 PET Scan Neuroinflammation um den Einstichkanal und den Injektionsort zeigten, eine 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im gleichen Areal auf. Dies stand im kompletten Gegensatz zu den erwarteten Ergebnissen. Da das Absterben der dopaminergen Neuronen bei

neurotoxinbasierten Hemiparkinsonmodellen direkt nach Toxininjektion eintritt (vgl. Kapitel 2.3), war eine Woche nach Injektion (t1) bereits eine sichtbare Dopaminverarmung im Striatum zu erwarten. Diese konnte jedoch nicht detektiert werden. Stattdessen lag eine im Vergleich zum contralateralen Striatum unveränderte Dopaminanreicherung im Striatum vor, begleitet von einer Anreicherung um den Einstichkanal im Cortex (vgl. Kapitel 3.1.1). Da diese Anreicherung colokalisiert war mit der von [¹⁸F]DAA1106 angezeigten Entzündung und darüber hinaus keine entsprechende Dopaminanreicherung im Cortex der gesunden contralateralen Hemisphäre vorlag, wurde die Hypothese aufgestellt, dass sich Neuroinflammation und Dopaminanreicherung durch einen noch nicht bekannten Mechanismus beeinflussen.

Der mögliche Zusammenhang von erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake und Neuroinflammation wurde bereits in anderen Studien beobachtet. So berichten Sala *et al.* beispielsweise von zwei Patienten, deren auffällige [¹⁸F]FDOPA PET Scans auf ein Gliom hindeuteten. Die histologische Analyse des entnommenen Gewebes zeigte jedoch, dass die Patienten an Neurosarcoidose litten, die mit einer starken Neuroinflammation in Form von immigrierten, aktivierten Makrophagen einherging (Sala *et al.*, 2014).

Da [¹⁸F]DAA1106 über seine Bindung an TSPO sowohl aktivierte Mikrogliazellen als auch Makrophagen visualisiert (Braestrup *et al.*, 1977; Anholt *et al.*, 1986; Papadopoulos *et al.*, 2006b) und die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung signifikant mit dem erhöhten [¹⁸F]DAA1106 Signal korrelierte (vgl. 3.2.1), standen zunächst die Mikrogliazellen und Makrophagen in Verdacht, Einfluss auf die Anreicherungsmechanismen von 6-[¹⁸F]FDOPA zu nehmen. Dementsprechend wurde für die immunhistochemischen Färbungen der Antikörper Iba1 verwendet, der ebenfalls Mikroglia visualisiert. Die Wahl des Antikörpers und die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

4.1.3 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie diente der Verifizierung der [¹⁸F]DAA1106 PET Messungen und sollte somit überprüfen, ob [¹⁸F]DAA1106 in der Lage ist, Neuroinflammation spezifisch zu visualisieren. Hier ist jedoch anzumerken, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Färbungen lediglich einer ersten Orientierung

dienten, um zu entscheiden, ob die umfassende Auswertung und Quantifizierung der Iba1 Immunreaktivität zielführend ist. Die genaue Quantifizierung sowie die weitere Analyse aller entnommenen Gehirne waren im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich und werden im Anschluss durchgeführt. Bezüglich der Aussagekraft der Iba1 Färbungen hinsichtlich der Überprüfung der [¹⁸F]DAA1106 Scans ist außerdem anzumerken, dass sowohl Anti Iba1 als auch [¹⁸F]DAA1106 Neuroinflammation visualisieren, sie dabei jedoch an unterschiedliche Zielstrukturen (TSPO und Iba1) binden, die beide bei Neuroinflammation überexprimiert werden (vgl. Kapitel 1.5 und 2.9.1). Ein direkter Vergleich war daher nur bedingt möglich. Zahlreiche Studien belegen jedoch die Korrelation zwischen erhöhter TSPO- und Iba1-Expression in aktivierten Mikrogliazellen (Bonsack *et al.*, 2016; Pulagam *et al.*, 2017). Da nach aktuellem Kenntnisstand noch keine kommerziell erhältlicher TSPO-Antikörper für die immunhistochemische Färbung von Rattengehirnen existiert, wurde entschieden, die Färbungen mit Anti-Iba1 durchzuführen.

Die immunhistochemischen Färbungen zu t1 zeigten eine stärkere Iba1 Immunreaktivität im ipsilateralen Striatum und um den Einstichkanal im Cortex (vgl. Kapitel 3.2.3). Die Morphologie der angefärbten Mikrogliazellen entsprach jedoch nicht dem in der Literatur beschriebenen M1 Phänotyp reaktiver Mikrogliazellen (vgl. Kapitel 1.3.1). Zwar wies die stärkere Färbung auf eine höhere Iba1-Expression und somit auf die Aktivierung der Mikrogliazellen hin, jedoch zeigten sie einen stark ramifizierten Phänotyp, der im Zusammenhang mit ruhenden Mikrogliazellen steht (Russo & McGavern 2015). Im Gegensatz dazu wiesen die Mikrogliazellen in der contralateralen Hemisphäre eine eher amöboide Form auf, die in der Literatur als charakteristisch für aktivierte Mikrogliazellen beschrieben wird (Fu *et al.* 2014). Vergleicht man die aufgenommenen Bilder jedoch mit anderen Studien, die ebenfalls Anti-Iba1 zum Nachweis aktivierter Mikrogliazellen verwendeten, weisen die untersuchten aktivierten Mikrogliazellen einen ebenso ramifizierten Phänotyp auf (Villa *et al.*, 2010; Forny-Germano *et al.*, 2014).

Zunächst wurde vermutet, dass der Phänotyp der Mikrogliazellen vom Zeitpunkt der Gehirnentnahme abhängen könnte. Vela *et al.* 2002 zeigen in ihrer Studie zum zeitlichen Verlauf der Proliferation und Phagozytose von Mikrogliazellen jedoch, wie heterogen die Immunantwort und somit auch der Phänotyp von Mikrogliazellen sein kann, und dass dieser nicht nur davon abhängt, wie lange die Mikroglia schon reaktiv ist. In ihrer Studie

differenzieren sie explizit zwischen Mikrogliazellen und Makrophagen, die in einem komplexen Wechselspiel den phagozytotischen Abbau degenerierter Neuronen regulieren. So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass Makrophagen im Unterschied zu Mikrogliazellen bereits kurz nach Aktivierung Phagozytose betreiben und durchgehend einen eher amöboiden Phänotyp aufweisen (Vela *et al.*, 2002; Szulzewsky *et al.*, 2015; Kanazawa *et al.*, 2017). Die untersuchten Mikrogliazellen lagen dagegen zum Teil auch nach 30 Tagen noch in ramifizierter Form vor (Vela *et al.*, 2002). Eine solch klare Differenzierung zwischen Mikroglia und Makrophagen erfolgt in den wenigstens Studien, sodass es wahrscheinlich ist, dass der amöboide Phänotyp der sekundär eingewanderten Makrophagen oftmals mit dem Phänotyp von Mikrogliazellen gleichgesetzt wird und daher so häufig in der Literatur beschrieben wird. Darüber hinaus zeigen weitere Studien, dass die Differenzierung der ramifizierten und amöboiden Form nicht immer eindeutig möglich ist und die Grenzen fließend sind (Ling & Wong, 1993; Torres-Platas *et al.*, 2014; Szulzewsky *et al.*, 2015; Crews & Vetreno, 2016). Der Phänotyp hängt offenbar zum einen von der Stärke, zum anderen vom Ort der Läsion ab und ist sehr heterogen (Vela *et al.*, 2002). Der in dieser Arbeit beobachtete ramifizierte Phänotyp schließt die Aktivierung der gefärbten Mikrogliazellen folglich nicht aus. Ein hinsichtlich des verwendeten 6-OHDA Modells besonders interessanter Aspekt ist, dass Vela *et al.* phagozytotische Mikrogliazellen vor allem in Arealen fanden, die einer anterograden Degeneration unterlagen, jedoch nicht in Arealen, die von retrograder Degeneration betroffen waren (Vela *et al.*, 2002). Vela *et al.* vermuteten, dass es sich bei anterograder Degeneration um einen für Mikrogliazellen nicht ausreichend starken phagozytotischen Stimulus handelte, der die Abwesenheit der klassischen Mikrogliacluster erklärte. Da die hier diskutierten immunhistochemischen Färbungen an Rattenhirnen vorgenommen wurden, bei denen das Neurotoxin ins Striatum injiziert wurde, also am Ort der dopaminergen Terminalen, lag folglich auch eine retrograde Degeneration vor. Dies würde den ramifizierten Phänotyp und das Ausbleiben des phagozytotischen amöboiden Phänotyps erklären.

Da Iba1 sowohl Mikroglia als auch Makrophagen visualisiert, erfolgte auch in der vorliegenden Studie keine Differenzierung zwischen Makrophagen und Mikroglia. Diese könnte in weiterführenden Studien z.B. mithilfe des Antikörpers TMEM19 erfolgen, der spezifisch an Mikroglia, nicht aber an Makrophagen bindet (Bennett *et al.*, 2016).

Die Eignung von [¹⁸F]DAA1106 zur Differenzierung von neuroinflammatorischen und nicht neuroinflammatorischen Arealen konnte dennoch anhand der durchgeführten Färbungen bestätigt werden. Insbesondere im Cortex deckt sich das [¹⁸F]DAA1106 Signal mit den um den Injektionskanal eingewanderten aktivierten Mikrogliazellen. [¹⁸F]DAA1106 ermöglichte nicht nur die Unterscheidung von gesunder und läsionierter Hemisphäre, sondern zeigte mit großer Genauigkeit sowohl den Ort der mechanischen Läsion (Einstichkanal) als auch den Ort der chemischen Läsion (Injektion). Um die Sensitivität von [¹⁸F]DAA1106 auch bei abklingender Neuroinflammation zu überprüfen, wurden zusätzliche immunhistochemische Färbungen vier Wochen nach Neurotoxininjektion angefertigt. Diese werden im Rahmen von Kapitel 4.2.1 diskutiert.

4.2 Vier Wochen nach striataler Injektion

4.2.1 Ausbleibende Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA

Vier Wochen nach striataler 6-OHDA Injektion konnte keine signifikante Korrelation mehr zwischen erhöhtem [¹⁸F]DAA1106 Uptake und erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake festgestellt werden (vgl. Kapitel 3.2). Auch wenn um die Einstichstelle im Cortex und die Injektionsstelle im Striatum ein im Vergleich zur contralateralen Hemisphäre stärkeres 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106 Signal detektiert werden konnte, waren die Signale nicht mehr in gleicher Weise colokalisiert wie noch zu t1 und lagen beide nicht über Backgroundniveau. Dies lag vermutlich an dem zu t2 allgemein höheren Uptakeniveau, das dazu führte, dass sich die Traceranreicherung im Gegensatz zu t1 nominal nicht mehr nachweisen ließ. Das insgesamt höhere Uptakeniveau hat jedoch keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Korrelationsanalyse, da hier nur das Verhältnis der Variablen 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106 Uptake zueinander analysiert wurde, unabhängig von der absoluten Signalstärke. Dies erklärt folglich nicht die ausbleibende Korrelation.

Auch vier Wochen nach Injektion ins mediale Vorderhirnbündel (vgl. Kapitel 4.3) lag im Gegensatz zu t1 keine signifikante Korrelation mehr vor. Dies schließt den Zusammenhang von erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake und Neuroinflammation jedoch nicht aus, sondern widerlegt lediglich den direkten Zusammenhang von Mikrogliaaktivierung und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung. Folglich liegt die Ursache für

die Anreicherung zu t1 vermutlich bei einem anderen mit Neuroinflammation einhergehenden Mechanismus. Dies wird in Kapitel 4.3 noch einmal aufgegriffen und differenzierter diskutiert.

Eine weitere Auffälligkeit der 6-[¹⁸F]FDOPA Scans war die ausbleibende Reduktion des Uptakes im läsierten Striatum. Da [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA trotz fehlender signifikanter Korrelation gerade im unteren Bereich des Striatum colokalisiert waren, könnte die ausbleibende Reduktion des 6-[¹⁸F]FDOPA Uptakes dennoch auf das unspezifische 6-[¹⁸F]FDOPA Signal bei Neuroinflammation zurückzuführen sein. Die fehlende Signifikanz dieses Zusammenhangs ist womöglich auf die fehlende statistische Power durch den geringen Stichprobenumfang (n=5) zurückzuführen. Eine weitere mögliche Erklärung ist die nicht ausreichend starke retrograde Degeneration der Neuronen, sodass die dopaminergen Zellkörper innerhalb der Substantia nigra nicht zerstört und die Dopaminverfügbarkeit im Striatum folglich nicht reduziert wurde.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Kompensation durch die noch verbliebenen dopaminergen Neuronen. So könnte es zwar sein, dass der überwiegende Teil der dopaminergen Zellkörper degeneriert ist, und sich dies auch anhand der immunhistochemischen Färbungen zeigt, die verbliebenen Neuronen erhöhen ihre Dopaminsynthese jedoch so stark, dass bei der PET keine Reduktion des Signals im Striatum zu erkennen ist.

Da auch die contralaterale Hemisphäre die unilaterale Läsion kompensieren kann und gerade die Injektion im Striatum eine geringfügigere Läsionierung der dopaminergen Zellkörper bewirkt (vgl. Kapitel 2.3), manifestiert sich der Erfolg der Modellgenerierung nicht zwingend in parkinsonähnlichen Symptomen der Tiere. Um das dopaminerge Zellsterben zu überprüfen, wurden vier Wochen nach 6-OHDA Injektion neben der Iba1 Färbung immunhistochemische Färbungen mit Anti-TH durchgeführt. Die Ergebnisse der Immunhistochemie vier Wochen nach Injektion werden im Folgenden diskutiert.

4.2.2 Immunhistochemie

Vier Wochen nach 6-OHDA Injektion zeigten die Schnitte zu t1 eine insgesamt geringere Iba1 Immunreaktivität, was mit der Reduktion des [¹⁸F]DAA1106 Signals einhergeht. Vergleicht man jedoch die nach wie vor starke Iba1 Färbung der Mikrogliazellen im

Cortex mit dem Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 PET Messung, so besteht dort eine relativ große Diskrepanz zwischen der schwachen Intensität des [¹⁸F]DAA1106 Signals und der starken Intensität der Iba1 Färbung. Aus diesem Grund wurde dem Hirnschnitt das PET Bild des selben Tieres (vgl. Abbildung 38) gegenübergestellt und nicht das PET Bild, das den Mittelwert der [¹⁸F]DAA1106 Messungen aller Tiere zeigt. Hier fällt auf, dass gerade dieses Tier auch ein hohes [¹⁸F]DAA1106 Signal im Cortex zeigte, das sich über alle Tiere jedoch offenbar heraus gemittelt hat. Dies bestätigt, dass das [¹⁸F]DAA1106 Signal mit der durch Iba1 angezeigten Aktivierung der Mikrogliazellen übereinstimmt und deckt sich mit den Ergebnissen zu t1, was erneut dafür spricht, dass [¹⁸F]DAA1106 spezifisch aktivierte Mikrogliazellen visualisiert.

Da sich auch vier Wochen nach der 6-OHDA Injektion keine Reduktion des 6-[¹⁸F]FDOPA Signals im Striatum nachweisen ließ, wurden immunhistochemische Färbungen mit TH angefertigt. Diese zeigten eine eindeutige Reduktion der TH positiven Zellkörper im Vergleich zur gesunden Substantia nigra. Die Reduktion der dopaminergen Zellkörper als Ort der TH Expression spiegelte sich jedoch nicht in einer eindeutig reduzierten TH Aktivität im Striatum wieder. Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte es sein, dass die noch verbleibenden dopaminergen Zellkörper die Reduktion durch eine gesteigerte TH Expression ausgleichen (funktionelle Reserve) (Engelender & Isacson, 2017). Zum anderen erschwerte die hohe 6-[¹⁸F]FDOPA Backgroundaktivität die Interpretation der Daten und führte immer wieder zu PET Bildern mit einer schlechten Bildqualität, und dies auch ohne gleichzeitig auftretende Neuroinflammation (vgl. Kapitel 3.1.2, Abbildung 31). Da die Differenzierung des unspezifischen 6-[¹⁸F]FDOPA Signals in neuroinflammatorischen Arealen und dem spezifischen Dopaminsignal nach striataler Injektion nicht eindeutig möglich ist, wurde im Folgeexperiment das mediale Vorderhirnbündel der Ratten läsiert.

4.3 Eine Woche nach Injektion in das mediale Vorderhirnbündel

Im Gegensatz zum Striatum war im medialen Vorderhirnbündel keine spezifische 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung zu erwarten. Ungewollte Interferenzen zwischen physiologischem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake im Striatum als Ort des Dopamin-Turnovers und dem unspezifischen, inflammationsinduzierten 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake konnten somit ausgeschlossen werden. Deshalb wurde im zweiten Teil der Studie das MFB als

Injektionsort gewählt. Des Weiteren wurde für die Operation der Tiere erneut der manuelle stereotaktische Rahmen verwendet, da zu diesem Zeitpunkt bereits der Verdacht bestand, dass der stereotaktische Rahmen einen Einfluss auf die Stärke der Neuroinflammation nehmen könnte. Die Ergebnisse der PET Messungen eine Woche nach 6-OHDA Injektion ins rechte MFB werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1 Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA

Die PET Messungen eine Woche nach Injektion ins MFB zeigen ebenfalls eine Colokalisation des [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Signals. Betrachtet man den Transversalschnitt, so erkennt man jedoch, dass sich die Entzündung entlang des Injektionskanals fortsetzt, die 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung beschränkt sich jedoch auf die Injektionsstelle. Dementsprechend ergab die Korrelationsanalyse auch nur signifikante Voxel im Bereich der Injektionsstelle und nicht wie nach Injektion ins Striatum entlang des Injektionskanals. Die signifikanten Voxel sind am rechten äußeren Rand der Läsion lokalisiert und sind so angeordnet, dass sie eine Art Umrandung der Injektionsstelle bilden. Da die signifikante positive Korrelation vor allem am Rand der Läsion auftrat, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung mit der Formation einer Glianarbe und somit mit Astrozyten und nicht mit Mikrogliazellen zusammenhängt. Es ist bekannt, dass sich Astrozyten vor allem am Rand einer Läsion anreichern, um das geschädigte neuronale Gewebe durch die Formierung einer Glianarbe abzuschirmen (Sofroniew, 2009; Wanner *et al.*, 2013). Da die PET Messungen vier Wochen nach Injektion ebenfalls auf einen möglichen Zusammenhang von Astroglieose und unspezifischem 6-[¹⁸F]FDOPA Signal hindeuten, wird diese Hypothese in Kapitel 4.4.1 noch einmal aufgegriffen.

4.3.2 Vergleich mit [¹⁸F]FET

Um weitere Aussagen bezüglich der zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen treffen zu können, wurden die [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen mit [¹⁸F]FET Messungen verglichen. Dies erfolgte anhand von zwei Ratten im MFB Modell zu t1.

Zunächst soll erläutert werden, wieso ein zusätzlicher Vergleich mit [¹⁸F]FET durchgeführt wurde. Auch wenn 6-[¹⁸F]FDOPA ursprünglich für die Bildgebung des Dopaminstoffwechsels entwickelt wurde, wird es ebenso wie [¹⁸F]FET vor allem in der Onkologie zur Detektion und Charakterisierung von Tumoren eingesetzt. Da [¹⁸F]FET zwar über LAT1 aufgenommen wird, sich aber nur geringfügig in stark aktivierten Hirnarealen oder bei Neuroinflammation anreichert, wird es häufig eingesetzt, um die zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen zu differenzieren (Schiepers *et al.*, 2007; Juhász *et al.*, 2014). Des Weiteren handelt es sich um eine Aminosäure, die nicht weiter verstoffwechselt werden kann. Eine Anreicherung von [¹⁸F]FET spiegelt daher vor allem die LAT1-Aktivität in der Blut-Hirn-Schranke wider (Juhász *et al.*, 2014). Der Vergleich von [¹⁸F]FET mit [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA sollte also zeigen, ob die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme im Bereich der Neuroinflammation auf die Überexpression oder Hochregulierung von LAT1 zurückzuführen ist. Somit wäre es kein 6-[¹⁸F]FDOPA spezifisches Phänomen, sondern würde alle L-Aminosäuren betreffen. Des Weiteren würde eine erhöhte [¹⁸F]FET Aufnahme im gleichen Areal dafür sprechen, dass die Anreicherung nicht durch Neuroinflammation bedingt ist, da bisher angenommen wurde, dass sich [¹⁸F]FET nicht in neuroinflammatorischen Arealen anreichert (Dunet *et al.*, 2012). Im Folgenden werden die Ergebnisse der [¹⁸F]FET Messungen diskutiert.

Die Vergleichsmessungen ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Hier bestand erneut das Problem der hohen Backgroundaktivität von 6-[¹⁸F]FDOPA, aber auch von [¹⁸F]FET. So konnte zwar visuell für alle drei Tracer ein Signal im Bereich des MFB detektiert werden, allerdings lag nominal nur das [¹⁸F]DAA1106 Signal über Backgroundniveau.

Gerade [¹⁸F]FET wies im gesamten Gehirn ein diffuses Signal auf. Die schlechte Signal to Background Ratio lässt eine Einschätzung bezüglich der Spezifität des [¹⁸F]FET Signals innerhalb der Läsion nicht zu. Die unterschiedliche Verteilung von [¹⁸F]FET und 6-[¹⁸F]FDOPA ist womöglich dadurch zu erklären, dass es sich bei [¹⁸F]FET um eine Aminosäure handelt, die im Unterschied zu 6-[¹⁸F]FDOPA nicht von COMT, AADC und MAO weiterverstoffwechselt wird. Des Weiteren sind die Messergebnisse nur bedingt aussagekräftig, da sie auf einer sehr kleinen Stichprobe (n=2) basieren. Sie dienen, ebenso wie die immunhistochemischen Färbungen, nur einem ersten Eindruck und zur Planung weiterführender Experimente.

Da zum Zeitpunkt der [¹⁸F]FET Messungen noch nicht in Betracht gezogen wurde, dass Astrogliose an der 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung beteiligt sein könnte, wurde diese Möglichkeit erst retrospektiv bei der Interpretation der [¹⁸F]FET Daten berücksichtigt, jedoch nicht bei der Planung des Experiments. Dabei ergab die Recherche, dass LAT1 nicht nur in der Blut-Hirn-Schranke, sondern auch von Astrozyten exprimiert wird, die deshalb ebenfalls in der Lage sind, Aminosäuren aufzunehmen (Bröer & Brookes, 2001). Darüber hinaus ist bekannt, dass Astrozyten sogar als L-DOPA Reservoir fungieren können (Asanuma *et al.*, 2014), was dafür spricht, dass auch 6-[¹⁸F]FDOPA in höherem Maße in Astrozyten aufgenommen werden kann. Kim *et al.* konnten in Zellkulturexperimenten nachweisen, dass die aus Rattengehirnen isolierten Astrozyten nur LAT2, aber nicht LAT1 exprimieren, wohingegen die Tumorzelllinie C6 nur LAT1 und nicht LAT2 exprimierte (Kim *et al.*, 2004). Da bisher angenommen wurde, dass sich [¹⁸F]FET nicht in neuroinflammatorischen Arealen und somit auch nicht in Astrozyten anreichert, deutet eine colokalisierte Anreicherung von [¹⁸F]FET und 6-[¹⁸F]FDOPA ausschließlich darauf hin, dass die LAT1 Aktivität in der Blut-Hirn-Schranke erhöht ist. Sie würden jedoch keine Aussage über die LAT1 Aktivität der Astrozyten und somit keine Aussagen zur der vermuteten Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA in Astrozyten zulassen. Außerdem ist nicht bekannt, ob [¹⁸F]FET und 6-[¹⁸F]FDOPA die gleiche Affinität zu LAT1 Transportern aufweisen (Juhász *et al.*, 2014). Des Weiteren weisen Juhász *et al.* darauf hin, dass die LAT1 Expression in den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke von den umgebenden Astrozyten beeinflusst werden könnte (Duelli *et al.*, 2000; Juhász *et al.*, 2014). Dies würde außerdem bedeuten, dass die bisherige Annahme, [¹⁸F]FET reiche sich nicht in neuroinflammatorischen Arealen an, nur eingeschränkt zutrifft, was die Interpretation der [¹⁸F]FET Ergebnisse zusätzlich erschwert. Aus diesem Grund wurde vorerst von weiteren [¹⁸F]FET Messungen abgesehen.

4.4 Vier Wochen nach Injektion in das mediale Vorderhirnbündel

4.4.1 Ausbleibende Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA

Auch im MFB Hemiparkinsonmodell konnte vier Wochen nach der Injektion keine signifikante Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake

nachgewiesen werden. Insgesamt konnte durch Teilstudie I ein direkter Zusammenhang von Mikrogliose und erhöhtem 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake ausgeschlossen werden. Die 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung steht somit vermutlich im Zusammenhang mit einem anderen Faktor der zerebralen Neuroinflammation. Wie bereits erwähnt, rückte daraufhin die ebenfalls bei Neuroinflammation auftretende Astroglie in den Fokus der Dateninterpretation. Es stellte sich zunächst die Frage, wieso zu t1 ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Signal bestand, zu t2 jedoch nicht. Und das, obwohl nach wie vor ein [¹⁸F]DAA1106 Signal um die Läsion beobachtet werden konnte. Die immunhistochemischen Färbungen zeigten zwar eine Reduktion der Immunreaktion der Mikrogliazellen, dennoch konnte eine Aktivierung der Mikrogliazellen im Bereich der Läsion nachgewiesen werden. Astrozyten werden von der Iba1 Antikörperfärbung jedoch nicht erfasst und inwieweit das [¹⁸F]DAA1106 Signal auch die TSPO-Expression von Astrozyten visualisiert, ist nicht eindeutig geklärt. Es wurde jedoch bereits nachgewiesen, dass die TSPO-Expression auch in aktivierten Astrozyten erhöht ist und somit Einfluss auf die TSPO-Bildgebung nehmen kann (Lavis *et al.*, 2012). [¹⁸F]DAA1106 scheint im Unterschied zu [¹¹C]PK11195 zwar eine höhere Spezifität für Mikroglia aufzuweisen, bindet jedoch auch an TSPO in Astrozyten (Venneti *et al.*, 2008). Dies würde erklären, wieso die 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106 Korrelation zu t1 nur im Bereich der Injektionsstelle signifikant war und nicht im gesamten Bereich der Entzündung. Demnach ist die Korrelation nur in Arealen signifikant, wo im Zuge der Entzündung auch Astroglia immigriert, nämlich im Bereich der Glianarbe, in direktem Umfeld der Injektionsstelle. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass Astrogliazellen bei Neuroinflammation vermehrt 6-[¹⁸F]FDOPA über ihre LAT Transporter aufnehmen (vgl. Kapitel 1.4.3).

Um den Zusammenhang von aktivierter Astroglia und erhöhter 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme zu untersuchen, stellt sich die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen für eine erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme. Um diese Mechanismen zu überprüfen, ist im Anschluss an diese Arbeit eine Wiederholung der Messungen mit MAO Inhibitoren geplant. Es ist zu vermuten, dass das in Astrozyten exprimierte Enzym MAO-B einen Einfluss auf die Aufnahme und Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA hat. MAO-B ist ein Enzym, das die oxidative Desaminierung katalysiert und somit am Abbau von Dopamin, aber auch von Serotonin, Noradrenalin, und Tyramin beteiligt ist (Grimsby *et al.*, 1991; Cumming, 2009; Narayanaswami *et al.*, 2018). Es wird vor allem in der äußeren

Mitochondrienmembran von Astrozyten exprimiert (Schnaitman *et al.*, 1967; Youdim *et al.*, 2006; Cahoy *et al.*, 2008; Petrelli *et al.*, 2018). Die entstehenden Metaboliten fördern oxidativen Stress und wirken deshalb zytotoxisch (Weyler *et al.*, 1990; Bai *et al.*, 2005). Durch eine höhere MAO-B Aktivität kommt es bei Parkinson-Patienten zu einem stärkeren Abbau von Aminen und somit zu einer geringeren Verfügbarkeit von Dopamin als Neurotransmitter (Maggiorani *et al.*, 2017). Zum anderen werden beim Abbau von Dopamin vermehrt reaktive Sauerstoffspezies frei, die zu starkem oxidativen Stress führen und so neurotoxisch wirken (Spina & Cohen, 1989).

Da Astro- und Mikroglia bei ihrer Aktivierung nicht nur selbst reaktive Sauerstoffspezies bilden, sondern ihre Aktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies verstärkt wird (Dias *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2015, 2017), nimmt MAO-B nicht nur eine regulative Rolle beim Dopaminturnover, sondern auch bei der neuroinflammatorischen Immunantwort ein. Dopaminturnover und Neuroinflammation sind in Astrozyten folglich über die MAO-B Aktivität mechanistisch miteinander verknüpft. Diese mechanistische Verknüpfung würde die Colokalisation des [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Signal erklären, bedarf jedoch zukünftig noch weiterer Untersuchungen. Die MAO-B Aktivität in toxininduzierten Parkinsonmodellen wurde bislang vor allem hinsichtlich ihres Einflusses auf die Dopaminverfügbarkeit (Heikkila *et al.*, 1984; Melamed & Youdim, 1985; Youdim & Bakhle, 2006; Finberg & Rabey, 2016) und seltener hinsichtlich Neuroinflammation untersucht (Liu *et al.*, 2017; Chamoli *et al.*, 2018; Hossain *et al.*, 2018).

Um den Einfluss von Astroglie und MAO-B Aktivität im Hemiparkinsonmodell der Ratte zu untersuchen, sind immunhistochemische Färbungen mit dem Antikörper Anti-GFAP (engl. glial fibrillary acidic protein) geplant. GFAP ist ein Gliafaserprotein, das vornehmlich in Astrozyten exprimiert wird (Chamoli *et al.*, 2018). Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung des Einflusses von Astroglie und MAO-B Aktivität wären PET Scans mit einem spezifisch an Astrozyten bindenden PET Tracer. Im Gegensatz zur Bildgebung durch TSPO-Liganden wie [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA-714, sind bisher nur wenige PET Tracer zur spezifischen Bildgebung von Astroglie etabliert. Denkbar wären beispielsweise die vornehmlich in der Alzheimerforschung eingesetzten PET Tracer [¹¹C]Deuterium-L-deprenyl ([¹¹C]-DED) (Carter *et al.*, 2012; Rodriguez-Vieitez & Nordberg, 2018) oder [¹⁸F]Fluordeprenyl-D2

(Narayanaswami *et al.*, 2018). Es handelt sich um radioaktiv markierte MAO-Inhibitoren, die ursprünglich für die Tau-Bildgebung entwickelt wurden, jedoch unspezifisch und mit ähnlich hoher Affinität an MAO-A und MAO-B binden (Saint-Aubert *et al.*, 2017; Narayanaswami *et al.*, 2018; Okamura *et al.*, 2018).

Bisher wurde bei der Studienplanung und Interpretation immer impliziert, dass die Neuroinflammation die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme bedingt. Würde sich der hypothetische Zusammenhang von 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung und MAO-B Aktivität jedoch bestätigen, so wäre es auch möglich, dass die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme und Metabolisierung die Neuroinflammation bedingt und dass die erhöhte Desaminierung durch MAO-B neurotoxisch wirkt. Inwieweit sich MAO-B Aktivität und Neuroinflammation reziprok beeinflussen, bleibt Gegenstand der aktuellen Forschung. Jedoch müssen die sich gegenseitig beeinflussenden Faktoren bei der zukünftigen Planung und Auswertung von Experimenten im Hemiparkinsonmodell zwingend bedacht werden. Dies gilt insbesondere für Studien, die wie diese Arbeit auf die Evaluation von Tracern für die Bildgebung des Metabolismus aromatischer Aminosäuren und von Neuroinflammation abzielen.

4.5 Fazit Teilstudie I

Abschließend sollen die wichtigsten aus Teilstudie I abgeleiteten Erkenntnisse bezüglich des Zusammenhangs von Neuroinflammation und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im Hemiparkinsonmodell zusammengefasst werden.

Auch wenn die zugrundeliegenden Mechanismen der Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA in von Neuroinflammation betroffenen Arealen im Rahmen dieser Studie noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten, so wurde dennoch gezeigt, dass ein unspezifisches 6-[¹⁸F]FDOPA Signal in neuroinflammatorischen Arealen auftritt und das unabhängig von der Lokalisation der Neuroinflammation.

Des Weiteren konnten anhand der Ergebnisse einige Schlussfolgerungen bezüglich der Anreicherungsmechanismen gezogen werden. Aufgrund der signifikanten Korrelation zwischen [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Signal zum Zeitpunkt t1, wurde zunächst vermutet, dass aktivierte Mikrogliazellen die erhöhte Aufnahme von 6-[¹⁸F]FDOPA bedingen. Da vier Wochen nach der Operation (t2) jedoch keine signifikante Korrelation

mehr bestand, obwohl via PET und durch immunhistochemische Färbungen eine Aktivierung der Mikrogliazellen nachweisbar war, konnte der direkte Zusammenhang zwischen aktivierter Mikroglia und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung ausgeschlossen werden. Die weiteren Ergebnisse dieser Studie deuteten daraufhin, dass die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung in entzündeten Arealen mit einer erhöhten MAO Aktivität in Astrozyten einhergehen könnte. Da bekannt ist, dass eine hohe MAO Aktivität und der damit einhergehende vermehrte Aminosäureabbau neurotoxisch wirken, könnten Neuroinflammation und Aminosäureabbau in Astrozyten durch MAO mechanistisch verbunden sein.

Dieser Zusammenhang von Neuroinflammation und gesteigertem 6-[¹⁸F]FDOPA Abbau ist auch klinisch relevant, da Humanpatienten mit Morbus Parkinson Inflammation innerhalb des nigrostriatalen Systems aufweisen. Eine erhöhte Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA im Zuge der Neuroinflammation birgt folglich das Risiko einer Maskierung der für Morbus Parkinson charakteristischen Dopaminverarmung. Dies müsste folglich auch bei der Auswertung von 6-[¹⁸F]FDOPA PET Bildern zur Diagnose von Morbus Parkinson berücksichtigt werden.

Auch Dedaone-Montaudié *et al.* weisen darauf hin, dass der Zusammenhang von 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake und Neuroinflammation bisher nur unzureichend erforscht wurde und nicht ausgeschlossen ist, dass Neuroinflammation, entgegen der bisherigen Meinung, auch die Aufnahme von 6-[¹⁸F]FDOPA in Tumorzellen beeinflusst. Dies macht die Ergebnisse auch für die onkologische Tumorbildgebung relevant.

Neben mangelnder Spezifität zeigte 6-[¹⁸F]FDOPA weitere Nachteile für die Bildgebung der dopaminergen Integrität. So erschwerte die geringe Signal to Background Ratio wiederholt die Quantifizierung. Zudem führte die starke Anreicherung in der Peripherie immer wieder zu Einstrahlungen in die Randbereiche des Gehirns, die zum Teil sogar das striatale Signal überlagerten. Aus diesem Grund wurden in Teilstudie II alternative Tracer zur Bildgebung des dopaminergen Systems evaluiert.

5 Ergebnisse Teilstudie II: Präklinische Evaluation von 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FMT

5.1 Vergleich von 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA im Hemiparkinsonmodell

Aufgrund der eingeschränkten Spezifität und der schlechten Signal to Background Ratio von 6-[¹⁸F]FDOPA wurde in Betracht gezogen, alle weiteren Kleintierbildgebungsstudien mit 6-[¹⁸F]FMT durchzuführen. Deshalb wurde zunächst getestet, ob das am INM-5 synthetisierte 6-[¹⁸F]FMT bessere Bildgebungseigenschaften aufweist als das zuvor verwendete 6-[¹⁸F]FDOPA. Der Vergleich fand anhand der vier Hemiparkinson Ratten statt, die bereits im Rahmen des Vergleichs von 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA1106 in Teilstudie I getestet wurden (vgl. Kapitel 3.4) Für den Vergleich von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT wurde das MFB Hemiparkinsonmodell gewählt, um eine Überlagerung des striatalen Signals durch ein unspezifisches, durch Neuroinflammation induziertes Signal auszuschließen. Die Messungen erfolgten vier Wochen nach 6-OHDA Injektion in das rechte MFB. Der 6-[¹⁸F]FMT PET Scan fand einen Tag nach dem 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scan statt, um die Vergleichbarkeit gewährleisten zu können. Daraufhin wurde untersucht, welcher der getesteten Tracer für die Detektion und Quantifizierung der Dopaminverarmung im Striatum am besten geeignet ist. Abbildung 47 zeigt die Ergebnisse der PET Messungen im Hemiparkinsonmodell von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT.

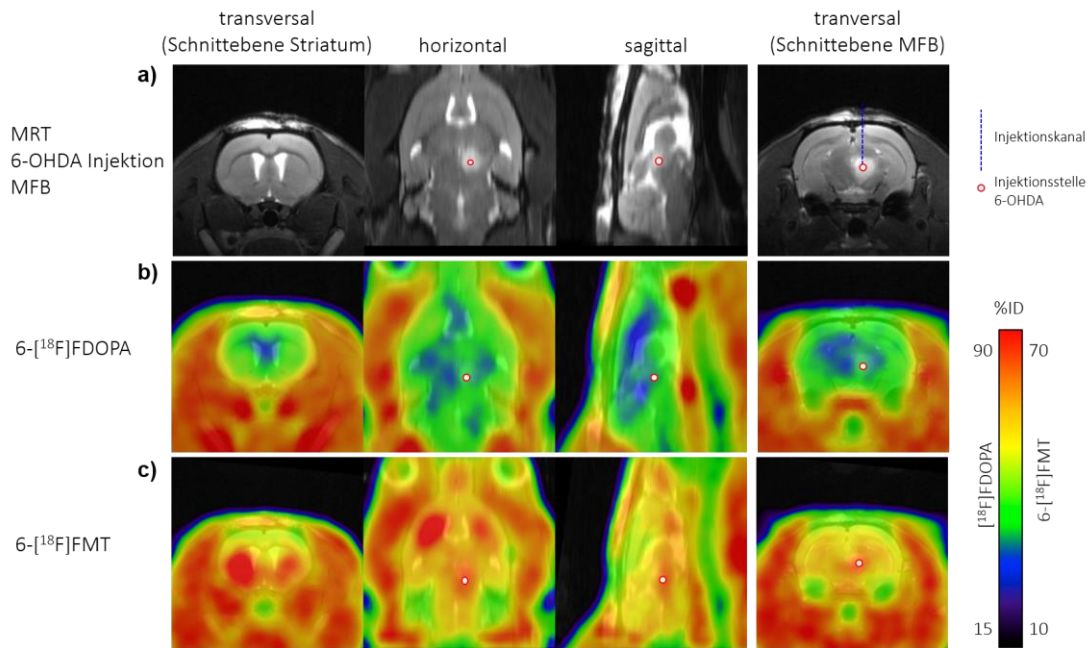


Abbildung 47: *In vivo* Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell vier Wochen nach 6-OHDA Injektion in das rechte MFB (dargestellt in allen drei Schnittebenen).

(a) MRT zur Identifizierung der anatomischen Strukturen und Lokalisierung des Striatum (Schnittebene Striatum) und des läsierten MFB (Schnittebene MFB). (b) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FDOPA Messungen (n=4). (c) Mittelwert der 6-[¹⁸F]FMT Messungen (n=4).

Für den Tracervergleich von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell wurden folgende Kriterien untersucht: Die mittlere Signalstärke innerhalb des linken (Kontrolle) und des rechten Striatum (Hemiparkinson), das Backgroundniveau, die Signal to Background Ratio, das periphere Traceruptake (gemessen an der Signalstärke innerhalb der Nackenmuskulatur) und die Signalstärke innerhalb der Läsion im MFB, also am Ort der 6-OHDA Injektion. Die Ergebnisse der Tracerevaluation sind in Abbildung 48 grafisch dargestellt, sie werden im Folgenden beschrieben.

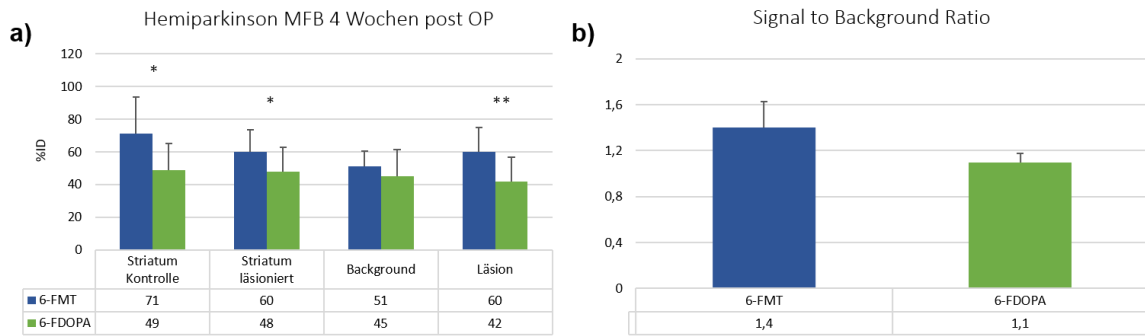


Abbildung 48: Grafische Darstellung der *in vivo* Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell vier Wochen nach 6-OHDA Injektion in das rechte MFB (n=4).

(a) Vergleich der Traceraufnahme im Striatum der läsiionierten Hemisphäre, im gesunden Striatum, innerhalb der Läsion (MFB) und des Backgroundniveaus. **(b)** Vergleich der Signal to Background Ratio.

Mit 6-[¹⁸F]FDOPA war die Dopaminverarmung im rechten Striatum nicht detektierbar. Die Quantifizierung ergab sogar ein gegenüber der Kontrollhemisphäre um einen Prozentpunkt erhöhtes striatales 6-[¹⁸F]FDOPA Uptake von 49 %ID. Mit 6-[¹⁸F]FMT war anhand der Betrachtung und Quantifizierung der Bilder zwar eine Reduktion des Traceruptakes innerhalb des läsiionierten Striatum (60 %ID) gegenüber der Kontrollhemisphäre (71 %ID) zu detektieren, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Das Signal im Kontrollstriatum war mit durchschnittlich 71 %ID signifikant ($p=0,02$) höher als das von 6-[¹⁸F]FDOPA (49 %ID). Die 6-[¹⁸F]FMT Anreicherung im Striatum ließ sich im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA deutlich besser vom Background differenzieren, was sich trotz des höheren Backgrounds von 6-[¹⁸F]FMT (51 %ID gegenüber 45 %ID) auch in einer höheren Signal to Background Ratio als die von 6-[¹⁸F]FDOPA widerspiegelte (1,4 gegenüber 1,1). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p=0,051$). Des Weiteren fällt auf, dass sich beide Tracer im Bereich der durch die 6-OHDA Injektion hervorgerufene Läsion im MFB anreicherten. Die Anreicherung im Bereich des läsiionierten MFB war bei 6-[¹⁸F]FMT sogar signifikant höher ($p=0,002$) als bei 6-[¹⁸F]FDOPA (63 %ID gegenüber 46 %ID).

5.2 Vergleich von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit 6-[¹⁸F]FDOPA in gesunden Ratten

Obwohl sich 6-[¹⁸F]FMT signifikant stärker im Bereich des läsierten MFB anreichte, konnte die generelle Eignung von 6-[¹⁸F]FMT für die Bildgebung des Dopaminmetabolismus nachgewiesen werden. Deshalb wurden im darauffolgenden Experiment die Biodistribution und der zeitliche Verlauf der Traceraufnahme von 6-[¹⁸F]FMT mit 6-[¹⁸F]FDOPA und 5-[¹⁸F]FMT in gesunden Ratten verglichen.

5.2.1 Biodistribution

Für den Vergleich der Aminosäure-Tracer wurden drei gesunde Ratten über einen Zeitraum von zwei Stunden mit 6-[¹⁸F]FDOPA, 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FMT einmal mit und einmal ohne periphere AADC Inhibition (durch vorangegangene Benserazidbehandlung) gemessen. Mit diesem Experiment sollten die Anreicherungsmechanismen der Tracer, sowie ihre Biodistribution *in vivo* untersucht werden. Da die Messungen in gesunden Ratten erfolgten, konnte ausgeschlossen werden, dass die Traceranreicherung durch Neuroinflammation beeinflusst wurde. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Radiofluorierungsposition Einfluss auf die Traceraufnahme und -verstoffwechslung nimmt und wie stark die Benserazidbehandlung diese verändert. Hierfür wurden für beide Versuchsbedingungen (mit und ohne periphere AADC Inhibition) zunächst die Summenbilder der zweistündigen Messung erstellt (vgl. Abbildung 49).

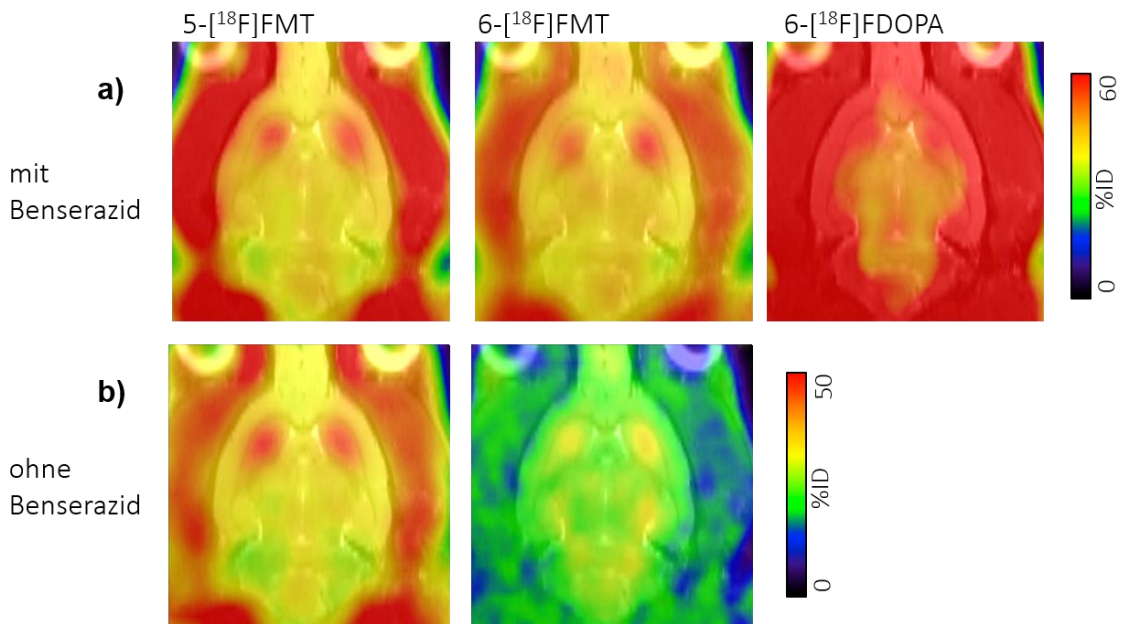


Abbildung 49: *In vivo* Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA, 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FMT in gesunden Ratten, dargestellt als Summenbild über zwei Stunden (Horizontalschnitt, n=3).

(a) Bei vorausgegangener Benserazidbehandlung. (b) Ohne Benserazidbehandlung.

Anhand der jeweils über alle drei Versuchstiere gemittelten PET Bilder wurde die Tracerevaluation per VOI-Analyse durchgeführt. Untersucht wurden die Traceraufnahme im Striatum, das Backgroundniveau und die periphere Anreicherung. Die Ergebnisse der Tracerevaluation sind in Abbildung 50a grafisch dargestellt. Abbildung 50b zeigt die Traceraufnahme bei ausbleibender Benserazidbehandlung jeweils für 5-[¹⁸F]FMT (links) und 6-[¹⁸F]FMT (rechts). In Abbildung 50c ist die durchschnittliche Signal to Background Ratio aufgeführt. Die dargestellten Signifikanzen beziehen sich immer nur auf die Unterschiede der einzelnen Tracer innerhalb des betrachteten Parameters. Die Unterschiede der Traceraufnahme zwischen den Parametern wurden nicht verglichen.

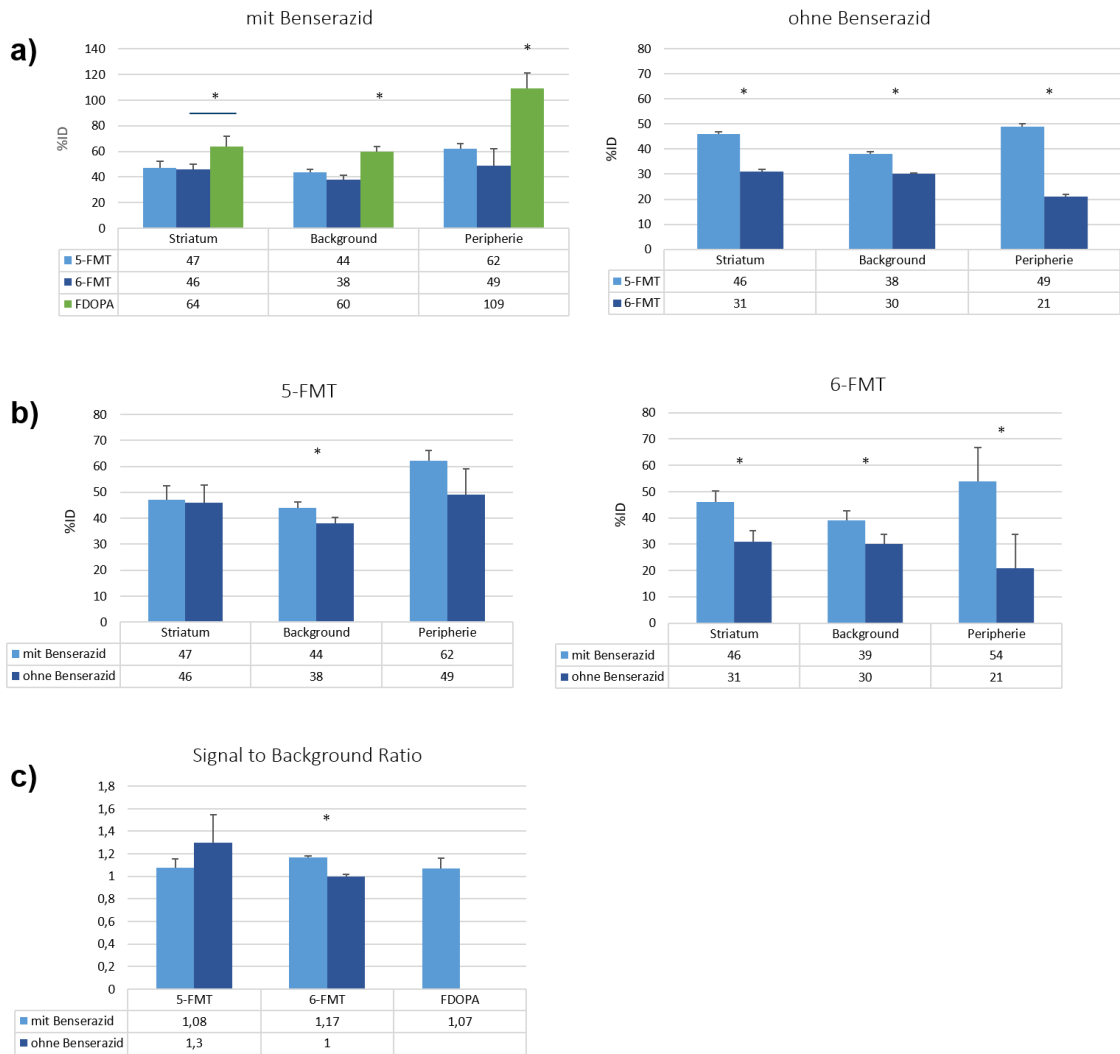


Abbildung 50: Grafische Darstellung der *in vivo* Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA, 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FMT (n=3).

(a) Vergleich der Biodistribution bei vorausgegangener Benserazidbehandlung (links) und ohne Benserazidbehandlung (rechts). (b) Veränderung der Traceraufnahme von 5-[¹⁸F]FMT (links) und 6-[¹⁸F]FMT (rechts) bei ausbleibender Benserazidinjektion. (c) Vergleich der Signal to Background Ratio mit und ohne Benserazidbehandlung.

Im Folgenden wird zunächst die *in vivo* Biodistribution bei AADC Inhibition beschrieben (vgl. Abbildung 49a und Abbildung 50a links). Wie schon bei den vorangegangenen Experimenten zeigten die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen trotz peripherer AADC Inhibition eine starke Einstrahlung aus der Peripherie, die sogar bis ins Striatum reichte und das striatale 6-[¹⁸F]FDOPA Signal überlagerte. Das striatale Signal lag nach vorangegangener Benserazidbehandlung mit 64 %ID sogar tendenziell höher als das von 5-[¹⁸F]FMT (47 %ID) und signifikant höher als das von 6-[¹⁸F]FMT (46 %ID, p=0,02).

Allerdings war auch das 6-[¹⁸F]FDOPA Backgroundniveau mit 60 %ID besonders hoch und lag damit signifikant über dem Backgroundniveau von 5-[¹⁸F]FMT (44 %ID, $p=0,02$) und 6-[¹⁸F]FMT (39 %ID, $p=0,002$). Die striatale Aufnahme, das Backgroundniveau und die periphere Traceranreicherung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT unterschieden sich nicht signifikant. Neben dem höchsten striatalen Uptake und der höchsten Backgroundaktivität wies 6-[¹⁸F]FDOPA auch das höchste periphere Uptake auf (109 %ID). Letzteres war signifikant höher als das periphere Uptake von 5-[¹⁸F]FMT (62 %ID, $p=0,008$) und 6-[¹⁸F]FMT (49 %ID, $p=0,001$), welche sich nicht signifikant voneinander unterschieden.

Im Folgenden werden die Messergebnisse bei AADC Inhibition mit den Messergebnissen ohne AADC Inhibition verglichen (vgl. Abbildung 50). Zunächst wird die veränderte Traceraufnahme nach ausbleibender Benserazidbehandlung für 5-[¹⁸F]FMT beschrieben (vgl. Abbildung 50b links). Bei 5-[¹⁸F]FMT war das striatale Uptake bei ausbleibender Benserazidbehandlung lediglich um einen Prozentpunkt und somit nicht signifikant verringert gegenüber dem Uptake bei vorangegangener AADC Inhibition. Gleichzeitig war auch das Backgroundniveau signifikant verringert, sodass 5-[¹⁸F]FMT ohne AADC Inhibition mit 1,3 insgesamt die beste Signal to Background Ratio erreichte. Die Signal to Background Ratio lag jedoch nicht signifikant höher als die von 6-[¹⁸F]FMT mit AADC Inhibition (1,17).

Die ausbleibende AADC Inhibition hatte auf die Traceraufnahme von 6-[¹⁸F]FMT einen wesentlich stärkeren Einfluss (Abbildung 48b). Hier führte die fehlende AADC Inhibition zu einer signifikanten Reduktion des striatalen Traceruptakes um 15 Prozentpunkte ($p=0,02$). Auch bei allen anderen untersuchten Parametern veränderte sich die 6-[¹⁸F]FMT Aufnahme bei ausbleibender AADC Inhibition signifikant. Das striatale Uptake sank von 46 auf 31 %ID ($p=0,01$), das Backgroundniveau von 39 auf 30 %ID ($p=0,02$) und die periphere Anreicherung sank von 54 auf 21 %ID ($P=0,02$). 5-[¹⁸F]FMT zeigte bei ausbleibender AADC Inhibition mit Ausnahme eines signifikant niedrigeren Backgroundniveaus (38 %ID gegenüber zuvor 44 %ID, $p=0,01$) keine signifikanten Veränderungen und wies verglichen mit 6-[¹⁸F]FMT ein signifikant höheres striatales Signal (46 %ID gegenüber 31 %ID, $p=0,03$), einen signifikant höheren Background (38 %ID gegenüber 30 %ID, $p=0,01$) und ein signifikant höheres Uptake innerhalb der Nackenmuskulatur (49 %ID gegenüber 21 %ID, $p=0,02$) auf. Die Signal to Background Ratios unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

5.2.2 Zeitaktivitätskurven

Ein weiteres Ziel des Experiments war die Ermittlung des optimalen Messzeitfensters für alle drei Tracer. Hierfür wurde die zweistündige Messung in vier aufeinanderfolgende Zeitfenster von jeweils 30 Minuten aufgeteilt und für jedes dieser Zeitfenster ein Summenbild erstellt (vgl. Abbildung 51a). Die Summenbilder über zwei Stunden ermöglichen zwar die Bewertung der Bildqualität, lassen aber nur eine eingeschränkte Aussage über den zeitlichen Verlauf der Anreicherung und Biodistribution zu, weshalb für jeden Tracer auch Zeitaktivitätskurven für das striatale Signal erstellt wurden (Abbildung 51b). Da weder im PET Bild noch bei der Erstellung der Zeitaktivitätskurve zwischen dem Signal des eigentlichen Tracers und seiner etwaigen Metaboliten differenziert werden konnte, wird bei der folgenden Beschreibung der PET Bilder und der Zeitaktivitätskurven allgemein von 6-[¹⁸F]FDOPA, 5- und 6-[¹⁸F]FMT gesprochen, was das Signal möglicher Metabolite einschließt.

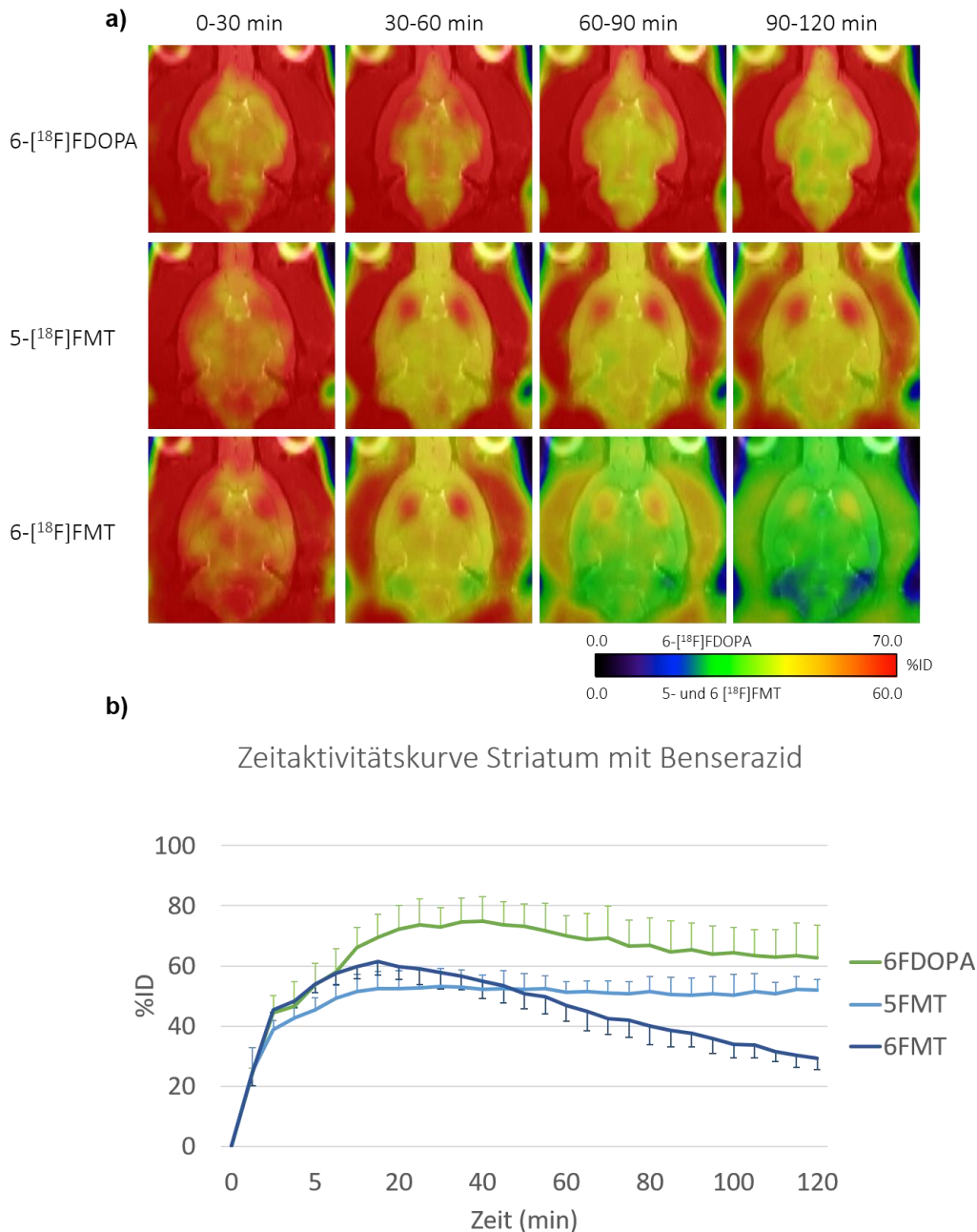


Abbildung 51: Vergleich von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit 6-[¹⁸F]FDOPA bei AADC Inhibition in gesunden Ratten (n=3).

(a) Zerebrale *in vivo* Biodistribution in vier aufeinanderfolgenden Zeitfenstern à 30 Minuten (Horizontalschnitt). (b) Zeitaktivitätskurve der striatalen Traceraufnahme (Mittelwert ± Standardabweichung in %ID) über zwei Stunden.

Abbildung 51a zeigt die *in vivo* Biodistribution von 6-[¹⁸F]FDOPA (oben), 5-[¹⁸F]FMT (Mitte), und 6-[¹⁸F]FMT (unten) in vier aufeinanderfolgenden Zeitfenstern. Im ersten Summenbild der 6-[¹⁸F]FDOPA-Messung von 0 bis 30 Minuten war ein äußerst schwaches striatales 6-[¹⁸F]FDOPA Signal zu erkennen, das mit einer insgesamt hohen

Backgroundaktivität einherging und zu einer sehr schlechten Signal to Background Ratio führte. Erst nach 30 Minuten war eine Anreicherung im rechten und linken Striatum sichtbar, die allerdings, wie bereits bei den vorangegangenen 6-[¹⁸F]FDOPA-Messungen, durch die Einstrahlung der hohen peripheren 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung überlagert wurde. Trotz dieser Einstrahlung eignete sich das Messzeitfenster von 30 bis 60 Minuten post Injektion am besten zur Darstellung der dopaminergen Terminalien im Striatum, da das striatale 6-[¹⁸F]FDOPA Signal im darauffolgenden Zeitfenster von 60 bis 90 Minuten bereits abnahm und von 90 bis 120 Minuten kaum noch vorhanden war.

Auch bei 5- und 6-[¹⁸F]FMT wurde das striatale Signal von 0 bis 30 Minuten durch periphere Einstrahlung überlagert und beide Tracer wiesen eine ebenso schlechte Signal to Background Ratio auf wie 6-[¹⁸F]FDOPA. Erst im Summenbild von 30 bis 60 Minuten war eine deutliche Anreicherung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT im Striatum zu erkennen. Verglichen mit 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA zeigte 6-[¹⁸F]FMT über den gesamten Messzeitraum das insgesamt niedrigste periphere Traceruptake. Während das striatale Signal von 6-[¹⁸F]FMT im Summenbild von 60 bis 90 Minuten bereits abnahm und von 90 bis 120 Minuten nochmals geringer wurde, blieb das 5-[¹⁸F]FMT-Signal nahezu konstant und lieferte somit ein deutlich größeres Messzeitfenster (von 30 bis 120 Minuten post Injektion) bei nahezu gleichbleibender Signalstärke.

Der genaue Verlauf der Traceranreicherung bzw. -auswaschung ist den Zeitaktivitätskurven in Abbildung 29b zu entnehmen. Hier ist das striatale Traceruptake in %ID über die Zeit aufgetragen.

6-[¹⁸F]FDOPA zeigte im Vergleich zu 5- und 6-[¹⁸F]FMT das insgesamt höchste striatale Uptake und war offenbar besser in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. In den ersten drei Minuten stieg der 6-[¹⁸F]FDOPA Gehalt im Striatum rapide auf ca. 45 %ID. Danach verlangsamte sich die Traceraufnahme im Striatum, nahm aber weiter zu bis nach ca. 20 Minuten ein Plateau bei ungefähr 75 %ID erreicht wurde. Nach 40 Minuten begann die Auswaschung und das striatale 6-[¹⁸F]FDOPA Signal sank bis zum Ende der Messung auf ca. 60 %ID.

Bei 5-[¹⁸F]FMT betrug das striatale Signal nach den ersten drei Minuten ca. 40 %ID. Daraufhin erfolgte die Traceraufnahme langsamer bis ein Plateau von ca. 50 %ID erreicht wurde, das von Minute 16 bis Minute 50 fortwährte. Verglichen mit 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT, zeigte 5-[¹⁸F]FMT bis Minute 40 die geringste striatale Anreicherung, was

darauf hinweist, dass 5-[¹⁸F]FMT effektiver von der Blut-Hirn-Schranke zurückgehalten wurde. Im Gegensatz zu den beiden anderen Tracern wurde 5-[¹⁸F]FMT im weiteren Verlauf der Messung nicht zunehmend abgebaut, sondern der striatale Tracergehalt schwankte zwischen 50 und 52 %ID und nahm ab Minute 110 sogar noch einmal zu.

Bei 6-[¹⁸F]FMT lag das striatale Signal nach 3 Minuten bei ca. 45 %ID. Darauf folgte eine langsamere Aufnahme bis 18 Minuten nach der Injektion das Maximum von ca. 60 %ID erreicht wurde. Danach nahm das striatale 6-[¹⁸F]FMT Signal stetig ab, sodass es nach 120 Minuten nur noch 30 %ID betrug. Bei keinem der drei Tracer war eine Akkumulation der Aktivität im Knochen zu beobachten, was dafür spricht, dass alle drei Tracer auch über einen langen Zeitraum *in vivo* stabil waren und nicht defluorierten.

Nach Auswertung der Messungen mit AADC Inhibition in Form von Zeitaktivitätskurven wurden die oben bereits im zweistündigen Summenbild dargestellten PET Messungen ohne AADC Inhibitor (vgl. Abbildung 49b) in gleicher Weise ausgewertet. Die daraus resultierenden vier aufeinanderfolgenden Zeitfenster sowie die Zeitaktivitätskurven sind in Abbildung 52 dargestellt.

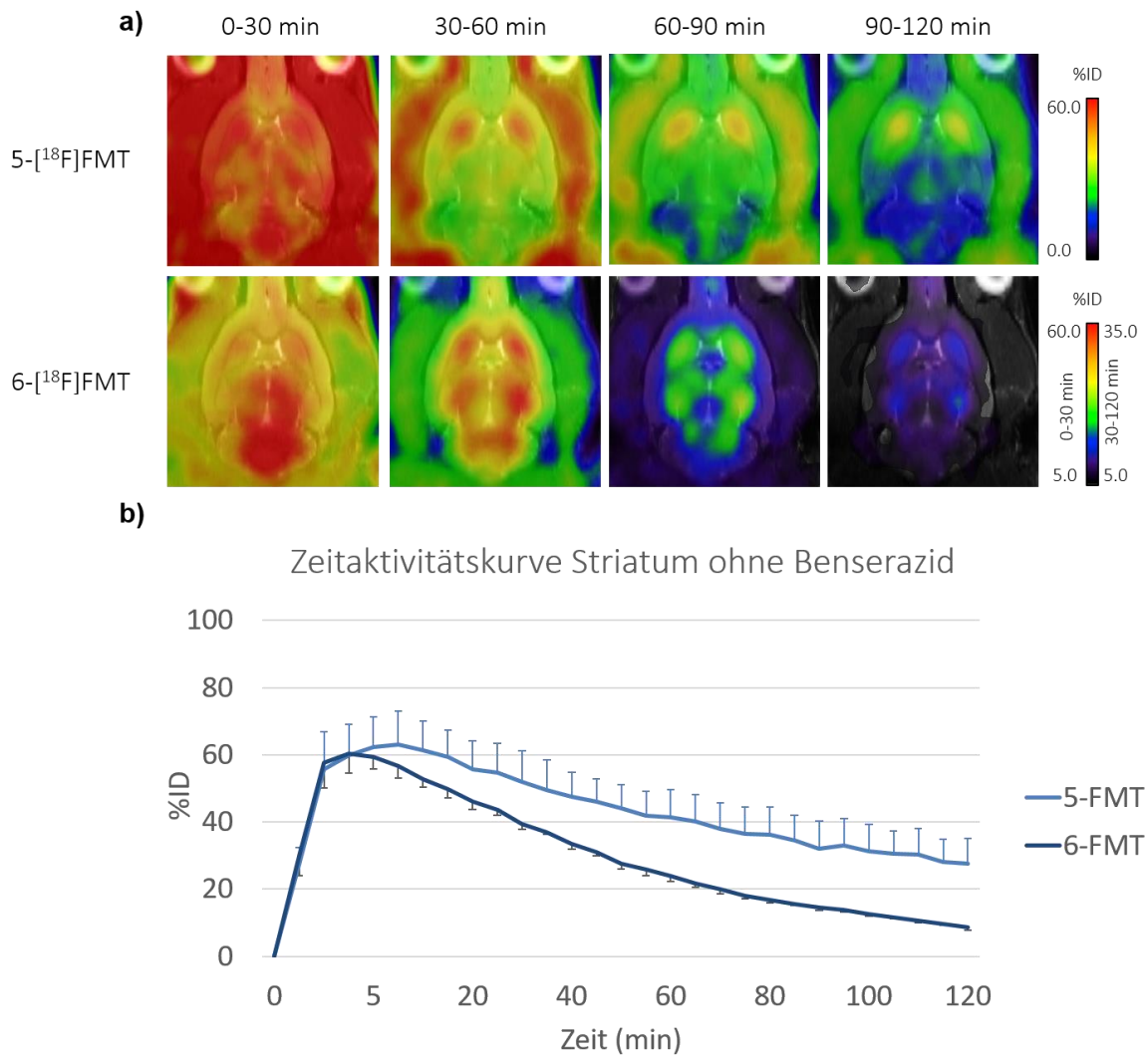


Abbildung 52: Vergleich von 5- und 6-[¹⁸F]FMT ohne AADC Inhibition in gesunden Ratten (n=3).

(a) *In vivo* Biodistribution in vier aufeinanderfolgenden Zeitfenstern à 30 Minuten (Horizontalschnitt).
 (b) Zeitaktivitätskurve der striatalen Traceranreicherung (Mittelwert ± Standardabweichung in %ID).

Erstaunlicherweise waren beide Tracer auch ohne AADC Inhibition hirngängig. 5-[¹⁸F]FMT zeigte bereits von 0 bis 30 Minuten ein striatales Signal, das jedoch durch die Einstrahlung des starken peripheren Signals und durch die hohe Backgroundaktivität überlagert wurde. Von 30 bis 60 Minuten waren Backgroundaktivität und peripheres Uptake wesentlich geringer, was die deutliche Visualisierung des Striatum ermöglichte. Im Zeitfenster von 60 bis 90 Minuten war der Abbau und die Auswaschung des 6-[¹⁸F]FMT bereits erkennbar fortgeschritten. Sowohl das striatale Signal als auch die Anreicherung in der Peripherie nahm gegenüber den vorangegangenen 30 Minuten ab. Dieser Prozess führte sich von 90 bis 120 Minuten zwar weiter fort, dennoch ließ sich

nach wie vor ein deutliches striatales Signal erkennen, welches sich deutlich von der geringen Backgroundaktivität absetzte.

Bei 6-[¹⁸F]FMT lag im ersten Messzeitfenster von 0 bis 30 Minuten nur ein schwaches Signal im Striatum vor. Das periphere Signal war verglichen mit 5-[¹⁸F]FMT deutlich geringer, dafür lag ein höheres Uptake im Cerebellum und im Mittelhirn vor. Ab Minute 30 war der Abbau und die Ausschwemmung von 6-[¹⁸F]FMT deutlich fortgeschritten (weshalb eine Anpassung der Skalierung notwendig war, um das Traceruptake auch ab Minute 30 graphisch darstellen zu können), die ebenfalls geringere Backgroundaktivität und die dadurch verbesserte Signal to Background Ratio führten jedoch zu einer klareren Visualisierung der striatalen 6-[¹⁸F]FMT Anreicherung. Das zuvor diffuse Signal manifestierte sich zu einem paarigen Uptake innerhalb des Mittelhirns. Dieses Phänomen wird an späterer Stelle noch genauer diskutiert. Jenes Signal wurde ab Minute 60 deutlich schlechter und verschwand ab Minute 90 nahezu gänzlich.

Da die striatale Anreicherung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT etwa gleich schnell erfolgte und mit einem Maximalwert von 60 %ID bzw. 63 %ID ähnlich hoch war, kann man annehmen, dass beide Tracer die Blut-Hirn-Schranke mit vergleichbarer Effektivität passierten.

Vergleicht man in einem nächsten Schritt die Zeitaktivitätskurven von 5-[¹⁸F]FMT mit und ohne periphere AADC Inhibition, so fällt auf, dass 5-[¹⁸F]FMT ohne AADC Inhibition initial sogar eine höhere maximale Traceraufnahme im Striatum zeigte (65 %ID) als mit AADC Inhibition (45-55 %ID). Die Abnahme des Tracersignals erfolgte ohne AADC Inhibition jedoch ebenfalls schneller, wohingegen mit AADC Inhibition nahezu keine Verringerung des striatalen 5-[¹⁸F]FMT Signals innerhalb des Messzeitraums von 120 Minuten beobachtet werden konnte.

Vergleicht man die 6-[¹⁸F]FMT Messung mit und ohne Benserazid, lässt sich ein geringerer Einfluss der AADC Inhibition auf das maximale striatale Uptake erkennen (in beiden Fällen ca. 60 %ID). Ähnlich wie bei 5-[¹⁸F]FMT erfolgte die striatale Aufnahme und der darauffolgende Abbau ohne AADC Inhibition jedoch schneller.

Das konstant bleibende 5-[¹⁸F]FMT Signal bei AADC Inhibition lässt sich entweder dadurch erklären, dass 5-[¹⁸F]FMT einer geringeren Metabolisierung unterlag und somit effektiver getrappt wurde oder aber, dass 5-[¹⁸F]FMT im Striatum zwar weiter

verstoffwechselt und abgebaut wurde, neues 5-[¹⁸F]FMT jedoch in gleichem Maße aus der Peripherie ins Gehirn übertrat und es deshalb zu einer Art Fließgleichgewicht kam.

Um dies zu ergründen und weitere Aussagen über den Einfluss von AADC auf die zerebrale und periphere Verstoffwechslung treffen zu können, wurden neben der Zeitaktivitätskurve für das striatale Signal auch Zeitaktivitätskurven für die Traceraufnahme innerhalb der Peripherie (gemessen innerhalb der Nackenmuskulatur) und das Backgroundniveau von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit und ohne AADC Inhibition erstellt. Abbildung 53 stellt die Ergebnisse der gemessenen Parameter für 5- und 6-[¹⁸F]FMT gegenüber.

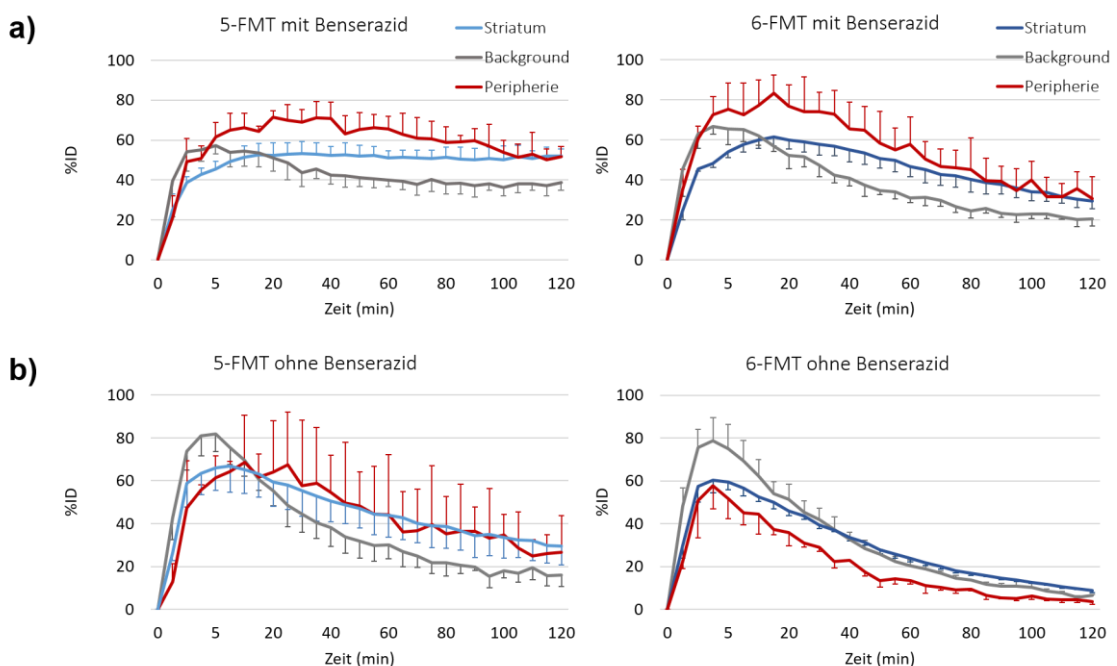


Abbildung 53: Vergleich von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit und ohne Benserazidbehandlung (n=3).

(a) Zeitaktivitätskurven der Traceraufnahme nach Benserazidbehandlung (Mittelwert \pm Standardabweichung in %ID) im Striatum, in der Peripherie und der Backgroundaktivität über zwei Stunden. (b) Zeitaktivitätskurven der zuvor genannten Areale bei ausbleibender Benserazidbehandlung.

Vergleicht man die Zeitaktivitätskurven von 5- und 6-[¹⁸F]FMT bei vorangegangener AADC Inhibition durch Benserazid (Abbildung 53a), so fällt auf, das 6-[¹⁸F]FMT initial zwar eine höhere Anreicherung in allen drei Referenzarealen zeigte, jedoch auch schneller wieder abgebaut wurde. Der Rückgang des 6-[¹⁸F]FMT Gehalts im Striatum ging mit einem in gleichem Maße reduzierten peripheren Signal und Backgroundsignal

einher. Das striatale Uptake von 5-[¹⁸F]FMT blieb nach Erreichen des Plateaus konstant. Auch die Backgroundkurve und die Kurve des peripheren Signals verlaufen flacher, was auf einen insgesamt langsameren Abbau hindeutete und gegen die Hypothese eines Fließgleichgewichts spricht.

6 Diskussion Teilstudie II: Präklinische Evaluation von 5-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FMT

6.1 Vergleich von 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA im Hemiparkinsonmodell

Obwohl DeJesus *et al.* mit 6-[¹⁸F]FMT bereits Anfang der 90er Jahre eine geeignete Alternative zu 6-[¹⁸F]FDOPA entwickelten, ist 6-[¹⁸F]FDOPA vor allem in der Kleintierbildgebung noch der Standardtracer für Studien zur Untersuchung des dopaminergen Systems (Kyono *et al.*, 2011). Auch wenn sich das klinische Einsatzgebiet von 6-[¹⁸F]FDOPA in den letzten zehn Jahren auf die Tumorbildgebung in der Onkologie ausweitete, wird 6-[¹⁸F]FDOPA nach wie vor bei Follow up Studien oder zur Diagnose von Parkinson-Patienten eingesetzt (Chevalme *et al.*, 2007; Pavese & Brooks, 2009; Wile *et al.*, 2017; Criswell *et al.*, 2018). Dabei gibt es neben der in dieser Arbeit aufgezeigten fehlenden Spezifität bei Neuroinflammation weitere gravierende Nachteile, die sich auch im Vergleich mit 5- und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell manifestierten (vgl. Kapitel 5.1). Wie bereits in Teilstudie I (vgl. Kapitel 3.2 und 3.3), konnte auch diesmal mit 6-[¹⁸F]FDOPA keine Reduktion des striatalen Uptakes in Folge der 6-OHDA Injektion nachgewiesen werden (vgl. Kapitel 5.1, Abbildung 48a). Hier zeigte 6-[¹⁸F]FDOPA sogar ein gegenüber der Kontrollhemisphäre um einen Prozentpunkt erhöhtes Signal, und das, obwohl bei neurotoxinbasierten Hemiparkinsonmodellen davon auszugehen ist, dass die dopaminerge Degeneration und somit die AADC Aktivität im Striatum bereits unmittelbar nach Injektion reduziert wird (Jackson-Lewis *et al.*, 1995; Zuch *et al.*, 2000; Pulagam *et al.*, 2017). Um hier jedoch eine abschließende Aussage treffen zu können, sind weitere TH Färbungen der Gehirne geplant, die eine 6-OHDA Läsion im MFB aufweisen.

Die geringe Signal to Background Ratio von 6-[¹⁸F]FDOPA machte die Differenzierung des striatalen Signals vom Background nahezu unmöglich. Da 6-[¹⁸F]FMT sogar eine höhere Backgroundaktivität als 6-[¹⁸F]FDOPA zeigte, resultiert die deutlich bessere Signal to Background Ratio folglich aus dem signifikant höheren striatalen 6-[¹⁸F]FMT Signal (vgl. Kapitel 5.1, Abbildung 48a). Generell zeigte 6-[¹⁸F]FMT in allen untersuchten Parametern eine höhere Aufnahme, was auf eine bessere Hirngängigkeit und somit eine höhere Verfügbarkeit für die Dopaminsynthese schließen lässt. Das geringe striatale 6-[¹⁸F]FDOPA Signal deutet hingegen auf eine geringe Verfügbarkeit von

6-[¹⁸F]FDOPA für die Verstoffwechslung zu 6-[¹⁸F]FDA hin. Diese ist wahrscheinlich mit der wesentlich stärkeren Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA in der Peripherie verknüpft, die im Rahmen dieser Arbeit immer wieder zu starker Einstrahlung in die Randbereiche des Gehirns führte (vgl. Kapitel 3.1.2, Abbildung 31c und Kapitel 3.3.1, Abbildung 43c). Die Ursachen für die geringere Verfügbarkeit von 6-[¹⁸F]FDOPA für die zerebrale Dopaminsynthese sollen im Folgenden erläutert werden.

Während die Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA zu 6-[¹⁸F]FDA im Gehirn zwingende Voraussetzung für die Dopaminsynthese und somit für die Testung der dopaminergen Integrität ist, ist bekannt, dass die frühzeitige periphere Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA zu 6-[¹⁸F]FDA durch das Enzym AADC die Tracerverfügbarkeit im Gehirn deutlich verringert, da 6-[¹⁸F]FDA im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA nur geringfügig hirngängig ist (Kent *et al.*, 1990; Leung, 2004; Walker *et al.*, 2013).

Um die 6-[¹⁸F]FDOPA Verfügbarkeit im Gehirn zu erhöhen, wurde vor der Applizierung von 6-[¹⁸F]FDOPA der AADC Inhibitor Benserazid verabreicht (15 mg/kg, vgl. Kapitel 2.7), der die periphere Decarboxylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA unterbindet (Pardridge & Oldendorf, 1975; Reith *et al.*, 1990; Larterra *et al.*, 1999). Auch in der klinischen Anwendung von 6-[¹⁸F]FDOPA oder der symptomatischen Therapie von Morbus Parkinson durch L-DOPA werden vor allem Carbidopa und Benserazid zur AADC Inhibition eingesetzt (Treseder *et al.*, 2003).

Da AADC inhibiert wurde, ist das hohe periphere Signal folglich nicht durch die Metabolisierung zu 6-[¹⁸F]FDA zu erklären. 6-[¹⁸F]FDOPA weist jedoch noch einen weiteren Metabolisierungsweg auf (vgl. Kapitel 1.4.2, Abbildung 13). Über diesen wird 6-[¹⁸F]FDOPA durch COMT zu 3-[¹⁸F]OMFD methyliert (Ruottinen & Rinne, 1998; Leung, 2004). Metabolitenanalysen zeigten, dass 6-[¹⁸F]FDOPA im Blutplasma nach AADC Inhibition vor allem zu 3-[¹⁸F]OMFD verstoffwechselt wird, das auch noch Stunden nach Tracerinjektion im Blut nachweisbar ist (Walker *et al.* 2013; Berlitz 2006).

Im Gegensatz dazu wird 6-[¹⁸F]FDA entweder von COMT zu 3-[¹⁸F]MT methyliert oder von MAO zu 6-[¹⁸F]FDOPAC oxidiert, schließlich zu 3-[¹⁸F]HVA abgebaut und schnell renal ausgeschieden (Berlitz, 2006; Kumakura & Cumming, 2009). Außerdem zeigten Humanpatienten nach 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans ohne COMT Inhibition ein homogen verteiltes 3-[¹⁸F]OMFD Signal im gesamten Körper und kein spezifisches Signal in

Organen (Beuthien-Baumann *et al.*, 2003), was ebenfalls für eine Retention des 3-[¹⁸F]OMFD im Plasma und einen langsamen Abbau innerhalb der Peripherie spricht.

Des Weiteren ist 3-[¹⁸F]OMFD bidirektional hirngängig (Pardridge & Oldendorf, 1975; Reith *et al.*, 1990; Laterra *et al.*, 1999). Im Gehirn geht 3-[¹⁸F]OMFD jedoch nicht in die Dopaminsynthese ein und lagert sich nur geringfügig in spezifischen Hirnarealen an (Wahl *et al.*, 1994; Leung, 2004). Die daraus resultierende diffuse Verteilung von 3-[¹⁸F]OMFD im gesamten Gehirn erklärt die hohen Backgroundaktivität und die geringere Traceraufnahme bei ausbleibender COMT Inhibition (Ruottinen & Rinne, 1998; Männistö & Kaakkola, 1999). Da in der vorliegenden Studie ebenfalls kein COMT Inhibitor eingesetzt wurde, ist dies vermutlich auch hier der Grund für die hohe Backgroundaktivität der 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans. Darüber hinaus wird vermutet, dass die 6-[¹⁸F]FDOPA Methylierung durch die Inhibition von AADC zusätzlich verstärkt wird, da COMT bei ausbleibender Decarboxylierung eine höhere Zugänglichkeit zu 6-[¹⁸F]FDOPA erhält (Kent *et al.*, 1990).

Außerdem scheint 6-[¹⁸F]FDOPA in Ratten einer noch stärkeren peripheren Methylierung zu unterliegen als in Humanpatienten (Walker *et al.* 2013). Bei ausschließlicher AADC Inhibition resultiert das periphere Tracersignal im Blut von Ratten bereits 15 Minuten nach 6-[¹⁸F]FDOPA Injektion zu 50 % aus 3-[¹⁸F]OMFD. Diese schnellere Methylierung schränkt die 6-[¹⁸F]FDOPA Bildgebung in Rattenmodellen erheblich ein (Walker *et al.* 2013).

Die Limitierung von 6-[¹⁸F]FDOPA durch die periphere COMT Aktivität ist der Grund, wieso in neueren Studien, neben der Verabreichung von AADC Inhibitoren, zusätzlich COMT Inhibitoren wie Entacapone and Nitecapone eingesetzt werden (Leung, 2004; Bonifácio *et al.*, 2007).

In dieser Arbeit wurde ausschließlich AADC inhibiert. Indem die Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FDOPA (Substrat für COMT) der Metabolisierung von [¹⁸F]FMT (kein Substrat für COMT) gegenübergestellt wurde, konnte überprüft werden, welchen Einfluss COMT auf die Verstoffwechslung und die damit einhergehende Qualität der entstehenden PET Bilder nimmt. Gleichzeitig wurde die Vergleichbarkeit mit zuvor erhobenen 6-[¹⁸F]FDOPA PET Daten gewährleistet, da die ausschließliche AADC Inhibition die in der Arbeitsgruppe für die 6-[¹⁸F]FDOPA Bildgebung etablierte Vorgehensweise ist.

6-[¹⁸F]FMT zeigte in allen untersuchten Parametern eine höhere Aufnahme als 6-[¹⁸F]FDOPA (vgl. Kapitel 5.1), was auf eine allgemein bessere Hirngängigkeit hindeutet. Dies ist dadurch zu erklären, dass 6-[¹⁸F]FMT im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA keine Catecholstruktur aufweist und somit kein Substrat für COMT darstellt (Firnau *et al.*, 1973; DeJesus *et al.*, 1990, 1997a). 6-[¹⁸F]FMT unterliegt somit einer geringeren peripheren Verstoffwechslung, sodass ein größerer Anteil des injizierten Tracers über LAT1 ins Gehirn gelangen kann (Firnau *et al.*, 1973; DeJesus *et al.*, 1990, 1997a). Diese höhere Verfügbarkeit von 6-[¹⁸F]FMT erklärt vermutlich sowohl das signifikant höhere Signal im gesunden als auch im läsierten Striatum (vgl. Kapitel 5.1, Abbildung 48a). Das signifikant höhere striatale Signal spiegelt sich jedoch nicht in einer signifikant höheren Signal to Background Ratio wieder (vgl. Kapitel 5.1, Abbildung 48 b), was mit dem allgemein höheren Backgroundniveau von 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA zusammenhängt. Woher das hier beobachtete hohe Backgroundniveau von 6-[¹⁸F]FMT herrührt, ist angesichts des weniger komplexen Stoffwechselweges von 6-[¹⁸F]FMT fraglich. Durch die ausbleibende Methylierung durch COMT, unterliegt 6-[¹⁸F]FMT nicht nur einer geringeren peripheren Verstoffwechslung, wie zuvor bereits beschrieben, sondern bildet auch innerhalb des Gehirns weniger Metaboliten als 6-[¹⁸F]FDOPA (vgl. Kapitel 1.4.2, Abbildung 13) (DeJesus *et al.*, 1997a; Doudet *et al.*, 1999; The MICAD Research Team, 2004). Dort wird 6-[¹⁸F]FMT von AADC zu 6-[¹⁸F]FMTA decarboxyliert und daraufhin von MAO zu 6-[¹⁸F]FPAC oxidiert (DeJesus *et al.*, 1997a; Jordan *et al.*, 1997).

In Studien von Jordan *et al.* lag die Konzentration von 6-[¹⁸F]FMTA im Striatum 20 bis 120 Minuten nach Tracerinjektion unter der Nachweisgrenze der HPLC (Jordan *et al.*, 1997). Sie vermuten daher, dass 6-[¹⁸F]FMTA nur sehr kurz als Intermediat besteht und nahezu unmittelbar zu 6-[¹⁸F]FPAC verstoffwechselt wird. Diese von Jordan *et al.* beschriebene geringfügige 6-[¹⁸F]FMTA Konzentration im Gehirn macht es sehr unwahrscheinlich, dass 6-[¹⁸F]FMTA in der vorliegenden Studie für die hohe Backgroundaktivität verantwortlich war.

Darüber hinaus sind die Anreicherungsmechanismen von 6-[¹⁸F]FMT nach wie vor nicht vollständig aufgeklärt. DeJesus *et al.* zeigten anhand von Mikrodialysen, dass das striatale Tracersignal nach 6-[¹⁸F]FMT Injektion hauptsächlich auf 6-[¹⁸F]FPAC zurückzuführen ist (DeJesus *et al.*, 1997a). Die extra- und intrazelluläre 6-[¹⁸F]FPAC

Konzentration war dabei nahezu identisch. Sie schlussfolgerten daraus, dass 6-[¹⁸F]FPAC frei durch die neuronale Membran diffundieren kann. Untersuchungen von Jordan *et al.* weisen hingegen auf ein vesikuläres Trapping von 6-[¹⁸F]FPAC in den dopaminergen Terminalien hin (Jordan *et al.*, 1997).

Auch wenn die Ursache für die striatale Anreicherung noch unklar ist, deutet das in vielen Studien beobachtete konstante striatale Signal darauf hin, dass 6-[¹⁸F]FPAC als Endprodukt der 6-[¹⁸F]FMT Verstoffwechslung in den dopaminergen Terminalien getrappt und aufgrund der ausbleibenden Verstoffwechslung durch COMT nur langsam abgebaut wird (Endres *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1997; Doudet *et al.*, 1999; Forny-Germano *et al.*, 2014). Des Weiteren resultiert das striatale Signal sowohl bei Affen als auch bei Ratten überwiegend aus der Anreicherung von 6-[¹⁸F]FPAC und nur geringfügiger aus unverstoffwechseltem 6-[¹⁸F]FMT (Doudet *et al.*, 1999). Demnach wäre das beobachtete Backgroundsignal vermutlich auf unverstoffwechseltes 6-[¹⁸F]FMT und nicht auf 6-[¹⁸F]FPAC zurückzuführen.

Die in dieser Studie verhältnismäßig geringe Signal to Background Ratio von 6-[¹⁸F]FMT widerspricht den Ergebnissen von DeJesus *et al.*, die 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA in mit Carbidopa vorbehandelten Affen evaluierten. Hier zeigte 6-[¹⁸F]FMT 85 Min nach Tracerinjektion eine deutlich höhere Signal to Background Ratio von 5,8 gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA mit 1,8, wobei als Referenzregion ebenfalls das Cerebellum diente (DeJesus *et al.*, 1997a). Da das Messzeitfenster in dem vorliegenden Vergleich von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell nur 30 bis 60 Minuten nach Tracerinjektion umfasste und in einem anderen Modellorganismus vorgenommen wurde, lassen sich diese Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt vergleichen.

Die Ursache für die beobachtete höhere Backgroundaktivität kann auf Basis des vorliegenden Experiments nicht eindeutig geklärt werden. Eine hypothetische Erklärung ist jedoch die vielerseits angenommene höhere Affinität von 6-[¹⁸F]FMT zu AADC (DeJesus *et al.*, 1995; Gallagher *et al.*, 2011). Diese könnte dazu führen, dass sich 6-[¹⁸F]FMT auch in Arealen anreichert, die eine geringere AADC Aktivität aufweisen und die 6-[¹⁸F]FDOPA aufgrund seiner geringeren Affinität zu AADC nicht oder nur geringfügig visualisiert.

Trotz der nicht signifikant höheren Signal to Background Ratio von 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA ließ sich eine Verringerung des striatalen Signals innerhalb des

läsionierten Striatum im Vergleich zur gesunden Hemisphäre sowohl durch Quantifizierung als auch durch visuelle Begutachtung detektieren. Dies deutet darauf hin, dass sich 6-[¹⁸F]FMT deutlich besser zur Visualisierung und Quantifizierung der Dopaminverarmung im Striatum eignet. In der Forschungsliteratur wird jedoch kontrovers diskutiert, inwieweit das Signal von 6-[¹⁸F]FMT mit der tatsächlichen Dopaminverfügbarkeit korreliert (Endres *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1999; Doudet *et al.*, 1999). 6-[¹⁸F]FMT reichert sich aufgrund seiner höheren AADC Affinität zwar stärker in dopaminergen Terminalien des Striatum an, diese Anreicherung korreliert jedoch nicht mit der Dopaminkonzentration (Brown *et al.*, 1999; Doudet *et al.*, 1999). Dies ist dadurch zu erklären, dass 6-[¹⁸F]FMT zu 6-[¹⁸F]FMTA metabolisiert wird (Leung, 2004; The MICAD Research Team, 2004; Prante *et al.*, 2013), das im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDA eine nur geringe Affinität zu VMAT aufweist und daher unmittelbar von MAO zu 6-[¹⁸F]FPAC verstoffwechselt wird. 6-[¹⁸F]FPAC reichert sich daraufhin in den striatalen Terminalien an (Jordan *et al.*, 1997). Aufgrund des nur langsamen Abbaus von 6-[¹⁸F]FPAC im Striatum wird vermutet, dass es im Striatum getrappt wird. Ob dies wie bei 6-[¹⁸F]FDA in Form von vesikulärer Speicherung geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt (Endres *et al.*, 1997; Jordan *et al.*, 1997; Doudet *et al.*, 1999).

Darüber hinaus ist bekannt, dass sich 6-[¹⁸F]FMT aufgrund seiner höheren AADC Affinität auch stärker in serotonergen und noradrenergen Neuronen anreichert, die ebenfalls eine hohe AADC Aktivität aufweisen. Dies kann je nach Fragestellung einer Studie von Vor- oder Nachteil sein. Für die in dieser Studie angestrebte Quantifizierung der im Hemiparkinsonmodell eintretenden Dopaminverarmung ist 6-[¹⁸F]FMT sehr gut geeignet, da sich im Striatum neben den dopaminergen Terminalien nur geringfügig serotonerge und noradrenerge Terminalien befinden, die das Signal durch eine unspezifische Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT beeinflussen könnten (Brown *et al.*, 1999). Zielt eine Studie jedoch auf die Quantifizierung des effektiven Dopamin-Turnovers und der Transmitterkonzentration ab, ist 6-[¹⁸F]FMT nur bedingt geeignet (Doudet *et al.*, 1999).

Eine weitere Auffälligkeit des Vergleichs von 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinsonmodell war die Anreicherung beider Tracer im Bereich des läsionierten MFB. Dieses Phänomen wurde für 6-[¹⁸F]FDOPA bereits in Teilstudie I beobachtet und diskutiert. Die hier vorliegenden Messergebnisse deuten nun zusätzlich darauf hin, dass

6-[¹⁸F]FMT ebenfalls den in Teilstudie I postulierten Anreicherungsmechanismen in neuroinflammatorischen Arealen unterliegt (vgl. Kapitel 4.4.1). Das 6-[¹⁸F]FMT Uptake war im Bereich der Läsion sogar signifikant höher als das von 6-[¹⁸F]FDOPA (60 %ID gegenüber 42 %ID), was darauf hindeutet, dass sich 6-[¹⁸F]FMT vermutlich noch stärker in neuroinflammatorischen Arealen anreichert. Dies erscheint vor dem Hintergrund von Teilstudie I insofern schlüssig, als dass 6-[¹⁸F]FMT ebenfalls durch MAO abgebaut wird. Da 6-[¹⁸F]FMT im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA keiner Verstoffwechslung durch COMT unterliegt, ist die Verfügbarkeit von 6-[¹⁸F]FMT für den Abbau durch MAO innerhalb der Astrozyten vermutlich sogar höher und könnte somit die Ursache für die stärkere Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT im Bereich der von Neuroinflammation betroffenen Läsion sein, die in diesem Fall sogar noch vier Wochen nach Injektion zu erkennen ist.

6.2 Vergleich von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit 6-[¹⁸F]FDOPA in gesunden Ratten

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse des Tracervergleichs in gesunden Ratten mit vorangegangener Benserazidinjektion diskutiert, die anhand der gemittelten PET Bilder über zwei Stunden erzielt wurden (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 49a und Abbildung 50a links). Untersucht wurden das striatale Signal, die Backgroundaktivität und das periphere Signal.

Verglichen mit 6-[¹⁸F]FDOPA zeigten sowohl 5- als auch 6-[¹⁸F]FMT signifikante Unterschiede. 6-[¹⁸F]FDOPA wies sogar ein signifikant höheres striatales Signal als 6-[¹⁸F]FMT auf. Dies ist angesichts der bereits in Kapitel 6.1 diskutierten peripheren Methylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA und der damit verringerten zerebralen 6-[¹⁸F]FDOPA Verfügbarkeit sehr erstaunlich. In beiden Fällen wurden ca. 75 MBq injiziert und auch die injizierte Benseraziddosis (15 mg/kg) war identisch. Bei der Quantifizierung wurde explizit darauf geachtet, dass die Bestimmung der durchschnittlichen Backgroundaktivität mit Hilfe der Cerebellum VOI nicht von dem hohen peripheren Signal beeinflusst wird. Da äußere Einflüsse wie injizierte Benserazid- oder Aktivitätsmenge ausgeschlossen werden konnten, wäre eine hypothetische Erklärung ein unterschiedliches Verhalten der Tracer im Hemiparkinsonmodell und in gesunden Ratten. Da die Unterschiede im Tracerverhalten zwischen den Experimenten jedoch nicht auf statistische Signifikanz geprüft wurden, werden sie im Folgenden nicht weiter diskutiert.

Neben des höheren striatalen Signals zeigte 6-[¹⁸F]FDOPA auch eine signifikant höhere Backgroundaktivität und ein signifikant höheres peripheres Signal, sowohl gegenüber 5- als auch gegenüber 6-[¹⁸F]FMT. Dies ist vor dem Hintergrund der Methylierung von 6-[¹⁸F]FDOPA schlüssig und höchstwahrscheinlich auf Formierung des 6-[¹⁸F]FDOPA Metaboliten 3-[¹⁸F]OMFD zurückzuführen (Leung, 2004; The MICAD Research Team, 2004). Wie in Kapitel 6.1 bereits beschrieben wird 3-[¹⁸F]OMFD sowohl im Blut als auch im Gehirn nur langsam abgebaut und weist eine diffuse Verteilung im Gehirn auf (Walker *et al.* 2013; Berlitz 2006). Da 6-[¹⁸F]FMT nicht durch COMT methyliert wird und durch seine weitere Metabolisierung keine hirngängigen Metaboliten entstehen, ist die Backgroundaktivität dementsprechend geringer (Leung 2004; The MICAD Research Team 2004). Darüber hinaus verbleibt 3-[¹⁸F]FPAC, das Endprodukt der 6-[¹⁸F]FMT Metabolisierung nicht lange im Blutpool, wird schneller renal abgebaut und verursacht

somit ein geringeres peripheres Signal (Leung, 2004; The MICAD Research Team, 2004; Berlit, 2006; Walker *et al.*, 2013) (vgl. Kapitel 6.1). Diese Ergebnisse entsprechen folglich der aus der Literatur bekannten Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FMT.

Für die Metabolisierung von 5-[¹⁸F]FMT liegen bisher noch keine Studien vor, da es im Rahmen dieser Arbeit erstmals *in vivo* evaluiert wurde. Da sich die Ergebnisse der Evaluation von 5-[¹⁸F]FMT in gesunden Ratten bei vorangegangener Benserazidbehandlung jedoch nicht signifikant von 6-[¹⁸F]FMT unterschieden, wurde zunächst davon ausgegangen, dass die Verstoffwechslung analog zu der von 6-[¹⁸F]FMT verläuft.

Betrachtet man als nächstes jedoch die Tracerevaluation bei ausbleibender AADC Inhibition (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 49b und Abbildung 50a rechts), so lässt sich erkennen, dass sich 5- und 6-[¹⁸F]FMT in allen untersuchten Arealen signifikant voneinander unterschieden. Somit konnte gezeigt werden, dass 5- und 6-[¹⁸F]FMT entgegen der ersten Vermutung, nicht auf gleiche Weise verstoffwechselt werden, was auf eine unterschiedliche Affinität zu den am Metabolismus beteiligten Enzymen AADC und MAO hindeutet. Wo genau die Unterschiede innerhalb der Verstoffwechslung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT liegen, kann ohne Metabolitenanalyse nicht abschließend geklärt werden. Anhand des im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleichs des Tracerverhaltens mit und ohne AADC Inhibition lassen sich jedoch einige Schlussfolgerungen über die Anreicherungsmechanismen und die Metabolisierung der drei untersuchten Tracer ziehen, die im Folgenden diskutiert werden.

Während die ausbleibende AADC Inhibition bei 6-[¹⁸F]FMT in allen untersuchten Arealen zu einer signifikanten Reduktion des Signals führte (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 50b rechts), zeigte 5-[¹⁸F]FMT lediglich eine signifikante Reduktion des Backgroundsignals (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 50b links) und erreicht somit die insgesamt beste Signal to Background Ratio (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 50c). Da Benserazid einen geringeren Einfluss auf die Verstoffwechslung von 5-[¹⁸F]FMT nimmt, konnte als erstes geschlossen werden, dass 5-[¹⁸F]FMT offenbar ein schlechteres Substrat für AADC darstellt. Somit unterlag 5-[¹⁸F]FMT bei ausbleibender AADC Inhibition einer geringfügigeren peripheren Verstoffwechslung zu 5-[¹⁸F]FMTA. 6-[¹⁸F]FMT weist dagegen, wie bereits in Kapitel 6.1 diskutiert, eine hohe Affinität zu AADC auf und ist offenbar ein besseres Substrat für die Decarboxylierung, wodurch die

AADC Inhibition durch Benserazid auch einen erheblich stärkeren Einfluss auf die Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FMT als von 5-[¹⁸F]FMT nahm. Die geringfügigere periphere Verstoffwechslung von 5-[¹⁸F]FMT zu 5-[¹⁸F]FMTA und 5-[¹⁸F]FPAC bei ausbleibender AADC Inhibition führte vermutlich zu einer höheren Verfügbarkeit des Tracers für den Transport in das Gehirn und für die zentrale Weiterverstoffwechslung. Im Gegensatz dazu wird ein großer Teil von 6-[¹⁸F]FMT durch seine hohe Affinität zu AADC bereits in der Peripherie zu 6-[¹⁸F]FMTA und 6-[¹⁸F]FPAC verstoffwechselt und abgebaut, weshalb auch nur eine geringere Menge des Tracers ins Gehirn gelangt und im Striatum getrappt wird. Dies könnte den signifikanten Unterschied zwischen striatalem 5- und 6-[¹⁸F]FMT Signal bei ausbleibender AADC Inhibition erklären.

Als nächstes wird die striatale Aufnahme der Tracer anhand der Zeitaktivitätskurven mit und ohne AADC Inhibition diskutiert (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 51b). Obwohl die einzelnen Zeitaktivitätskurven nicht ausschließlich auf das Signal der unverstoffwechselten Tracer, sondern auch auf ihre Metaboliten zurückzuführen sind, wird im Folgenden allgemein von 5-[¹⁸F]FMT, 6-[¹⁸F]FMT und 6-[¹⁸F]FDOPA Signal gesprochen, wobei damit auch das Signal ihrer Metabolite eingeschlossen wird.

Die Zeitaktivitätskurve von 6-[¹⁸F]FDOPA zeigt, dass das zuvor bereits diskutierte signifikant höhere striatale Signal bis zum Ende der Messung nahezu konstant blieb. 6-[¹⁸F]FMT zeigte hingegen eine Reduktion des Tracersignals ab Minute 20. Dies ist insofern verwunderlich, als dass in der Literatur ein wesentlich schnellerer Abbau und eine schnellere Auswaschung aus dem Gehirn für 6-[¹⁸F]FDOPA als für 6-[¹⁸F]FMT beschrieben wird (Doudet *et al.*, 1999; DeJesus *et al.*, 2000; The MICAD Research Team, 2004). Obwohl die Tracerevaluation und die Quantifizierung anhand der über zwei Stunden gemittelten PET Bilder keinen signifikanten Unterschied des striatalen Signals von 5- und 6-[¹⁸F]FMT bei vorangegangener Benserazidbehandlung ergab, deckt der Vergleich ihrer Aktivitätskurven einen Unterschied auf. Im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FMT, dessen striatales Signal ab Minute 20 geringer wird, zeigt 5-[¹⁸F]FMT bis zum Messende nach zwei Stunden keinerlei Reduktion des striatalen Signals.

Stellt man diese Ergebnisse nun den Zeitaktivitätskurven ohne Benserazid gegenüber (vgl. Abbildung 52b), so lässt sich erkennen, dass 5-[¹⁸F]FMT ohne Benserazidbehandlung sehr wohl abgebaut wird. Hier wird das 5-[¹⁸F]FMT Signal bereits ab Minute 5 geringer. Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass Benserazid

doch hirngängig ist und AADC somit auch intrazerebral und nicht nur peripher inhibiert, was in der Literatur jedoch häufig verneint und bei der Interpretation der Daten ausgeschlossen wird (Bartholini *et al.*, 1967; Prada *et al.*, 1987; Kent *et al.*, 1990; Durso *et al.*, 2000).

Sollte sich die Theorie der cerebralen Wirkung von Benserazid bestätigen, wäre das konstante 5-[¹⁸F]FMT Signal im Striatum eventuell dadurch zu erklären, dass die ohnehin geringfügigere Decarboxylierung von 5-[¹⁸F]FMT durch AADC Inhibition sowohl peripher als auch zentral vollständig zum Erliegen käme. Da 5-[¹⁸F]FMT auch kein Substrat für COMT ist, würde es folglich überhaupt nicht verstoffwechselt und abgebaut. Dies würde weiterhin bedeuten, dass das striatale Signal ausschließlich auf unverstoffwechseltes 5-[¹⁸F]FMT zurückzuführen wäre. Wenn die AADC Aktivität als Anreicherungsmechanismus für 5-[¹⁸F]FMT jedoch wegfällt und 5-[¹⁸F]FMT nicht weiter zu 5-[¹⁸F]FPAC verstoffwechselt wird, stellt sich die Frage, wodurch die striatale Anreicherung und das Trapping angetrieben werden. Es wäre denkbar, dass 5-[¹⁸F]FMT bei AADC Inhibition durch Benserazid an eine andere Bindungsstelle des Enzyms bindet, jedoch keine Decarboxylierung erfolgt. Dies bleibt ohne genauere kinetische Analyse jedoch nur eine Vermutung.

Eine weitere Beobachtung, die für die Theorie der intrazerebralen Wirkung von Benserazid spricht, ist das ebenfalls konstant bleibende Niveau der Zeitaktivitätskurve von 6-[¹⁸F]FDOPA (vgl. Kapitel 5.2.1, Abbildung 51b). Aus der Literatur ist bekannt, dass 6-[¹⁸F]FDOPA (wie 5-[¹⁸F]FMT) eine geringere Affinität zu AADC aufweist als 6-[¹⁸F]FMT (DeJesus *et al.*, 1995; Gallagher *et al.*, 2011). Das würde auch den langsameren Abbau von 6-[¹⁸F]FDOPA gegenüber 6-[¹⁸F]FMT erklären. Die zentrale AADC Inhibition würde außerdem bedeuten, dass 6-[¹⁸F]FDOPA im Gehirn nicht zu 6-[¹⁸F]FDA verstoffwechselt wird, sondern ausschließlich über COMT zu 6-[¹⁸F]OMFD. Dies wäre eine Erklärung dafür, dass alle in dieser Arbeit durchgeführten 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans ein sehr geringes striatales Signal und eine schlechte Signal to Background Ratio zeigten, da sich 3-[¹⁸F]OMFD, wie in Kapitel 6.1 bereits diskutiert, diffus im Hirn verteilt und nur geringfügig im Striatum anreichert.

Dies soll im Rahmen von weiterführenden Studien ohne Benserazidinjektion überprüft werden. Sollte die Hypothese einer intrazerebralen AADC Inhibition durch Benserazid bestätigt werden, so würden die 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen ohne jegliche

enzymatische Inhibition vermutlich sogar eine bessere Signal to Background Ratio erreichen als bei alleiniger AADC Inhibition. Dadurch würde zwar weniger 6-[¹⁸F]FDOPA die Blut-Hirn-Schranke passieren, innerhalb des Gehirns würde jedoch zumindest ein geringer Teil des Tracers zu 6-[¹⁸F]FDA verstoffwechselt und im Striatum getrappt.

Ob und in welchem Maße AADC Inhibitoren wie Benserazid und Carbidopa die Blut-Hirn-Schranke passieren und somit zentral wirken können, wird in der Forschungsliteratur kontrovers diskutiert (Bartholini *et al.*, 1967; Prada *et al.*, 1987; Kent *et al.*, 1990; Durso *et al.*, 2000; Jonkers *et al.*, 2001). Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten deuten jedoch eindeutig auf die zentrale Wirkung von Benserazid hin. Da das Maß der zerebralen Inhibition vermutlich auch eine Frage der Dosierung ist und der Einfluss von Benserazid und Carbidopa auf die AADC Aktivität bisher vor allem nach oraler Verabreichung der Inhibitoren und im Rahmen von Humanstudien getestet wurde, sind des Weiteren Studien zur Ermittlung der optimalen Dosierung von intraperitoneal injiziertem Benserazid in Long Evans Ratten geplant.

Eine weitere Theorie, die zur Erklärung des konstanten 5-[¹⁸F]FMT Signals bei AADC Inhibition aufgestellt wurde, ist die eines Equilibriums zwischen Tracerabbau im Gehirn und Tracerübertritt aus der Peripherie. Die visuelle Begutachtung der gemittelten PET Bilder für die verschiedenen Zeitfenster (vgl. Kapitel 5.2.2, Abbildung 53a) ließ zunächst vermuten, dass das konstante 5-[¹⁸F]FMT Signal im Striatum mit einer Reduktion des peripheren Signals einherging.

Um zu überprüfen, ob das konstante 5-[¹⁸F]FMT Signal mit einem Equilibrium, oder durch den geringeren enzymatischen Abbau zu erklären ist, wurden zusätzliche Zeitaktivitätskurven für die Backgroundaktivität und das periphere Tracersignal von 5- und 6-[¹⁸F]FMT mit und ohne Benserazidbehandlung erstellt (vgl. Kapitel 5.2.2, Abbildung 53a und b). Diesen Zeitaktivitätskurven konnte entnommen werden, dass das konstante striatale Signal von 5-[¹⁸F]FMT mit Benserazidbehandlung von einem ähnlich konstant bleibenden Peripherie- und Backgroundsignal begleitet wurde. Dies widerlegte die Equilibrium Theorie.

Vergleicht man die Zeitaktivitätskurven des peripheren Signals mit und ohne Benserazidbehandlung, so erkennt man, dass sie ohne AADC Inhibition sowohl bei 5- als auch bei 6-[¹⁸F]FMT niedriger waren als bei AADC Inhibition. Dies ist vermutlich

dadurch zu erklären, dass die Tracer ohne AADC Aktivität auch peripher stärker abgebaut und daher schneller renal ausgeschieden wurden.

Vergleicht man nun die Zeitaktivitätskurven des striatalen Signals und des Backgroundsignals mit und ohne Benserazidbehandlung, so lässt sich erkennen, dass 5- und 6-[¹⁸F]FMT bei ausbleibender AADC Inhibition initial ein höheres striatales Signal und eine höhere Backgroundaktivität zeigten als bei vorhandener Inhibition. Da davon auszugehen ist, dass 5- und 6-[¹⁸F]FMT bei ausbleibender AADC Inhibition zu ihren zugehörigen Aminen 5- und 6-[¹⁸F]FMTA metabolisiert werden, spricht das initial höhere striatale Signal und Backgroundsignal dafür, dass 5- und 6-[¹⁸F]FMTA besser die Blut-Hirn-Schranke passieren können als das unverstoffwechselte 5- und 6-FMT. Dies würde darauf hindeuten, dass die Amine 5- und 6-[¹⁸F]FMTA eine höhere Affinität für LAT1 aufweisen als die Aminosäuren 5- und 6-[¹⁸F]FMT. Vor dem Hintergrund, dass zunächst angenommen wurde, dass sie analog zu 6-[¹⁸F]FDA als Amin nicht hirngängig und die AADC Inhibition daher unbedingt notwendig sei, ist dieses Ergebnis besonders überraschend.

Für die Bildgebung ist die AADC Inhibition dennoch von Vorteil, da die Amine, einmal im Gehirn angekommen, aufgrund der fehlenden AADC Inhibition offenbar auch schneller wieder abgebaut werden, was sich an der stärkeren und schnelleren Reduktion des striatalen Signals und des Backgroundsignals bei ausbleibender Benserazidbehandlung erkennen lässt.

Betrachtet man das Niveau des striatalen Signals über alle Messungen, so zeigt 5-[¹⁸F]FMT insgesamt einen geringeren und langsameren Abbau. Was vermutlich auf die zuvor bereits vermutete geringere Affinität zu AADC zurückzuführen ist. Dem gegenüber zeigt das striatale Signal von 6-[¹⁸F]FMT aufgrund der höheren AADC Affinität sowohl peripher als auch intrazerebral ein geringeres Niveau.

Neben dem generell geringen striatalen Signal zeigte 6-[¹⁸F]FMT noch eine weitere Auffälligkeit bei ausbleibender AADC Inhibition. In den Horizontalschnitten der für die Analyse der Biodistribution erstellten Zeitfenster (vgl. Kapitel 5.2.2, Abbildung 52a) ist nicht nur das paarige Uptake des rechten und linken Striatum zu erkennen, sondern noch ein weiteres paariges Signal, das auf Höhe des Hippocampus einsetzt und posterior im Cerebellum zusammenläuft. Dies wurde in Abbildung 54 noch einmal genauer dargestellt.

Diese auffällige Biodistribution von 6-[¹⁸F]FMT bei ausbleibender AADC Inhibition im Modellorganismus der Ratte wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Honer *et al.* berichten in ihrer Studie zur 6-[¹⁸F]FMT Biodistribution, dass sie neben dem striatalen Signal weitere Signale detektieren konnten, die sie mit dem Globus pallidus, der Substantia nigra und dem Thalamus in Verbindung brachten.

Betrachtet man das Tracersignal zur genaueren Lokalisation in den in Abbildung 54a dargestellten 12 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten (ausgehend vom Striatum bis hin zum Cerebellum), so erkennt man in den anterioren Transversalschnitten zunächst noch das schwächer werdende striatale Signal. Das zweite paarige Signal setzt weiter posterior, unterhalb des Hippocampus, im oberen Teil des Thalamus ein und erstreckt sich dann entlang der Ventrikel bis zum Colliculus superior, bis es schließlich im Cerebellum mündet. Dort reicht es bis in die Medulla. Dies stellt den wahrscheinlich größten Unterschied zu 5-[¹⁸F]FMT, 6-[¹⁸F]FDOPA, aber auch zu 6-[¹⁸F]FMT bei vorhandener AADC Inhibition dar, und scheint ein Alleinstellungsmerkmal zu sein.

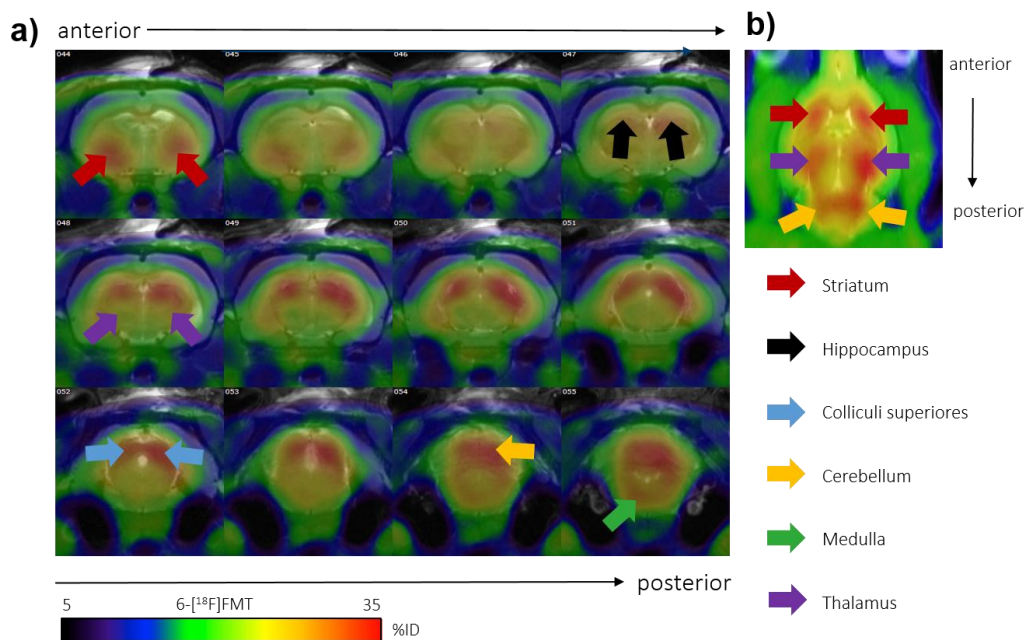


Abbildung 54: In vivo Biodistribution von 6-[¹⁸F]FMT in gesunden Ratten ohne AADC Inhibition (n=3).

(a) Dargestellt im Summenbild über zwei Stunden in 12 aufeinanderfolgenden Transversalschnitten mit hoher Transparenz des PET Bildes zur besseren Sichtbarkeit des MRTs. (b) Dargestellt im Horizontalschnitt des Summenbilds von 30-60 Minuten.

Im Gegensatz zu Honer *et al.* zeigt 6-[¹⁸F]FMT kein Signal in der Substantia nigra. Im Unterschied zu der vorliegenden Studie verwendeten Honer *et al.* Mäuse und verabreichten 25mg/kg (ip) Carbidopa zur (wie sie annahmen) peripheren AADC Inhibition, weshalb sich die Ergebnisse nur bedingt vergleichen lassen.

Worauf die auffällige Biodistribution von 6-[¹⁸F]FMT bei ausbleibender AADC Inhibition zurückzuführen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Eine hypothetische Erklärung könnte jedoch sein, dass 6-[¹⁸F]FMT aufgrund der ausbleibenden AADC Inhibition noch stärker von AADC verstoffwechselt wird und sich deshalb auch in Arealen mit geringerer AADC Aktivität anreichert, wie beispielsweise dem Cerebellum.

Da das Cerebellum eine nur geringe AADC Aktivität aufweist, ging man bislang davon aus, dass Tracer, die die AADC Aktivität visualisieren (wie [¹⁸F]FMT oder [¹⁸F]FDOPA), ein nur geringes Signal im Cerebellum zeigten (Walker *et al.*, 2013). Aus diesem Grund wird in den meisten Studien das Cerebellum zur Bestimmung der Backgroundaktivität verwendet (G Lloyd & Hornykiewicz, 1972; Carson *et al.*, 1998). Zur Intensitätsnormierung der 6-[¹⁸F]FMT Messungen ohne Benserazid wurde ebenfalls das Cerebellum genutzt. In Zukunft sollte jedoch ein anderes Referenzareal mit geringerem 6-[¹⁸F]FMT Signal wie beispielsweise der Cortex verwendet werden.

Eine andere Erklärung wäre, dass 6-[¹⁸F]FMT bereits peripher in einem derart hohen Maße decarboxyliert wird, dass es nahezu ausschließlich als Amin über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird. Da bekannt ist, dass 6-[¹⁸F]FMTA auch eine hohe Affinität zu MAO aufweist, könnte es sein, dass dann vor allem die MAO Aktivität und nicht länger die AADC Aktivität visualisiert wird. Jahng *et al.* konnten MAO mRNA in folgenden Hirnarealen nachweisen: Der Substantia nigra, der VTA, den C1/A1 Gebieten, dem Locus coeruleus und den Raphe nuclei, dem Cortex, dem Hippocampus, dem Thalamus und dem Hypothalamus (Jahng *et al.*, 1997). MAO B mRNA wurde in weitaus weniger Hirnarealen nachgewiesen, nämlich nur in der Area postrema, dem Organum subfornicale und der dorsalen Raphe (Jahng *et al.*, 1997). Einige der hier genannten Hirnareale könnten dem beobachteten 6-[¹⁸F]FMT Signal entsprechen, andere wiederum nicht.

Die im Hemiparkinsonmodell beobachtete höhere Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT bei Neuroinflammation, die im Verdacht steht, ebenfalls durch MAO Aktivität verursacht zu

werden, spricht ebenfalls für die höhere Affinität von 6-[¹⁸F]FMT zu MAO. Um diesbezüglich jedoch eine genauere Aussage treffen zu können, sind weitere Versuche mit MAO Inhibitoren notwendig. Diese werden in der Arbeitsgruppe aktuell bereits durchgeführt, die Auswertung steht jedoch noch aus.

6.3 Fazit Teilstudie II

Im Folgenden sollen die wichtigsten Ergebnisse der Tracerevaluation und die daraus gewonnenen Erkenntnisse bezüglich der Metabolisierung von 6-[¹⁸F]FDOPA, 5- und 6-[¹⁸F]FMT noch einmal zusammengefasst werden.

Im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA war es mit 6-[¹⁸F]FMT möglich, die Reduktion des striatalen Signals im Zuge der Läsionierung des MFB mit einer hohen Signal to Background Ratio zu visualisieren und zu quantifizieren. Die Ergebnisse bestätigen zum größten Teil die bereits aus der Literatur bekannten Vorteile und Eigenschaften von 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die erhebliche Limitierung der innerhalb dieser Arbeit durchgeführten 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans vermutlich auch auf die ausbleibende COMT Inhibition zurückzuführen ist.

Über die bereits bekannten Eigenschaften hinaus konnte eine signifikant höhere Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT in entzündeten Arealen nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund der in Teilstudie I aufgestellten Theorie, dass dies durch die erhöhte MAO Aktivität in immigrierten Astrozyten verursacht wird, ist diese Beobachtung schlüssig, da 6-[¹⁸F]FMT ebenfalls durch MAO abgebaut wird. Da 6-[¹⁸F]FMT im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA keiner Verstoffwechslung durch COMT unterliegt und eine höhere Affinität zu AADC aufweist, ist die Verfügbarkeit von 6-[¹⁸F]FMT für den Abbau von MAO vermutlich sogar höher und könnte somit die Ursache für die stärkere Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT in entzündeten Hirnarealen erklären. Auch die 6-[¹⁸F]FMT Messungen bei ausbleibender AADC Inhibition in gesunden Ratten deuten, wenn auch nur vage, auf eine höhere Affinität von 6-[¹⁸F]FMT zu MAO hin. 6-[¹⁸F]FMT weist somit ein vermeintlich besseres Potential auf, andere monoaminerge Hirnareale zu visualisieren.

Durch den Vergleich mit dem in dieser Arbeit erstmals evaluierten 5-[¹⁸F]FMT konnte gezeigt werden, dass die Radiofluorierungsposition offenbar einen großen Einfluss auf

die Metabolisierung von fluoriertem m-Tyrosin nimmt, da sich die Metabolisierung von 5- und 6-[¹⁸F]FMT stark unterschied. 5-[¹⁸F]FMT scheint verglichen mit 6-[¹⁸F]FMT ein deutlich schlechteres Substrat für AADC zu sein und unterliegt somit einer geringeren Decarboxylierung. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf eine intrazerebrale Wirkung von Benserazid hin, was den Abbau von 5-[¹⁸F]FMT offenbar vollkommen zum Erliegen brachte und die Visualisierung des Striatum über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden mit einer sehr guten Signal to Background Ratio ermöglichte.

Dies bietet sowohl für den präklinischen als auch für den potentiellen klinischen Einsatz den Vorteil eines sehr großen Messzeitfensters. Außerdem war mit 5-[¹⁸F]FMT die Visualisierung des Striatum sogar vollkommen ohne den Einsatz von zusätzlichen Inhibitoren möglich, was den Patienten die Einnahme oder die Injektion von Carbidopa oder Entacapone erspart.

Viele wissenschaftliche Studien, die die Funktion des dopaminergen Systems verschiedener Personengruppen, wie beispielsweise Rauchern, mithilfe von 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans untersuchen, führen eine Metabolitenkorrektur durch. Dies kann entweder durch die Ermittlung der arteriellen Inputfunktion anhand von entnommenen Blutproben oder mithilfe komplexer kinetischer Modellierung erfolgen (DeJesus *et al.*, 1997b; Salokangas *et al.*, 2000; Sossi *et al.*, 2003; Schain *et al.*, 2013; Bloomfield *et al.*, 2014). Die ausbleibende Metabolitenbildung von 5-[¹⁸F]FMT würde Metabolitenkorrekturen überflüssig machen. Dies würde zum einen den Leidensdruck der Studienteilnehmer verringern, da keine Blutproben mehr benötigt würden, zum anderen den Aufwand der durchführenden Ärzte und Wissenschaftler.

Da die Visualisierung des Striatum durch 5-[¹⁸F]FMT mit AADC Inhibition scheinbar vollkommen von der AADC Aktivität entkoppelt wird, müssen weiterführende Studien noch untersuchen, inwiefern die striatale Anreicherung von 5-[¹⁸F]FMT auch mit der dopaminergen Neurodegeneration und der Reduktion der Dopaminsynthese korreliert. Dies könnte beispielsweise durch weitere 5-[¹⁸F]FMT Messungen im Hemiparkinsonmodell erfolgen, bei denen das striatale Signal ins Verhältnis zum Zellsterben innerhalb der Substantia nigra gesetzt wird, das durch immunhistochemische Färbungen mit TH quantifiziert werden kann.

Da bisher angenommen wurde, dass die dopaminerge Integrität bei der PET vor allem durch die Visualisierung der AADC Aktivität und somit basierend auf der Affinität der

Tracer zu AADC erfolgt, stellt sich angesichts des deutlichen striatalen Signals bei AADC Inhibition allgemein die Frage, welcher Prozess bei der PET Bildgebung mithilfe von 5- und 6-[¹⁸F]FMT eigentlich detektiert wird, wenn nicht die AADC Aktivität. Dies ist auch für 6-[¹⁸F]DOPA bislang nur unzureichend erforscht. So weist die Substantia nigra nachweisbar sowohl AADC als auch MAO Aktivität auf (Jahng *et al.*, 1997), diese wurde jedoch von keinem der Tracer bei den PET Messungen innerhalb dieser Arbeit visualisiert. Im Cerebellum, das bekanntermaßen nur über eine geringe AADC Aktivität verfügt, wurde sehr wohl ein Signal detektiert. Dies ist äußerst widersprüchlich. Des Weiteren ist oft nicht klar, ob das Tracersignal auf der AADC Aktivität dopaminerger Neuronen oder aufgrund der Anreicherung innerhalb anderer monoaminerger Neuronen basiert, die ebenso AADC exprimieren.

Obwohl alle drei Tracer eine regionale Korrelation aufweisen (Li *et al.*, 2014), ist nach wie vor ungeklärt, inwieweit diese Korrelation auch auf den gleichen Anreicherungsmechanismen basiert und wie gut das Signal mit der dopaminergen Integrität bei Patienten mit Morbus Parkinson einhergeht. Somit hängt die Eignung der drei untersuchten Tracer für Studien, die das dopaminerge System mithilfe der PET untersuchen wollen, auch davon ab, welcher Mechanismus innerhalb des Dopaminmetabolismus visualisiert werden soll. Weil 6-[¹⁸F]FDOPA in den Dopaminmetabolismus eingeht, ist es vermutlich besser für die Visualisierung und Quantifizierung des effektiven Dopamin-Turnovers geeignet, da es neben der AADC Aktivität auch die vesikuläre Dopaminspeicherung, das Transmittersignal im synaptischen Spalt und die Wiederaufnahme in die Präsynapse visualisiert. Dieser Vorteil kann je nach Studienintention jedoch auch ein Nachteil sein, weil sich bei 6-[¹⁸F]FDOPA aufgrund seiner stärkeren Metabolitenbildung noch schlechter differenzieren lässt, welche Schnittstelle im Dopaminmetabolismus und welcher Metabolit detektiert wird.

Da 5- und 6-[¹⁸F]FMT eine höhere Affinität zu AADC aufweisen und nicht in den Dopaminmetabolismus eingehen, eignen sie sich vermutlich besser für die Visualisierung der AADC Aktivität als 6-[¹⁸F]FDOPA. Die Ergebnisse der 6-[¹⁸F]FMT Messung im Hemiparkinsonmodell sprechen außerdem dafür, dass die dopaminerge Neurodegeneration auch bei intrazerebraler AADC Inhibition durch radiofluorierte Tyrosinanaloga visualisiert werden kann. Die Tracerevaluation ergab somit unter den in

dieser Studie gewählten Bedingungen eine deutliche Überlegenheit von 5- und 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA bei der Bildgebung des dopaminergen Systems.

7 Ergebnisse Teilstudie III: Präklinische Evaluation von [¹⁸F]DAA1106

7.1 Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 im Apoplexiemodell

7.1.1 Biodistribution

In der dritten Teilstudie dieser Arbeit sollte die Eignung von [¹⁸F]DAA1106 als TSPO-Ligand zur Visualisierung von Neuroinflammation getestet werden. Hierzu wurde [¹⁸F]DAA1106 mit dem bereits etablierten Neuroinflammationstracer [¹⁸F]DPA714 in einem Apoplexiemodell der Ratte verglichen. Als Vergleichskriterien wurden die durchschnittliche Traceranreicherung innerhalb der Läsion, die durchschnittliche Backgroundaktivität, die Signal to Background Ratio, die periphere Traceranreicherung (gemessen anhand des durchschnittlichen Traceruptakes innerhalb der Nackenmuskulatur) und das Knochenuptake herangezogen. Insgesamt wurden drei Ratten eine Woche nach Induzierung der Apoplexie im PET gemessen.

Zunächst wurde die Tracerdistribution im Apoplexiemodell untersucht. Dies erfolgte per VOI-Analyse anhand der Summenbilder über zwei Stunden. Diese Summenbilder sind in Abbildung 55 dargestellt. Die Ergebnisse der Tracerevaluation per VOI-Analyse sind in Abbildung 56 dargestellt. Sie werden im Folgenden beschrieben.

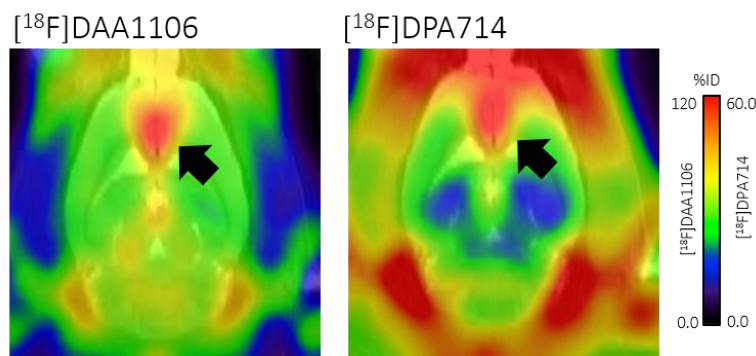


Abbildung 55: *In vivo* Biodistribution von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 im Apoplexiemodell der Ratte eine Woche post Op, dargestellt in einem Summenbild über zwei Stunden (Horizontalschnitt, n=3). Im Bereich der durch die ET-1 Injektion hervorgerufenen Läsion (schwarzer Pfeil) ist eine hohe Signalsintensität beider Tracer zu erkennen.

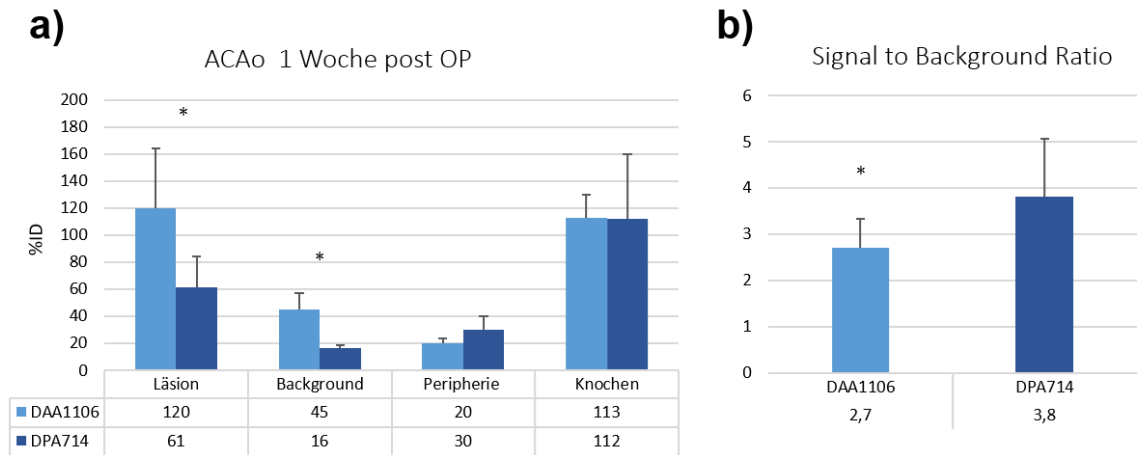


Abbildung 56: Grafische Darstellung der *in vivo* Biodistribution von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 im Apoplexiemodell der Ratte eine Woche post Op (n=3).

(a) Vergleich der Traceranreicherung innerhalb der Läsion, der Peripherie, des Knochens und der Backgroundaktivität. (b) Vergleich der Signal to Background Ratio.

Das durchschnittliche [¹⁸F]DAA1106 Signal im Bereich der Läsion lag bei 120 %ID und damit signifikant über dem von [¹⁸F]DPA714 mit 61 %ID (p=0,02). Da jedoch auch die Backgroundaktivität mit 45 %ID signifikant höher war als die von [¹⁸F]DPA714 (16 %ID, p=0,01), erreichte [¹⁸F]DAA1106 nur eine Signal to Background Ratio von 2,7, die signifikant niedriger war als die von [¹⁸F]DPA714 (3,8, p=0,02). Im Vergleich zu [¹⁸F]DAA1106 zeigte [¹⁸F]DPA714 zwar ein tendenziell höheres peripheres Uptake (30 %ID gegenüber 20 %ID), dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant (p=0,06). Des Weiteren reichert sich ähnlich viel Aktivität im Knochen an (113 %ID und 112 %ID). Im Verhältnis zur läsionalen Anreicherung war das Knochenuptake von [¹⁸F]DPA714 allerdings deutlich höher. Im Gegensatz zum [¹⁸F]DAA1106 Signal im Knochen, strahlte das Knochensignal von [¹⁸F]DPA714 sogar bis in die Randbereiche des Gehirns ein.

7.1.2 Zeitaktivitätskurven

Um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Traceraufnahme treffen zu können, wurde die zweistündige Messung zunächst in vier aufeinanderfolgende 30-minütige Zeitfenster aufgeteilt. Diese sind in 57a dargestellt.

Sowohl [¹⁸F]DAA1106 als auch [¹⁸F]DPA714 wiesen von 0 bis 30 Minuten die stärkste Traceranreicherung im Bereich der Läsion, aber auch die höchste Backgroundaktivität auf. Darüber hinaus ließ sich für [¹⁸F]DAA1106 im ersten Zeitfenster eine Anreicherung im Cerebellum feststellen. Beide Tracer zeigten außerdem einen über den gesamten Zeitverlauf anhaltende Anreicherung innerhalb des dritten Ventrikels. Ob es sich bei dem Signal im Bereich der lateralen Ventrikel um Einstrahlung aus der Läsion handelte oder um eine Anreicherung der Tracer lässt sich im Apoplexiemodell nicht differenzieren und wird später im gesunden Tier analysiert.

Während das Backgroundniveau von [¹⁸F]DPA714 bereits im zweiten Zeitfenster deutlich geringer war, wies [¹⁸F]DAA1106 erst im vierten Zeitfenster, also ab Minute 90 ein ähnlich niedriges Backgroundniveau auf. Da das Backgroundniveau maßgeblichen Einfluss auf die Eignung des Tracers zur Bildgebung der Neuroinflammation widerspiegelt, wurde die Signal to Background Ratio für das Messzeitfenster von 90 bis 120 Minuten erneut quantifiziert. Die VOI-Analyse ergab für [¹⁸F]DAA1106 im Summenbild von 90 bis 120 Minuten eine Signal to Background Ratio von 3,5, die deutlich über der von [¹⁸F]DPA714 liegt (2,6). Diese Reduktion des Backgroundniveaus ging offenbar mit einem stärkeren Signal in der Peripherie (26 %ID) und im Knochen (146 %ID) einher (vgl. Tabelle 1).

Tabelle 1: Ergebnisse der Tracerevaluation von 90 bis 120 Minuten.

	[¹⁸ F]DAA1106 (90-120 min)	[¹⁸ F]DPA714 (90-120 min)
Mittlere Signalstärke Läsion	110 %ID	56 %ID
Mittlere Signalstärke Background	31 %ID	21 %ID
Signal to Background Ratio	3,5	2,6
Signalstärke Peripherie (Nackenschulter)	26 %ID	26 %ID
Knochenuptake	146 %ID	120 %ID

Nach der räumlichen Lokalisation der Traceranreicherung anhand der PET Bilder wurden Zeitaktivitätskurven für die Traceranreicherung im Bereich der Läsion sowie für die Backgroundaktivität erstellt. Die Zeitaktivitätskurven sind in Abbildung 57b aufgeführt.

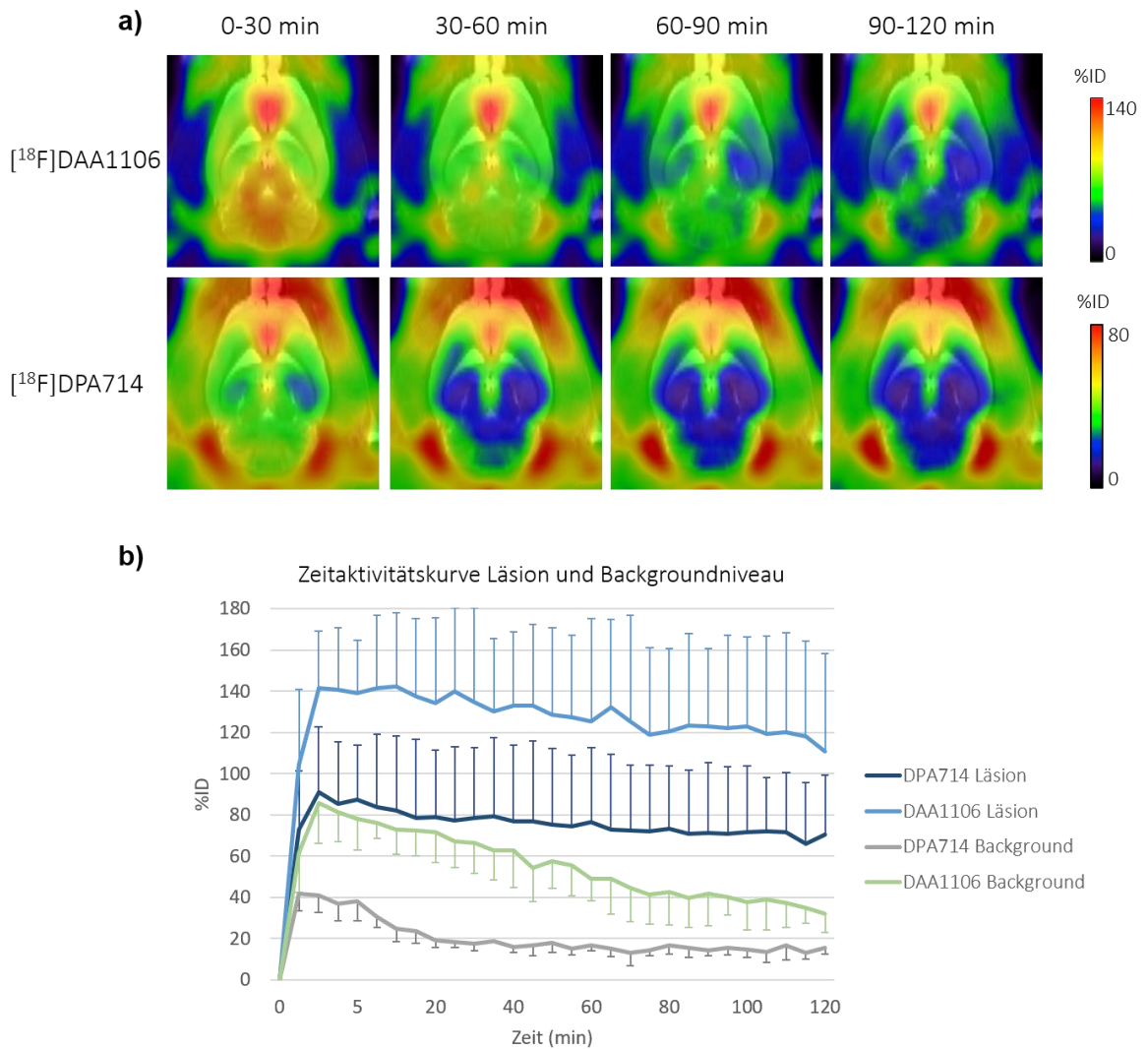


Abbildung 57: Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 im Apoplexiemodell der Ratte (n=3).

(a) *In vivo* Biodistribution in vier aufeinanderfolgenden Zeitfenstern à 30 min (Horizontalschnitt).

(b) Zeitaktivitätskurve der Traceranreicherung im Bereich der Läsion (Mittelwert in %ID) und der Backgroundaktivität (Mittelwert ± Standardabweichung in %ID) über zwei Stunden.

Vergleicht man die Zeitaktivitätskurven für das Traceruptake innerhalb der Läsion, so zeigte [¹⁸F]DAA1106 eine deutlich schnellere und stärkere Anreicherung als [¹⁸F]DPA714. Das [¹⁸F]DAA1106 Signal innerhalb der Läsion stieg in den ersten 2,5 Minuten auf ein Maximum von ca. 140 %ID an, blieb bis Minute 10 auf vergleichbarem Niveau und nahm bis zum Ende der Messung langsam ab, bis es am Ende der Messung nur noch bei 110 %ID lag. Die Steigung der [¹⁸F]DPA714 Kurve und die Anreicherung innerhalb der ersten Minuten war deutlich geringer, dennoch erreichte auch das [¹⁸F]DPA714 Signal sein Maximum von ca. 90 %ID bereits nach 2,5 Minuten und blieb daraufhin bis zum Ende der Messung relativ konstant. Die Backgroundaktivität von

[¹⁸F]DAA1106 stieg innerhalb der ersten Minuten auf ca. 90 %ID und damit deutlich über die Backgroundaktivität von 45 %ID. Während sich die Backgroundaktivität von [¹⁸F]DPA714 bis Minute 20 nach Injektion nur um 20 Prozentpunkte verringerte und daraufhin bis zum Messende bei 20 %ID stagnierte, zeigte [¹⁸F]DAA1106 eine stärkere Reduktion der Backgroundaktivität von 60 Prozentpunkten. Bei Messende erreichte [¹⁸F]DAA1106 mit ca. 30 %ID sogar ein ähnlich niedriges Backgroundniveau als [¹⁸F]DPA714.

Die Standardabweichungen waren sowohl für [¹⁸F]DAA1106 als auch für [¹⁸F]DPA714 sehr groß. Um eine mögliche Erklärung für die großen interindividuellen Unterschiede zu finden, wurden im Folgenden die Zeitaktivitätskurven für das Traceruptake im Bereich der Läsion für jedes Versuchstier gesondert berechnet (vgl. Abbildung 58a). Anhand dieser Daten lässt sich erkennen, dass das Uptakeniveau im Bereich der Läsion, nachdem es bereits kurz nach der Injektion sein Maximum erreichte, über den gesamten Messzeitraum nahezu konstant blieb und das bei jedem der drei Versuchstiere.

Eine Auffälligkeit war das unterschiedlich hohe Uptakeniveau der Versuchstiere. Bei Versuchstier 1 (vgl. Abbildung 58) lag das Uptakeniveau von [¹⁸F]DAA1106 bei 140 %ID und von [¹⁸F]DPA714 bei ca. 90 %ID. Bei Versuchstier 2 lag das Plateau von [¹⁸F]DAA1106 bei ca. 160 %ID und bei [¹⁸F]DPA714 bei ca. 110 %ID. Bei Versuchstier 3 lag es wesentlich tiefer, nämlich bei ca. 90 %ID bei [¹⁸F]DAA1106 und 40 %ID bei [¹⁸F]DPA714. Den Graphen ist ebenfalls zu entnehmen, dass sich das Signalniveau von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gleicher Weise zwischen den Versuchstieren unterscheidet und das [¹⁸F]DAA1106 Uptake bei allen drei Versuchstieren im Durchschnitt ca. 60 Prozentpunkte über dem Uptakeniveau von [¹⁸F]DPA714 lag. Da für den hier vorliegenden Tracervergleich vor allem das Verhältnis der Tracer zueinander von Relevanz ist, wurden die Daten zur abschließenden Darstellung auf das durchschnittliche Uptakeniveau von [¹⁸F]DPA714 (steady state [¹⁸F]DPA714) normiert. Hierzu wurden die drei letzten Messwerte des [¹⁸F]DPA714 Uptakes gemittelt, als 100 % und somit als Referenzwert festgelegt. Die Standardabweichungen sind folglich nicht länger das Maß für die Größe der interindividuellen Unterschiede, sondern für die Abweichung vom [¹⁸F]DPA714 steady-state Referenzwert. So ist Abbildung 58b zu entnehmen, dass das [¹⁸F]DPA714 Tracerniveau innerhalb der Läsion vor allem in der ersten Hälfte der Messung deutlich

vom [¹⁸F]DPA714 steady state abwich und sich diesem mit fortschreitender Messdauer annäherte. Die durchgehend geringen Standardabweichungen des Tracerniveaus von [¹⁸F]DPA714 zeigen, dass der steady state sehr schnell erreicht wurde und nur geringen Schwankungen unterlag.

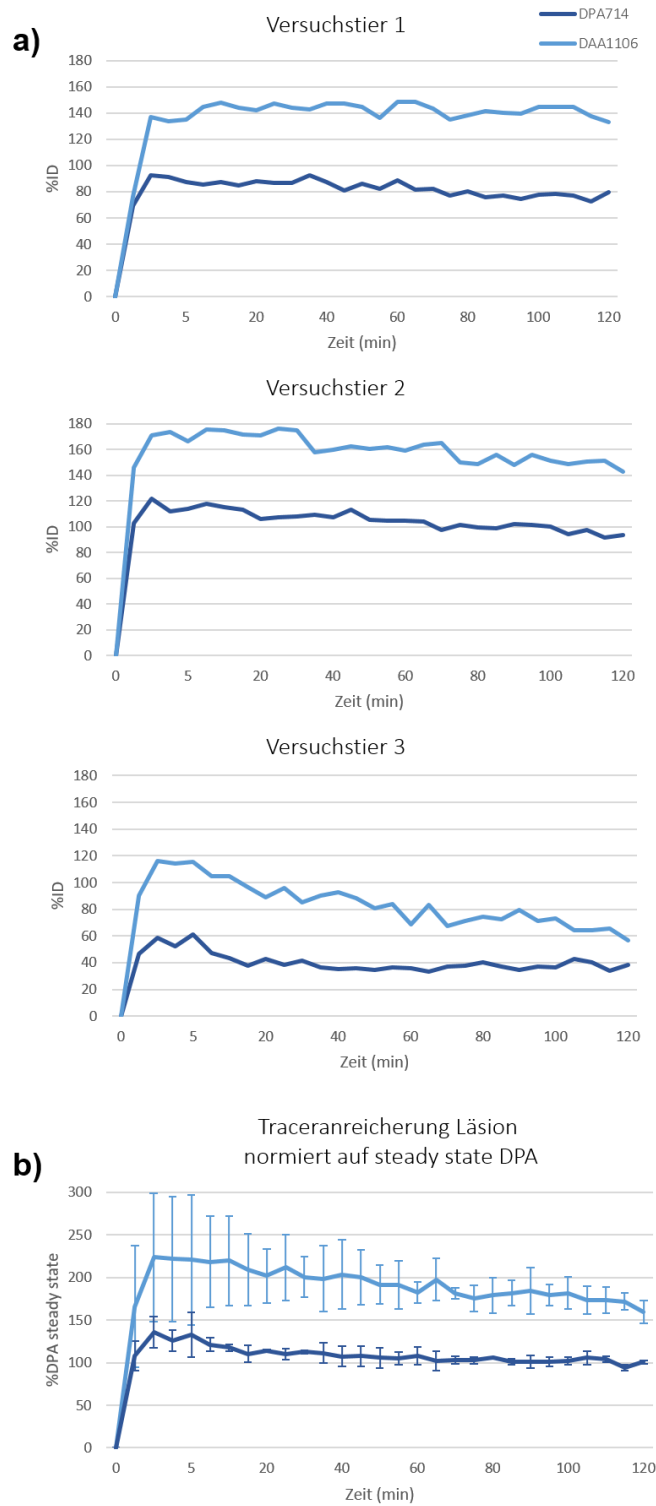


Abbildung 58: Darstellung des Traceruptakes von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 innerhalb der Läsion. (a) Individuelle Uptakekurven aller drei Versuchstiere für [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106. (b) Traceruptake von [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 normiert auf steady state [¹⁸F]DPA714 (n=3).

7.2 Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten

7.2.1 Biodistribution

Nach der Evaluation im Apoplexiemodell erfolgte die Evaluation in gesunden Ratten. Dieses Experiment diente als Kontrolle und sollte die Anreicherung der Tracer unter nicht pathologischen Bedingungen untersuchen. Hierzu wurde [¹⁸F]DAA1106 mit dem bereits etablierten Neuroinflammationstracer [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten (n=3) und über eine Messdauer von zwei Stunden verglichen. Da TSPO im gesunden Gehirn vor allem im Ventrikel epithel exprimiert wird, wurde als Vergleichskriterium die durchschnittliche Traceranreicherung im Bereich des dritten Ventrikels gewählt. Darüber hinaus wurde die Signal to Background Ratio, die periphere Traceranreicherung (Nackenkulatur) und das Knochenuptake eruiert. Der Tracervergleich wurde anhand der Summenbilder über zwei Stunden durchgeführt. Die Summenbilder sind in Abbildung 59 dargestellt. Abbildung 60 zeigt die Ergebnisse der Tracerevaluation.

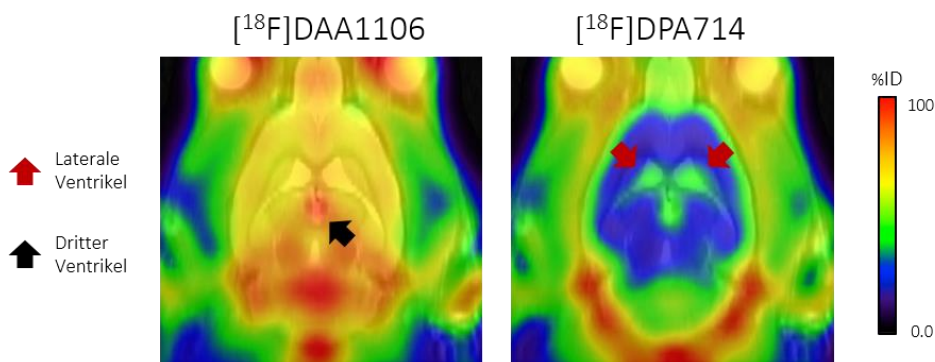


Abbildung 59: *In vivo* Biodistribution von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten dargestellt in einem Summenbild über zwei Stunden (Horizontalschnitt, n=3).

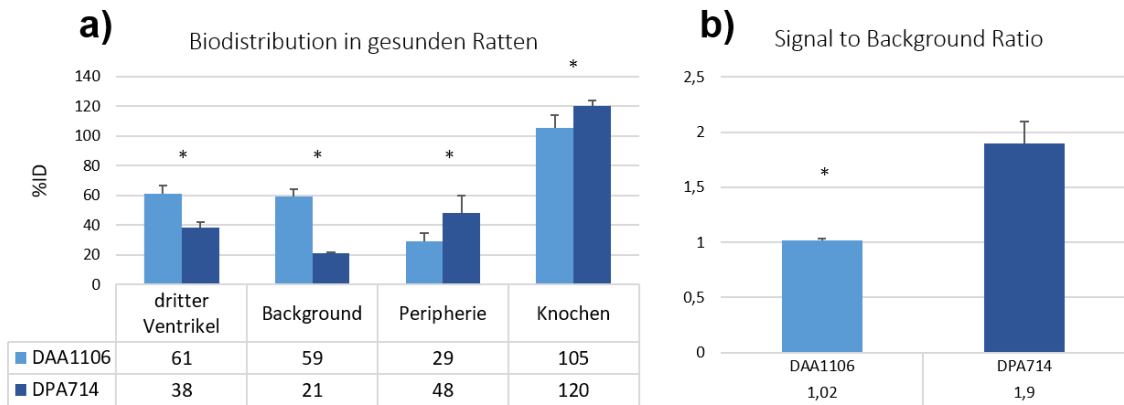


Abbildung 60: Grafische Darstellung der *in vivo* Biodistribution von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten (n=3).

(a) Vergleich der Traceranreicherung innerhalb des dritten Ventrikels, des Backgroundniveaus, innerhalb der Peripherie und des Knochenuptakes. (b) Vergleich der Signal to Background Ratio.

Die Tracerevaluation der beiden TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 ergab signifikante Unterschiede in allen untersuchten Parametern. [¹⁸F]DAA1106 wies eine signifikant höhere Anreicherung innerhalb des dritten Ventrikels (61 %ID gegenüber 38 %ID, p=0,01) und ein deutlich höheres Backgroundniveau auf (59 %ID gegenüber 21 %ID, p=0,002). [¹⁸F]DPA714 zeigte hingegen ein signifikant höheres peripheres Signal (48 %ID gegenüber 29 %ID, p=0,04) und ein höheres Knochenuptake (120 %ID gegenüber 105 %ID, p=0,04). Des Weiteren wies [¹⁸F]DPA714 mit 1,9 eine fast doppelt so hohe Signal to Background Ratio auf als [¹⁸F]DAA1106 (1,02, p=0,009).

Vergleicht man die über zwei Stunden gemittelten PET Bilder miteinander, so fällt auf, dass sich [¹⁸F]DPA714 im Unterschied zu [¹⁸F]DAA1106 sowohl im dritten Ventrikel als auch in den lateralen Ventrikeln anreicherte. [¹⁸F]DAA1106 wies hingegen kein Signal in den lateralen Ventrikeln auf. Dies ließ sich im Apoplexiemodell nicht differenzieren, da das Tracersignal im Bereich der Läsion bis in die Ventrikel einstrahlte. Des Weiteren zeigte [¹⁸F]DAA1106 eine stärkere Backgroundaktivität im Bereich des Cerebellums und der Augen.

Die Auswertung der 30-minütigen Zeitfenster und der Zeitaktivitätskurven zeigte (wie bereits im Apoplexiemodell) eine deutliche Reduktion des [¹⁸F]DAA1106 Backgrounds im Verlauf der zweistündigen Messung. Da bereits im Apoplexiemodell gezeigt werden konnte, dass die Anreicherung in den betrachteten Referenzarealen (mit Ausnahme der

Backgroundaktivität) nach Erreichen des Plateaus nahezu konstant blieb, ergab die Auswertung der 30-minütigen Zeitfenster und der Zeitaktivitätskurven in gesunden Ratten keine Mehrinformation. Die Auswertung des globalen Traceruptakes im gesamten Gehirn ergab mit 38 %ID für [¹⁸F]DPA714 und 105 %ID für [¹⁸F]DAA1106 jedoch eine wesentlich höhere Aufnahme des TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 (Daten nicht gezeigt).

8 Diskussion Teilstudie III: Präklinische Evaluation von [¹⁸F]DAA1106

8.1 Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 im Apoplexiemodell

Obwohl [¹⁸F]DPA714 im Summenbild über zwei Stunden eine signifikant höhere Signal to Background Ratio als [¹⁸F]DAA1106 aufwies (2,9 gegenüber 2), lässt sich die Neuroinflammation im Bereich der Läsion mit [¹⁸F]DAA1106 ebenso gut identifizieren wie mit [¹⁸F]DPA714. In beiden PET Bildern ist eine Traceranreicherung im Bereich der Läsion zu erkennen, die sich deutlich von der Backgroundaktivität abhebt. [¹⁸F]DAA1106 weist offenbar eine bessere Hirngängigkeit auf, da sowohl die Anreicherung im Bereich der Läsion (95 %ID gegenüber 55 %ID) als auch die Backgroundaktivität (48 %ID gegenüber 19 %ID) signifikant über der von [¹⁸F]DPA714 lagen. Die höhere Backgroundaktivität deutet jedoch gleichzeitig auf eine höhere unspezifische Bindung innerhalb des Gehirns hin. Darüber hinaus erklärt die bessere Hirngängigkeit von [¹⁸F]DAA1106 womöglich auch das geringere periphere Uptake innerhalb der Nackenmuskulatur (19,7 %ID gegenüber 24,3 %ID). [¹⁸F]DAA1106 passiert die Blut-Hirn-Schranke dabei offenbar nicht nur effektiver, sondern auch schneller, was der stärkeren Steigung und dem höheren Peak der [¹⁸F]DAA1106 Zeitaktivitätskurve im Bereich von 0 bis 5 Minuten zu entnehmen ist. Durch die schnellere und bessere Aufnahme von [¹⁸F]DAA1106 wird die Tracerverfügbarkeit in der Peripherie gegenüber der Tracerverfügbarkeit im Gehirn deutlich reduziert.

Des Weiteren kann den Daten entnommen werden, dass [¹⁸F]DPA714 einer stärkeren Defluorierung unterliegt als [¹⁸F]DAA1106, da das Knochenuptake mit 96 %ID im Verhältnis zur spezifischen TSPO-Bindung im Bereich der Läsion (55 %ID) wesentlich höher ist als bei [¹⁸F]DAA1106. Der daraus resultierende Nachteil einer stärkeren peripheren Einstrahlung vom Knochen in die Randbereiche des Gehirns zeigt sich besonders deutlich im Bereich des Bulbus olfactorius, wo das Uptake innerhalb des Schädelknochens bis in den Bereich der Läsion einstrahlt. Da bekannt ist, dass TSPO im gesunden Gehirn geringfügig auch im Bulbus olfactorius exprimiert wird (Anholt *et al.*, 1984), lässt sich die Einstrahlung des Knochens und das physiologische TSPO-Signal im [¹⁸F]DPA714 PET Scan des Apoplexiemodells nicht differenzieren. Die Messungen in gesunden Ratten, die die Visualisierung der physiologischen TSPO-Biodistribution durch

[¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 gegenüberstellen, deuten jedoch darauf hin, dass die physiologische Expression von TSPO im Bulbus olfactorius unter der Detektionsgrenze von [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 liegt und es sich bei dem Signal im Bulbus olfactorius im Apoplexiemodell offenbar ausschließlich um Einstrahlung aus dem Schädelknochen handelt und nicht um ein TSPO-Signal.

Eine weitere Auffälligkeit war das hohe unspezifische [¹⁸F]DAA1106 Signal im Cerebellum, welches bei [¹⁸F]DPA714 nur geringfügig bis gar nicht zu erkennen war. Auch andere Studien, bei denen [¹¹C]DAA1106 eingesetzt wurde, beschreiben neben einem hohen Uptake im Bulbus olfactorius und Plexus choroideus ein hohes Uptake im Cerebellum, geben jedoch keine mögliche Erklärung hierfür an (Zhang *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2004; Pulagam *et al.*, 2017).

Die Zeitaktivitätskurven des Traceruptakes innerhalb der Läsion wiesen vor Normierung der Daten auf das steady state Niveau von [¹⁸F]DPA714 (Daten nicht gezeigt) sehr hohe Standardabweichungen auf. Diese sind durch die großen interindividuellen Unterschiede im Uptakeniveau zu erklären, welche offenbar durch die unterschiedlichen Läsionsgrößen der Versuchstiere hervorgerufen wurden. Die intrazerebrale Injektion des Endothelins erfolgte zwar unter Verwendung eines Rattenatlas, dennoch weisen die Ratten häufig geringfügige interindividuelle Unterschiede in der Anatomie, wie z.B. unterschiedlich große Ventrikel auf. Des Weiteren erfolgte die Schädelbohrung und Injektion manuell, wodurch eine zusätzliche Varianz entstanden sein könnte.

Betrachtet man die 24 Stunden nach der Operation aufgenommenen MRT Bilder in Abbildung 61, so lässt sich ein Zusammenhang zwischen Läsionsgröße und Niveau des Traceruptakes erkennen.

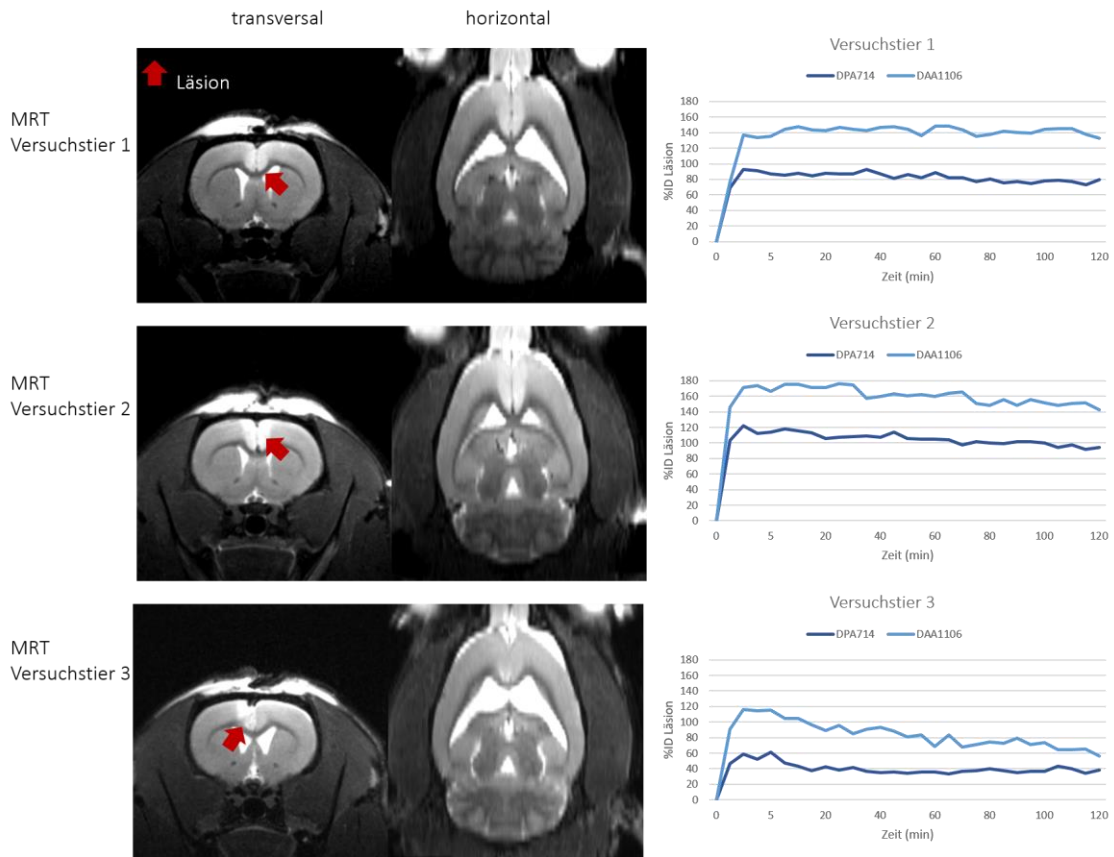


Abbildung 61: Gegenüberstellung der MRT Aufnahmen (links) und des Uptakeniveaus innerhalb der Läsion (rechts) 24 Stunden nach Induzierung der Apoplexie.

Versuchstier 2 zeigte für beide getesteten TSPO-Liganden das höchste Uptakeniveau innerhalb der Läsion und wies auf den MRT Aufnahmen die größte Läsion auf (vgl. Abbildung 61, Mitte). Eine etwas schwächere Läsion wies Versuchstier 1 auf (vgl. Abbildung 61, oben), dementsprechend zeigten sowohl [18F]DAA1106 als auch [18F]DPA714 eine geringere Anreicherung innerhalb der Läsion. Das MRT Bild von Versuchstier 3 (vgl. Abbildung 61, unten) zeigte die insgesamt kleinste Läsion und auch das insgesamt geringste Uptakeniveau. Die ausschließlich unilateral in der linken Hemisphäre lokalisierte Läsion lässt darauf schließen, dass die Injektion zu weit links erfolgte und somit vermutlich nur ein nach links ziehender Seitenast der ACA getroffen wurde.

Da bei einer kleineren Läsion auch eine geringfügigere Entzündung hervorgerufen wird, ist davon auszugehen, dass die TSPO-Expression ebenfalls geringer ist. Beide Tracer waren folglich in der Lage, diese unterschiedlich hohe TSPO-Expression zu detektieren und ermöglichten eine Quantifizierung.

Eine weitere Auffälligkeit ist die mit zunehmender Messdauer kleiner werdende Standardabweichung des auf den steady state von [^{18}F]DPA714 normierten [^{18}F]DAA1106 Signals im Bereich der Läsion. Jenes ist damit zu erklären, dass das [^{18}F]DAA1106 Uptakeniveau im Verlauf der Messung kleiner wird und sich somit dem Uptakeniveau von [^{18}F]DPA714 annähert. Da Letzteres als Referenz für die Intensitätsnormierung des Traceruptakes innerhalb der Läsion diente, wird mit sinkendem [^{18}F]DAA1106 Tracerniveau auch die Abweichung von diesem Referenzwert und folglich die Standardabweichung kleiner.

Nach Erreichen des steady states unterliegt das [^{18}F]DPA714 Uptake im Gegensatz zu [^{18}F]DAA1106 kaum noch Veränderungen. Während sich die [^{18}F]DPA714 PET Bilder der Zeitfenster 2 (30 bis 60 Minuten) und 3 (60 bis 90 Minuten) kaum unterscheiden, sind bei [^{18}F]DAA1106 noch starke Veränderungen bezüglich der Backgroundaktivität und der Anreicherung innerhalb des Cerebellums zu erkennen. Auch die Zeitaktivitätskurven der Backgroundaktivität und des Uptakes innerhalb der Läsion bleiben bei [^{18}F]DPA714 ab Minute 30 nahezu konstant. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Transport- und Anreicherungsprozesse bei [^{18}F]DPA714 schneller abgeschlossen sind als bei [^{18}F]DAA1106, dessen Backgroundaktivität und Uptake innerhalb der Läsion nach Erreichen des maximalen Uptakeniveaus langsam absinkt und nicht so konstant bleibt wie das von [^{18}F]DPA714. Das schwächer werdende [^{18}F]DAA1106 Signal geht jedoch mit einer noch stärkeren und schnelleren Reduktion der Backgroundaktivität einher, was dazu führt, dass [^{18}F]DAA1106 im letzten Messzeitfenster von 90 bis 120 Minuten mit 3,5 sogar eine deutlich bessere Signal to Background Ratio aufwies als [^{18}F]DPA714 mit nur noch 2,6.

Betrachtet man die Biodistribution beider Tracer über die Zeit (vgl. Abbildung 57a) so lässt sich erkennen, dass die Reduktion des [^{18}F]DAA1106 Backgroundsignals mit keinem höheren peripheren Signal einhergeht. Dies spricht dafür, dass das unspezifisch im gesamten Gehirn verteilte [^{18}F]DAA1106, welches das Backgroundsignal verursacht, abgebaut wird und schnell den Blutpool verlässt. Andernfalls wäre ein stärkeres peripheres Signal zu erwarten.

Da ^{18}F eine hohe Affinität zu Calcium aufweist, manifestiert sich die Defluorierung eines Tracers in einem starken Signal im Knochen (Cheng *et al.*, 2013; McCready *et al.*, 2013; Hawkins *et al.*, 2017). Somit kann das Knochenuptake als Maß für die Defluorierung

eines Tracers genutzt werden. Im Unterschied zu der nur geringen Defluorierung von [¹⁸F]DAA1106 zeigte [¹⁸F]DPA714 über die gesamte Messzeit ein deutlich höheres peripheres Signal und Knochenuptake, das über die Zeit sogar noch zunahm. Der Tracer scheint folglich instabiler zu sein.

Auch wenn [¹⁸F]DPA714 offenbar in geringeren Mengen die Blut-Hirn-Schranke passiert, da dessen Uptakeniveau insgesamt geringer ist, so spricht das konstant bleibende Plateau auf Maximalniveau dafür, dass [¹⁸F]DPA714 im Vergleich zu [¹⁸F]DAA1106 offenbar länger an TSPO bindet oder zumindest länger im Bereich der Läsion verweilt, da hier mit fortschreitender Messung keine Reduktion des Uptakes innerhalb der Läsion vorliegt und auch die Backgroundkurve nahezu konstant bleibt. Das insgesamt höhere Uptakeniveau von [¹⁸F]DAA1106 könnte hingegen dafür sprechen, dass [¹⁸F]DAA1106 mit einer höheren Bindungsaffinität an TSPO bindet, sich dann jedoch schneller wieder löst. Folglich würden sich die Tracer hinsichtlich ihrer im Zusammenhang mit TSPO viel diskutierten „residence time“ und somit in ihrem pharmakologischen Potential unterscheiden. Dies soll im Folgenden genauer erläutert werden.

Da TSPO auch für den Transport von Cholesterol in Mitochondrien verantwortlich ist, ist es nicht nur in neuroinflammatorischen Prozessen involviert, sondern beeinflusst auch die Biosynthese von Steroiden (Rupprecht *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wurde in der Vergangenheit das pharmakologische Potential von TSPO-Liganden durch ihren Einfluss auf die Steroidsynthese untersucht (Romeo *et al.*, 1993; Serra *et al.*, 1999). Dabei zeigten Studien, dass die Bindungsaffinität (K_i) von TSPO-Liganden nur geringfügig mit der effektiven *in vitro* Steroidsynthese korreliert. Die Steroidsynthese wird jedoch unter anderem über die Bindung von TSPO-Liganden reguliert, daher sollte die Bindungsaffinität mit einer stärkeren oder schwächeren Steroidsynthese korrelieren, je nach dem, ob es sich bei dem Liganden um einen TSPO Agonisten oder Antagonisten handelt. Deshalb wurde zunächst die Eignung der bekannten TSPO-Liganden für die TSPO-Bildgebung hinterfragt und man ging dazu über, die Eignung der TSPO-Tracer nicht nur anhand ihrer Bindungsaffinität zu messen, sondern an ihrer residence time. Die residence time wird anhand der effektiven Verweilzeit des Tracers an seinem Target (K_{on}) bestimmt. Sie ist also ein Maß dafür, wie lange der TSPO-Ligand wirklich mit dem TSPO-Protein interagiert und eine Wirkung erzielt. TSPO-Liganden der zweiten Generation weisen zwar bekanntlich eine höhere Bindungsaffinität und eine höhere

Signal to Background Ratio als beispielsweise [¹¹C]PK11195 auf (Doorduyn *et al.*, 2009; Rojas *et al.*, 2018), die Korrelation ihrer Bindungsaffinität und ihre residence time mit der Steroidsynthese sind bislang jedoch weitgehend unbekannt (Costa *et al.*, 2016). Costa *et al.* konnten für den TSPO-Liganden [¹¹C]PK11195 eine positive Korrelation zwischen residence time und *in vitro* Steroidsynthese nachweisen, was beweist, dass die residence time als Parameter zur Beschreibung der Bindungseigenschaften von TSPO-Liganden deutlich besser geeignet ist (Costa *et al.*, 2016). Diese Untersuchungen sollten zukünftig auch für [¹⁸F]DPA714 und [¹⁸F]DAA1106 durchgeführt werden, um eine genaue Aussage bezüglich ihrer Eignung für pharmakologische Interventionen und für die Bildgebung von Neuroinflammation machen zu können.

8.2 Vergleich von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten

Der Vergleich der Tracer [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten konnte die bereits im Apoplexiemodell beobachteten Bildgebungseigenschaften größtenteils bestätigen. Wie zuvor im Apoplexiemodell zeigte [¹⁸F]DPA714 ein signifikant höheres Signal im Knochen und ein signifikant höheres peripheres Signal (vgl. 7.2.1, Abbildung 59). Das spezifische Tracersignal im TSPO exprimierenden Ventrikel epithel war (zumindest im betrachteten dorsalen dritten Ventrikel) deutlich geringer, allerdings zeigte [¹⁸F]DPA714 auch eine signifikant geringere Backgroundaktivität und eine geringere globale Traceranreicherung im Gesamthirn, was darauf hindeutet, dass sich [¹⁸F]DPA714 geringfügiger unspezifisch im Gehirn verteilt. Somit war auch die Signal to Background Ratio von [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten signifikant höher als die von [¹⁸F]DAA1106.

Wie schon im Apoplexiemodell weisen das höhere spezifische [¹⁸F]DAA1106 Signal im Ventrikel epithel und die höhere Backgroundaktivität auf eine bessere Hirngängigkeit von [¹⁸F]DAA1106 hin, die jedoch auch in einer höheren unspezifischen Bindung resultieren, da die globale Traceraufnahme im Gesamthirn deutlich über der von [¹⁸F]DPA714 lag.

Im Gegensatz zu [¹⁸F]DPA714 zeigte [¹⁸F]DAA1106 im Horizontalschnitt einige Gemeinsamkeiten aber auch charakteristische Unterschiede in ihrer Biodistribution (vgl. Abbildung 58). Im Apoplexiemodell wiesen beide Tracer eine hohe Anreicherung im Cerebellum auf. Auch andere Studien beobachteten beim Einsatz von TSPO-Liganden zur Visualisierung von Neuroinflammation ein Signal im Cerebellum, geben hierfür

jedoch keine Erklärung an (Zhang *et al.*, 2003; Maeda *et al.*, 2004; Pulagam *et al.*, 2017). Die Lokalisation und die Intensität des Signals im Cerebellum in der vorliegenden Studie lässt vermuten, dass es sich um Einstrahlungen aus dem vierten Ventrikel handeln könnte.

Der deutlichste Unterschied innerhalb der Biodistribution von [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 in gesunden Ratten lag darin, dass sich [¹⁸F]DAA1106 ausschließlich im Bereich des dritten Ventrikels und nicht in den lateralen Ventrikeln anreicherte. [¹⁸F]DPA714 zeigte hingegen eine gleichmäßige Bindung sowohl in den lateralen als auch im dritten Ventrikel. Da bisher noch kein TSPO-Polymorphismus bei Ratten beobachtet wurde und es sich bei dem in den Ventrikelepithelien exprimierten TSPO eigentlich um ein und dasselbe Protein handeln müsste, ist diese Beobachtung äußerst interessant. Sie wirft die Frage auf, worauf die unterschiedliche Bindungsaffinität der Tracer für die verschiedenen Ventrikel beruht. Papadopoulos *et al.* konnten nachweisen, dass eine TSPO-Mutation innerhalb des Genoms von Mäusen die Steroidsynthese beeinflusste, was für die Möglichkeit einer veränderten Cholesterol Bindungsdomäne des TSPO-Proteins sprach (Papadopoulos *et al.*, 2006b). Dies deutet darauf hin, dass Mutationen auch die Bindungsdomäne für TSPO-Liganden bei Ratten verändern könnten, woraus sich dann eine unterschiedliche Affinität der Liganden zu den verschiedenen TSPO-Morphismen ergibt. Die Möglichkeit einer veränderten TSPO-Struktur durch Mutationen erklärt aber nicht die unterschiedliche Affinität von TSPO-Liganden für TSPO im gleichen Tier, sondern nur in verschiedenen Hirnarealen.

8.3 Fazit Teilstudie III

Die Tracerevaluation von [¹⁸F]DAA1106 und der Vergleich mit dem bereits in der klinischen Routine etablierten Referenztracer [¹⁸F]DPA714 bestätigte die Eignung von [¹⁸F]DAA1106 für den Nachweis von TSPO und für die Detektion von Neuroinflammation.

[¹⁸F]DAA1106 wies dennoch einige Nachteile gegenüber [¹⁸F]DPA714 auf. So zeigte [¹⁸F]DAA1106 zwar eine höhere Hirngängigkeit, was sich auch in einem höheren TSPO-Signal im Bereich der Läsion widerspiegelte, jedoch ging hiermit eine höhere Backgroundaktivität einher. Aufgrund der schnell abnehmenden Backgroundaktivität relativierte sich dieser Nachteil im Apoplexiemodell jedoch mit zunehmender Messdauer,

sodass [¹⁸F]DAA1106 nach ungefähr 1,5 Stunden sogar eine bessere Signal to Background Ratio erreichte als [¹⁸F]DPA714.

Es stellte sich allerdings die Frage, wie mit der fortlaufenden Reduktion des [¹⁸F]DAA1106 Uptakeniveaus bei der Quantifizierung umgegangen und welches Messzeitfenster für die Quantifizierung verwendet werden sollte. Es wurde sich zunächst für die Quantifizierung anhand des über zwei Stunden gemittelten PET Bildes (vgl. Abbildung 55) und für eine weitere Unterteilung dieses PET Bildes in 30-minütige Zeitfenster (vgl. Abbildung 57) entschieden. In der klinischen Routine ist dieses Vorgehen allerdings wenig praktikabel, da aufgrund des fortschreitenden radioaktiven Zerfalls möglichst viele Probanden in kurzer Zeit gemessen werden sollen und die Zeit für eine zweistündige Messung fehlt. Die Wahl des Messzeitfensters für Messungen mit [¹⁸F]DAA1106 hängt dabei auch von dem im Fokus stehenden Hirnareal und der Fragestellung der Studie ab. Ist die Studie auf ein niedriges Backgroundniveau angewiesen oder ist beispielsweise das Cerebellum von besonderem Interesse, empfiehlt sich die Einlagerung des Tracers für mindestens 30 Minuten, da dann das Backgroundniveau bereits gesunken und die Einstrahlung aus dem vierten Ventrikel in das Cerebellum deutlich geringer ist. Zielt die Studie auf die reine Detektion der Neuroinflammation ab, so eignen sich prinzipiell alle vier Zeitfenster, da sich die Läsion deutlich vom Backgroundniveau abhebt und [¹⁸F]DAA1106 somit über den gesamten Messzeitraum eine für die Detektion von Neuroinflammation ausreichend große Signal to Background Ratio aufweist.

Um abschließend beurteilen zu können, welcher der beiden TSPO-Tracer und welches Messzeitfenster für die Quantifizierung der TSPO-Expression am besten geeignet ist und somit das tatsächliche Niveau der TSPO-Expression am genauesten abbildet, sind weitere immunhistochemischen Färbungen und der Vergleich der dort detektierten TSPO-Expression mit der in den einzelnen Zeitfenstern gemessenen Traceranreicherungen notwendig. Um das pharmakologische Potential der beiden TSPO-Liganden zu bewerten, müssen außerdem kinetische Analysen zur Bestimmung ihrer residence time durchgeführt werden. Auf diese Weise lässt sich auch einschätzen, ob das hohe [¹⁸F]DAA1106 Signal im Bereich der Läsion auch tatsächlich mit einer starken, dauerhaften Bindung an das TSPO-Protein zu erklären ist.

Da die Biodistribution in gesunden Ratten große Unterschiede bezüglich der Anreicherung innerhalb der Ventrikel zeigte, muss zukünftig auch untersucht werden, ob in einem Tier verschiedene Varianten des TSPO-Proteins nachweisbar sind.

9 Zusammenfassende Diskussion

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die Anreicherung des Dopamintracers 6-[¹⁸F]FDOPA in entzündeten Hirnarealen untersucht werden. Dieser Zusammenhang ist klinisch von hoher Relevanz, da 6-[¹⁸F]FDOPA zum Monitoring der dopaminergen Degeneration von Parkinson-Patienten genutzt wird. Während die Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA im Striatum auf ein intaktes dopaminerges System hindeutet, bedeutet die ausbleibende Anreicherung, dass die dopaminergen Terminalien des Striatum bereits zerstört und die Parkinsonsche Erkrankung fortgeschritten ist. Mit der dopaminergen Degeneration gehen jedoch auch Entzündungsprozesse einher. Dadurch besteht die Gefahr, dass die Dopaminverarmung durch eine erhöhte Aufnahme von 6-[¹⁸F]FDOPA maskiert wird, wenn Neuroinflammation in Hirnarealen auftritt, in denen man bei fortgeschrittener Parkinsonscher Erkrankung eigentlich eine Reduktion der 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung erwarten würde. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Vergleichsmessungen mit 6-[¹⁸F]FDOPA und dem Inflammationsmarker [¹⁸F]DAA1106 im Hemiparkinsonmodell der Ratte durchgeführt. Durch die Injektion wird eine Läsion im nigrostriatalen Signalweg induziert, die einerseits die charakteristische Dopaminverarmung, andererseits eine Neuroinflammation im Bereich der Läsion verursacht. Die PET Messungen eine Woche nach der Operation zeigten ein unspezifisches 6-[¹⁸F]FDOPA Signal im Bereich der Läsion und eine deutliche Colokalisation mit der [¹⁸F]DAA1106 Anreicherung. Die statistische Analyse ergab eine hoch signifikante Korrelation zwischen erhöhter [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Aufnahme.

Korrespondierende immunhistochemische Färbungen konnten die Aktivierung der Mikrogliazellen im Bereich der Läsion auch auf zellulärer Ebene bestätigen. Dies führte zunächst zu der Vermutung, dass die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung im Zusammenhang mit aktivierten Mikrogliazellen stehen könnte. Jedoch zeigte die Messung vier Wochen nach der Operation keine Korrelation zwischen der [¹⁸F]DAA1106 und 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung. Während die immunhistochemischen Färbungen auch nach vier Wochen eine Aktivierung von Mikrogliazellen anzeigten, konnte in den entsprechenden PET Bildern keine Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA im Bereich der Mikrogliaaktivierung beobachtet werden. Ein Zusammenhang zwischen aktivierter Mikroglia und erhöhter 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung konnte folglich ausgeschlossen werden.

Da sich die signifikante Korrelation eine Woche nach der Operation vor allem im direkten Umfeld der Läsion befand und es bekannt ist, dass aktivierte Astrozyten eine Glianarbe um die Läsion ausbilden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhte 6-[¹⁸F]FDOPA Anreicherung auf die erhöhte Monoaminoxidase (MAO) Aktivität der bei Neuroinflammation immigrierenden Astrozyten und dem damit einhergehenden stärkeren Abbau von Aminosäuren zurückzuführen ist. MAO ist nicht nur am Abbau von Aminosäuren beteiligt, sondern nimmt auch Einfluss auf die neuroinflammatorische Immunantwort. Da eine erhöhte MAO Aktivität durch die beim Aminosäureabbau frei werdenden reaktiven Sauerstoffspezies neurotoxisch wirkt, sind Neuroinflammation und Aminosäureabbau in Astrozyten offenbar mechanistisch über MAO miteinander verbunden.

Um die Hypothese des Zusammenhangs zwischen aktivierten Astrozyten und erhöhter Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA zu überprüfen, erfolgte eine genauere Untersuchung der zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen. Dabei wurde eruiert, ob es sich bei der Anreicherung in entzündeten Hirnarealen um ein 6-[¹⁸F]FDOPA spezifisches Phänomen handelt oder ob es auch weitere Aminosäuren betrifft. Zu diesem Zweck wurden Messungen mit den Radioamino säuren [¹⁸F]FET und 6-[¹⁸F]FMT durchgeführt. [¹⁸F]FET wird im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT über den L-Aminosäure-Transporter 1 (LAT1) aufgenommen, aber nicht weiter metabolisiert. Auf diese Weise ermöglicht [¹⁸F]FET die Visualisierung der LAT1-Expression. Die Vergleichsmessungen mit [¹⁸F]FET ergaben jedoch kein eindeutiges Ergebnis. Hier bestand das Problem in einer hohen Backgroundaktivität von 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]FET. So konnte zwar visuell ein erhöhtes Signal aller Tracer im Bereich des medialen Vorderhirnbündels (MFB) detektiert werden, allerdings lag nur das [¹⁸F]DAA1106 Signal nominal über dem Backgroundniveau. [¹⁸F]FET wies im gesamten Gehirn ein sehr diffuses Signal auf. Die schlechte Signal to Background Ratio lässt eine Einschätzung bezüglich der Spezifität des [¹⁸F]FET Signals innerhalb der Läsion nicht zu. Somit konnte auch nicht geklärt werden, ob die erhöhte Anreicherung der Aminosäure-Tracer auf eine Erhöhung der LAT1 Expression zurückzuführen ist.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass Astrozyten ebenfalls LAT1 exprimieren und das erhöhte [¹⁸F]FET Signal somit nicht ausschließlich auf eine erhöhte LAT1 Aktivität

in der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist, sondern auch durch eine erhöhte Astrozytendichte im Bereich der Läsion verursacht worden sein könnte.

Die Beobachtung, dass sich 6-[¹⁸F]FMT sogar noch stärker in entzündeten Arealen anreicherte als 6-[¹⁸F]FDOPA, macht es wahrscheinlich, dass es sich bei der Anreicherung in entzündeten Arealen offenbar um keinen 6-[¹⁸F]FDOPA spezifischen Effekt handelte, sondern dass die Anreicherung auf den Abbau von Aminosäuren zurückzuführen ist. Eine mögliche Erklärung für die stärkere Anreicherung von 6-[¹⁸F]FMT im Bereich der Läsion könnte die höhere Affinität zu MAO sein. Diese Erklärung würde auch dafür sprechen, dass die erhöhte Anreicherung von 6-[¹⁸F]FDOPA bei Neuroinflammation durch den erhöhten Abbau von Aminosäuren im Allgemeinen bedingt und kein 6-[¹⁸F]FDOPA spezifischer Effekt ist.

Auch wenn die zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen der Aminosäure-Tracer in entzündeten Arealen nicht aufgeklärt wurden, so konnten die Ergebnisse der ersten Teilstudie dennoch nachweisen, dass ein genereller Zusammenhang von Neuroinflammation und der Anreicherung von Aminosäure-Tracern besteht. Des Weiteren kam es bei den 6-[¹⁸F]FDOPA PET Messungen zu Beginn dieser Arbeit immer wieder zu einer starken Beeinträchtigung der Bildqualität durch die starke periphere Verstoffwechslung des Tracers und einer damit einhergehenden hohen Backgroundaktivität durch radioaktive Metaboliten. Die zuvor genannten Beobachtungen deuten darauf hin, dass 6-[¹⁸F]FDOPA für die neuronale Bildgebung des Dopaminmetabolismus in der Präklinik nur bedingt geeignet ist.

Aus diesem Grund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit nach einem alternativen Tracer mit besseren Bildgebungseigenschaften zur Testung der dopaminergen Integrität und zur Visualisierung des Dopaminmetabolismus gesucht. In diesem Rahmen wurden die bereits bekannten Aminosäure-Tracer 6-[¹⁸F]FDOPA und 6-[¹⁸F]FMT mit dem neuen Tracer 5-[¹⁸F]FMT in Bezug auf ihre Bildgebungseigenschaften und bezüglich des Einflusses des Aromatischen-L-Aminosäuredecarboxylase (AADC) Inhibitors Benserazid verglichen.

Das primäre Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die Visualisierung und Quantifizierung der Biodistribution sowie die Evaluation des zeitlichen Verlaufs der Traceraufnahme. Dies sollte es ermöglichen, Rückschlüsse auf die nach wie vor nicht

vollständig aufgeklärte Metabolisierung und auf die Anreicherungsmechanismen der untersuchten Tracer zu ziehen.

Im Gegensatz zu 6-[¹⁸F]FDOPA war es mit 6-[¹⁸F]FMT möglich, die Reduktion des striatalen Signals im Zuge der Läsionierung des MFB gut zu detektieren und zu quantifizieren, da eine hohe Signal to Background Ratio vorlag. Die Ergebnisse bestätigen zum größten Teil die bereits aus der Literatur bekannten Vorteile und Eigenschaften von 6-[¹⁸F]FMT gegenüber 6-[¹⁸F]FDOPA, da die hohe Signal to Background Ratio von 6-[¹⁸F]FMT ebenfalls auf eine geringere Metabolisierung hinweist. Um dies jedoch zweifelsfrei bestätigen zu können, sind Metabolitenanalysen und die Quantifizierung der am PET Signal beteiligten Metaboliten notwendig.

Des Weiteren muss auf die Möglichkeit hingewiesen werden, dass die Limitierung der in dieser Arbeit durchgeführten 6-[¹⁸F]FDOPA PET Scans auch damit zusammenhängen könnte, dass kein COMT Inhibitor eingesetzt wurde und das 6-[¹⁸F]FDOPA Signal somit im stärkeren Maße von Metaboliten gestört wurde.

Darüber hinaus zeigte die Evaluation von 6-[¹⁸F]FMT in gesunden Ratten eine vermehrte Anreicherung des Tracers in monoaminergen Hirnarealen, die nur bei ausbleibender AADC Inhibition auftrat. Dies könnte darauf hindeuten, dass 6-[¹⁸F]FMT ohne AADC Inhibition verstärkt zu 6-[¹⁸F]FMTA decarboxyliert wird, das sich dann, aufgrund seiner hohen Affinität zu MAO, auch in anderen monoaminergen Arealen anreichert. 6-[¹⁸F]FMT könnte folglich das Potential aufweisen, bei ausbleibender AADC Inhibition die MAO Aktivität innerhalb des Gehirns zu visualisieren. Zur Unterstützung dieser Hypothese sind jedoch weitere Untersuchungen mit MAO Inhibitoren erforderlich.

Durch den Vergleich von 6-[¹⁸F]FMT mit dem in dieser Arbeit erstmals präklinisch eingesetzten 5-[¹⁸F]FMT konnte nachgewiesen werden, dass die Metabolisierung in hohem Maße von der Fluorierungsposition abhängig ist. Zum einen wies das striatale Signal von 5-[¹⁸F]FMT ein höheres Niveau auf als das von 6-[¹⁸F]FMT, zum anderen wurde 5-[¹⁸F]FMT langsamer abgebaut. Bei vorangegangener AADC Inhibition zeigte 5-[¹⁸F]FMT ein konstant hohes striatales Signal über den gesamten Messzeitraum von zwei Stunden auf. Im Gegensatz dazu war das 6-[¹⁸F]FMT Signal trotz AADC Inhibition bereits nach 20 Minuten stark reduziert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass 5-[¹⁸F]FMT aufgrund seiner Fluorierung in 5-Position ein schlechteres Substrat für AADC darstellt, sodass der ohnehin langsame enzymatische Abbau nach zusätzlicher

AADC Inhibition vollständig zum Erliegen kam. Darüber hinaus führte die AADC Inhibition vermutlich dazu, dass keine Metaboliten gebildet wurden, was die hohe Retention des Tracers im Striatum erklären würde.

Da man bisher davon ausging, dass der zugrundeliegende Anreicherungsmechanismus für Aminosäure-Tracer vor allem der AADC Aktivität zuzuschreiben ist, muss geklärt werden, warum nach AADC-Blockade dennoch ein konstantes 5-[¹⁸F]FMT Signal zu sehen war. Des Weiteren muss untersucht werden, in welchem Maße das 5-[¹⁸F]FMT Signal bei AADC Inhibition noch mit der effektiven Dopaminsynthese korreliert. Diese Korrelation ist für die neurologische Bildgebung entscheidend, da der Tracer sonst nicht in der Lage ist, die dopaminerge Integrität zu evaluieren und somit keine Aussage über die Krankheitsprogression von Parkinson-Patienten zulässt. Die zukünftige Untersuchung der Korrelation zwischen striatalem 5-[¹⁸F]FMT Signal und dopaminerger Integrität ist daher von hoher Relevanz.

Der dritte Teil dieser Arbeit umfasste die präklinische Evaluation der Bildgebungseigenschaften von [¹⁸F]DAA1106 und den Vergleich mit dem bereits etablierten Neuroinflammationstracer [¹⁸F]DPA714. Dabei sollte verglichen werden, ob [¹⁸F]DAA1106 wie der bereits etablierte Inflammationstracer [¹⁸F]DPA714 zuverlässig in der Lage ist, Neuroinflammation zu visualisieren. Hierzu wurde ein gut etabliertes Apoplexiemodell verwendet.

Die Ergebnisse der präklinischen Evaluation bestätigten die Eignung von [¹⁸F]DAA1106 für die Detektion von neuroinflammatorischen Prozessen. So zeigte [¹⁸F]DAA1106 eine im Vergleich zu [¹⁸F]DPA714 höhere Aufnahme und somit eine größere Tracerverfügbarkeit im Gehirn. Dies spiegelte sich auch in einem höheren [¹⁸F]DAA1106 Signal im Bereich der Läsion wider. Die höhere Anreicherung im Bereich der Neuroinflammation deutete zunächst auf eine höhere TSPO-Affinität hin. Sie ging allerdings auch mit einer höheren Backgroundaktivität einher, was zu einer schlechteren Signal to Background Ratio führte. Mit fortlaufender Messzeit nahm die Backgroundaktivität von [¹⁸F]DAA1106 jedoch wieder ab, was schließlich sogar in einer höheren Signal to Background Ratio als die von [¹⁸F]DPA714 resultierte.

Des Weiteren zeigten [¹⁸F]DAA1106 und [¹⁸F]DPA714 eine unterschiedliche Biodistribution in gesunden Ratten. Während sich [¹⁸F]DPA714 im TSPO exprimierenden Ventrikelepithel der Ventrikel 1-3 anreicherte, konnte bei [¹⁸F]DAA1106

nur ein Signal im dritten Ventrikel detektiert werden. Da bei Ratten bisher kein TSPO-Polymorphismus beobachtet wurde, gibt es bislang keine Erklärung für die höhere Affinität von [¹⁸F]DAA1106 für das im dritten Ventrikel exprimierte TSPO. Weiterführende Studien sollten daher überprüfen, ob im Rattenorganismus verschiedene Varianten des TSPO-Proteins exprimiert werden.

Insgesamt zeigte die präklinische Evaluation der Aminosäure-Tracer 5- und 6-[¹⁸F]FMT im Hemiparkinson- und des TSPO-Liganden [¹⁸F]DAA1106 im Apoplexiemodell der Ratte die verbesserten Bildgebungseigenschaften dieser neuen Tracer gegenüber den bereits klinisch etablierten Tracern 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DPA714 in nahezu allen untersuchten Parametern. Darüber hinaus veranschaulichten die vergleichenden Studien mit 6-[¹⁸F]FDOPA und [¹⁸F]DAA106, wie wichtig eine kritische Revalidierung von etablierten Tracern ist. Dies zeigt auch den weiter bestehenden Bedarf an neuen selektiven Liganden zur Visualisierung des dopaminergen Systems, deren Anreicherung nicht durch neuroinflammatorische Prozesse beeinflusst wird. Für die Entwicklung solcher Liganden sind jedoch weitere Untersuchungen der zugrundeliegenden Anreicherungsmechanismen notwendig.

10 Literaturverzeichnis

- Abadier, M. & Lyck, R., 2017. Pathways Across the Blood-Brain Barrier In: R. Lyck & G. Enzmann (eds). *The Blood Brain Barrier and Inflammation. (Progress in Inflammation Research)*. Springer International Publishing, Cham 187–211.
- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., et al., 2006. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier *Nature Reviews Neuroscience* 7, 1, 41–53.
- Anderson, M.A., Ao, Y., et al., 2014. Heterogeneity of reactive astrocytes *Neurosci Lett* 0, 23–29.
- Anholt, R.R., Pedersen, P.L., et al., 1986. The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane *J. Biol. Chem.* 261, 2, 576–583.
- Arndt, S., Cizadlo, T., et al., 1996. Normalizing counts and cerebral blood flow intensity in functional imaging studies of the human brain *Neuroimage* 3, 3 Pt 1, 175–184.
- Asanuma, M., Miyazaki, I., et al., 2014. Striatal Astrocytes Act as a Reservoir for L-DOPA *PLoS One* 9, 9.
- Bai, C., Meng, H., et al., 2005. Molecular cloning and characterization of monoamine oxidase A and B genes in pig DNA *Sequence* 16, 3, 161–165.
- Banati, R.B., Middleton, R.J., et al., 2014. Positron emission tomography and functional characterization of a complete PBR/TSP0 knockout *Nature Communications* 5, 5452.
- Barrio, J.R., Huang, S.-C., et al., 1996. Radiofluorinated L-m-Tyrosines: New In-Vivo Probes for Central Dopamine Biochemistry *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 4, 667–678.
- Barron, A.M., Ji, B., et al., 2018. Steroidogenic abnormalities in translocator protein knockout mice and significance in the aging male *Biochem. J.* 475, 1, 75–85.
- Bar-Shalom, R., Valdivia, A.Y., et al., 2000. PET imaging in oncology *Semin Nucl Med* 30, 3, 150–185.
- Bartholini, G., Burkard, W.P., et al., 1967. Increase of Cerebral Catecholamines caused by 3,4-Dihydroxyphenylalanine after Inhibition of Peripheral Decarboxylase *Nature* 215, 5103, 852–853.
- Batarseh, A. & Papadopoulos, V., 2010. Regulation of Translocator Protein 18 kDa (TSP0) Expression in Health and Disease States *Mol Cell Endocrinol* 327, 1–2, 1–12.
- Beaulieu, J.-M., Espinoza, S., et al., 2015. Dopamine receptors - IUPHAR Review 13 Br. *J. Pharmacol.* 172, 1, 1–23.

- Bechmann, I., Galea, I., et al., 2007. What is the blood–brain barrier (not)? *Trends in Immunology* 28, 1, 5–11.
- Becker, G., Bahri, M.A., et al., 2017. Comparative assessment of 6-[18F]fluoro-L-tyrosine and 6-[18F]fluoro-L-dopa to evaluate dopaminergic presynaptic integrity in a Parkinson's disease rat model *Journal of Neurochemistry* 141, 4, 626–635.
- Bélanger, M. & Magistretti, P.J., 2009. The role of astroglia in neuroprotection *Dialogues Clin Neurosci* 11, 3, 281–295.
- Bennett, M.L., Bennett, F.C., et al., 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113, 12, E1738–E1746.
- Berger, A., 2003. Positron emission tomography *BMJ* 326, 7404, 1449.
- Berlit, P., 2006. *Therapielexikon Neurologie*. Springer-Verlag.
- Beuthien-Baumann, B., Bredow, J., et al., 2003. 3-O-methyl-6-[18F]fluoro-L-DOPA and its evaluation in brain tumour imaging *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30, 7, 1004–1008.
- Blandini, F., Armentero, M.-T., et al., 2008. The 6-hydroxydopamine model: news from the past *Parkinsonism Relat. Disord.* 14 Suppl 2, S124–129.
- Bloomfield, M.A., Pepper, F., et al., 2014. Dopamine Function in Cigarette Smokers: An [18F]-DOPA PET Study *Neuropsychopharmacology* 39, 10, 2397–2404.
- BOLAM, J.P., HANLEY, J.J., et al., 2000. Synaptic organisation of the basal ganglia *J Anat* 196, Pt 4, 527–542.
- Bonifácio, M.J., Palma, P.N., et al., 2007. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease *CNS Drug Rev* 13, 3, 352–379.
- Bonsack, F., Alleyne, C.H., et al., 2016. Augmented expression of TSPO after intracerebral hemorrhage: a role in inflammation? *Journal of Neuroinflammation* 13, 1, 151.
- Bortolato, M. & Shih, J.C., 2011. BEHAVIORAL OUTCOMES OF MONOAMINE OXIDASE DEFICIENCY: PRECLINICAL AND CLINICAL EVIDENCE *Int Rev Neurobiol* 100, 13–42.
- Braestrup, C., Albrechtsen, R., et al., 1977. High densities of benzodiazepine receptors in human cortical areas *Nature* 269, 5630, 702–704.
- Bröer, S. & Brookes, N., 2001. Transfer of glutamine between astrocytes and neurons: Glutamine transfer between astrocytes and neurons *Journal of Neurochemistry* 77, 3, 705–719.
- Brown, P. & Gerfen, C.R., 2006. Plasticity within striatal direct pathway neurons following neonatal dopamine depletion is mediated through a novel functional

- coupling of serotonin 5-HT₂ receptors to the ERK 1/2 Map Kinase pathway *J Comp Neurol* 498, 3, 415–430.
- Brown, W.D., Taylor, M.D., et al., 1999. FluoroDOPA PET shows the nondopaminergic as well as dopaminergic destinations of levodopa *Neurology* 53, 1212–1212.
- Cabezas, R., Ávila, M., et al., 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease *Front Cell Neurosci* 8.
- Cahoy, J.D., Emery, B., et al., 2008. A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function *J. Neurosci.* 28, 1, 264–278.
- Carson, R.E., Herscovitch, P., et al., 1998. Quantitative Functional Brain Imaging with Positron Emission Tomography. Elsevier.
- Carter, S.F., Schöll, M., et al., 2012. Evidence for Astrocytosis in Prodromal Alzheimer Disease Provided by 11C-Deuterium-L-Deprenyl: A Multitracer PET Paradigm Combining 11C-Pittsburgh Compound B and 18F-FDG *J Nucl Med* 53, 1, 37–46.
- Cebrián, C., Loike, J.D., et al., 2015. Neuroinflammation in Parkinson's Disease Animal Models: A Cell Stress Response or a Step in Neurodegeneration? In: H.H.P. Nguyen & M.A. Cenci (eds). *Behavioral Neurobiology of Huntington's Disease and Parkinson's Disease. (Current Topics in Behavioral Neurosciences)*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 237–270.
- Cenci, M.A., Jörntell, H., et al., 2018. On the neuronal circuitry mediating l-DOPA-induced dyskinesia *J Neural Transm (Vienna)* 125, 8, 1157–1169.
- Chamoli, M., Chinta, S.J., et al., 2018. An inducible MAO-B mouse model of Parkinson's disease: a tool towards better understanding basic disease mechanisms and developing novel therapeutics *J Neural Transm (Vienna)* (April, 30).
- Chen, W.-W., ZHANG, X., et al., 2016. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review) *Mol Med Rep* 13, 4, 3391–3396.
- Cheng, C., Heiss, C., et al., 2013. Evaluation of bone remodeling with 18F-fluoride and correlation with the glucose metabolism measured by 18F-FDG in lumbar spine with time in an experimental nude rat model with osteoporosis using dynamic PET-CT *Am J Nucl Med Mol Imaging* 3, 2, 118–128.
- Cheng, H.-C., Ulane, C.M., et al., 2010. Clinical progression in Parkinson disease and the neurobiology of axons *Ann. Neurol.* 67, 6, 715–725.
- Cherry, J.D., Olschowka, J.A., et al., 2014. Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed *J Neuroinflammation* 11, 98.
- Chevalme, Y.-M., Montravers, F., et al., 2007. FDOPA-(18F): a PET radiopharmaceutical recently registered for diagnostic use in countries of the European Union *Brazilian Archives of Biology and Technology* 50, SPE, 77–90.

- Corsi, L. & Baraldi, E.G. and M., 2007. Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) New Insight in Cell Proliferation and Cell Differentiation Review Available at <http://www.eurekaselect.com/66142/article>.
- Costa, B., Da Pozzo, E., et al., 2016. TSPO ligand residence time: a new parameter to predict compound neurosteroidogenic efficacy *Sci Rep* 6.
- Crews, F.T. & Vetreno, R.P., 2016. Mechanisms of neuroimmune gene induction in alcoholism *Psychopharmacology* 233, 9, 1543–1557.
- Criswell, S.R., Nielsen, S.S., et al., 2018. [18F]FDOPA positron emission tomography in manganese-exposed workers *Neurotoxicology* 64, 43–49.
- Crumrine, R.C., Marder, V.J., et al., 2011. Intra-arterial administration of recombinant tissue-type plasminogen activator (rt-PA) causes more intracranial bleeding than does intravenous rt-PA in a transient rat middle cerebral artery occlusion model *Experimental & Translational Stroke Medicine* 3, 1, 10.
- Cumming, P., 2009. Imaging Dopamine by Paul Cumming Available at </core/books/imaging-dopamine/0546166A88F4262563C43E7BF0EC584E>.
- Daneman, R. & Prat, A., 2015. The Blood–Brain Barrier *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, 1.
- De Jesús-Cortés, H., Miller, A.D., et al., 2015. Protective efficacy of P7C3-S243 in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson’s disease *NPJ Parkinsons Dis* 1.
- DeJesus, O.T., Sunderland, J.J., et al., 1990. Synthesis of radiofluorinated analogs of m-tyrosine as potential L-dopa tracers via direct reaction with acetylhypofluorite *Int J Rad Appl Instrum A* 41, 5, 433–437.
- DeJesus, O.T., Murali, D., et al., 1995. Synthesis of brominated and fluorinated ortho-tyrosine analogs as potential DOPA decarboxylase tracers *J Label Comp Radiopharm*.
- DeJesus, O.T., Endres, C.J., et al., 1997a. Evaluation of fluorinated m-tyrosine analogs as PET imaging agents of dopamine nerve terminals: comparison with 6-fluoroDOPA *J. Nucl. Med.* 38, 4, 630–636.
- DeJesus, O.T., Endres, C.J., et al., 1997b. Evaluation of Fluorinated m-Tyrosine Analogs as PET Imaging Agents of Dopamine Nerve Terminals: Comparison with 6-Fluorodopa *J Nucl Med* 38, 4, 630–636.
- DeJesus, O.T., Haaparanta, M., et al., 2000. 6-fluoroDOPA metabolism in rat striatum: time course of extracellular metabolites *Brain Res.* 877, 1, 31–36.
- Dey, A., Allen, J., et al., 2015. Ontogeny and Polarization of Macrophages in Inflammation: Blood Monocytes Versus Tissue Macrophages *Front Immunol* 5.
- Dias, V., Junn, E., et al., 2013. The Role of Oxidative Stress in Parkinson’s Disease *J Parkinsons Dis* 3, 4, 461–491.

- Dickens, D., Chiduzza, G.N., et al., 2017. Modulation of LAT1 (SLC7A5) transporter activity and stability by membrane cholesterol *Sci Rep* 7.
- DiSabato, D., Quan, N., et al., 2016. Neuroinflammation: The Devil is in the Details *Journal of neurochemistry* 139, Suppl 2, 136.
- Doorduyn, J., Klein, H.C., et al., 2009. [11C]-DPA-713 and [18F]-DPA-714 as New PET Tracers for TSPO: A Comparison with [11C]-(R)-PK11195 in a Rat Model of Herpes Encephalitis *Mol Imaging Biol* 11, 6, 386–398.
- Doudet, D.J., Chan, G.L., et al., 1999. Evaluation of dopaminergic presynaptic integrity: 6-[18F]fluoro-L-dopa versus 6-[18F]fluoro-L-m-tyrosine *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19, 3, 278–287.
- Duelli, R., Enerson, B.E., et al., 2000. Expression of Large Amino Acid Transporter LAT1 in Rat Brain Endothelium *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 11, 1557–1562.
- Dunet, V., Rossier, C., et al., 2012. Performance of 18F-Fluoro-Ethyl-Tyrosine (18F-FET) PET for the Differential Diagnosis of Primary Brain Tumor: A Systematic Review and Metaanalysis *J Nucl Med* 53, 2, 207–214.
- Dupont, A.-C., Largeau, B., et al., 2018. The Place of PET to Assess New Therapeutic Effectiveness in Neurodegenerative Diseases *Contrast Media Mol Imaging* 2018, 7043578.
- Durso, R., Evans, J.E., et al., 2000. Variable Absorption of Carbidopa Affects Both Peripheral and Central Levodopa Metabolism *The Journal of Clinical Pharmacology* 40, 8, 854–860.
- Duty, S. & Jenner, P., 2011. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease *Br J Pharmacol* 164, 4, 1357–1391.
- Elsinga, P.H., Hatano, K., et al., 2006. PET tracers for imaging of the dopaminergic system *Curr. Med. Chem.* 13, 18, 2139–2153.
- Endepols, H., Mertgens, H., et al., 2015. Longitudinal assessment of infarct progression, brain metabolism and behavior following anterior cerebral artery occlusion in rats *Journal of Neuroscience Methods* 253, 279–291.
- Endres, C.J., Swaminathan, S., et al., 1997. Affinities of dopamine analogs for monoamine granular and plasma membrane transporters: implications for PET dopamine studies *Life Sci.* 60, 26, 2399–2406.
- Engelender, S. & Isacson, O., 2017. The Threshold Theory for Parkinson's Disease *Trends in Neurosciences* 40, 1, 4–14.
- Fearnley, J.M. & Lees, A.J., 1991. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity *Brain* 114 (Pt 5), 2283–2301.
- Fellin, T. & Carmignoto, G., 2004. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit *J Physiol* 559, Pt 1, 3–15.

- Finberg, J.P.M. & Rabey, J.M., 2016. Inhibitors of MAO-A and MAO-B in Psychiatry and Neurology *Front Pharmacol* 7.
- Firnau, G., Nahmias, C., et al., 1973. The preparation of (¹⁸ F)5-fluoro-DOPA with reactor-produced fluorine-18 *Int J Appl Radiat Isot* 24, 3, 182–184.
- Forny-Germano, L., Silva, N.M.L. e, et al., 2014. Alzheimer's Disease-Like Pathology Induced by Amyloid- β Oligomers in Nonhuman Primates *J. Neurosci.* 34, 41, 13629–13643.
- Fu, R., Shen, Q., et al., 2014. Phagocytosis of Microglia in the Central Nervous System Diseases *Mol Neurobiol* 49, 3, 1422–1434.
- Fueger, B.J., Czernin, J., et al., 2010. Correlation of 6-¹⁸F-Fluoro-l-Dopa PET Uptake with Proliferation and Tumor Grade in Newly Diagnosed and Recurrent Gliomas *J Nucl Med* 51, 10, 1532–1538.
- van Furth, R. & Cohn, Z.A., 1968. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes *J. Exp. Med.* 128, 3, 415–435.
- G Lloyd, K. & Hornykiewicz, O., 1972. Occurrence and distribution of aromatic L-amino acid (L-DOPA) decarboxylase in the human brain *Journal of neurochemistry* 19, 1549–59.
- Gallagher, C.L., Christian, B.T., et al., 2011. A Within-Subject Comparison of 6-[¹⁸F]Fluoro-m-tyrosine and 6-[¹⁸F]Fluoro-l-dopa in Parkinson's Disease *Mov Disord* 26, 11, 2032–2038.
- Garnett, E.S., Firnau, G., et al., 1983a. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man *Nature* 305, 5930, 137–138.
- Garnett, E.S., Firnau, G., et al., 1983b. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man *Nature* 305, 5930, 137–138.
- Geier, E.G., Schlessinger, A., et al., 2013. Structure-based ligand discovery for the Large-neutral Amino Acid Transporter 1, LAT-1 *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 14, 5480–5485.
- Geloso, M.C., Corvino, V., et al., 2017. The Dual Role of Microglia in ALS: Mechanisms and Therapeutic Approaches *Front Aging Neurosci* 9, 242.
- Giaume, C., Koulakoff, A., et al., 2010. Astroglial networks: a step further in neuroglial and gliovascular interactions *Nature Reviews Neuroscience* 11, 2, 87–99.
- Gilbert, J.A., Bates, L.A., et al., 1995. Elevated aromatic-L-amino acid decarboxylase in human carcinoid tumors *Biochem. Pharmacol.* 50, 6, 845–850.
- Ginhoux, F., Lim, S., et al., 2013. Origin and differentiation of microglia *Front Cell Neurosci* 7.
- Grimsby, J., Chen, K., et al., 1991. Human monoamine oxidase A and B genes exhibit identical exon-intron organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9, 3637–3641.

- Habermeier, A., Graf, J., et al., 2015. System I amino acid transporter LAT1 accumulates O-(2-fluoroethyl)-l-tyrosine (FET) *Amino Acids* 47, 2, 335–344.
- Hälbig, T.D. & Koller, W.C., 2007. Levodopa In: W.C. Koller & E. Melamed (eds). *Handbook of Clinical Neurology*. Vol. 84. (Parkinson's Disease and Related Disorders, Part II). Elsevier 31–72.
- Hald & Lotharius, 2005. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology* 193, 2, 279–290.
- Hawkins, K.E., DeMars, K.M., et al., 2017. Targeting resolution of neuroinflammation after ischemic stroke with a lipoxin A4 analog: Protective mechanisms and long-term effects on neurological recovery *Brain Behav* 7, 5.
- Heikkila, R.E., Manzino, L., et al., 1984. Protection against the dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine by monoamine oxidase inhibitors *Nature* 311, 5985, 467–469.
- Herrero, M.-T., Estrada, C., et al., 2015. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids *Front. Neuroanat.* 9.
- Honer, M., Hengerer, B., et al., 2006. Comparison of [18F]FDOPA, [18F]FMT and [18F]FECNT for imaging dopaminergic neurotransmission in mice *Nuclear Medicine and Biology* 33, 5, 607–614.
- Hossain, M.M., Weig, B., et al., 2018. The anti-parkinsonian drug zonisamide reduces neuroinflammation: Role of microglial Nav 1.6 *Exp. Neurol.* 308, 111–119.
- Hume, D.A., 2006. The mononuclear phagocyte system *Curr. Opin. Immunol.* 18, 1, 49–53.
- Iadecola, C. & Anrather, J., 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation *Nat Med* 17, 7, 796–808.
- Ito, D., Tanaka, K., et al., 2001. Enhanced expression of Iba1, ionized calcium-binding adapter molecule 1, after transient focal cerebral ischemia in rat brain *Stroke* 32, 5, 1208–1215.
- Jabs, R., Kirchhoff, F., et al., 1994. Kainate activates Ca(2+)-permeable glutamate receptors and blocks voltage-gated K⁺ currents in glial cells of mouse hippocampal slices *Pflugers Arch.* 426, 3–4, 310–319.
- Jackson, D.M. & Westlind-Danielsson, A., 1994. Dopamine receptors: Molecular biology, biochemistry and behavioural aspects *Pharmacology & Therapeutics* 64, 2, 291–370.
- Jackson-Lewis, V., Jakowec, M., et al., 1995. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine *Neurodegeneration* 4, 3, 257–269.
- Jacobs, A.H., Li, H., et al., 2003. PET-based molecular imaging in neuroscience *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 30, 7, 1051–1065.

- Jadvar, H. & Colletti, P.M., 2014. Competitive Advantage of PET/MRI Eur J Radiol 83, 1, 84–94.
- Jahng, J.W., Houpt, T.A., et al., 1997. Localization of monoamine oxidase A and B mRNA in the rat brain by in situ hybridization Synapse 25, 1, 30–36.
- Jaremko, M., Jaremko, Ł., et al., 2015. Structure of the mammalian TSPO/PBR protein Biochem. Soc. Trans. 43, 4, 566–571.
- Jenner, P., 2008. Functional models of Parkinson's disease: a valuable tool in the development of novel therapies Ann. Neurol. 64 Suppl 2, S16-29.
- Joers, V., Vermilyea, S., et al., 2014. Systemic administration of 6-OHDA to rhesus monkeys upregulates HLA-DR expression in brain microvasculature J Inflamm Res 7, 139–149.
- Jonkers, N., Sarre, S., et al., 2001. Benserazide decreases central AADC activity, extracellular dopamine levels and levodopa decarboxylation in striatum of the rat J Neural Transm (Vienna) 108, 5, 559–570.
- Jordan, S., Eberling, J.L., et al., 1997. 6-[18F]fluoro-L-m-tyrosine: metabolism, positron emission tomography kinetics, and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine lesions in primates Brain Res. 750, 1–2, 264–276.
- Juárez Olguín, H., Calderón Guzmán, D., et al., 2016. The Role of Dopamine and Its Dysfunction as a Consequence of Oxidative Stress Oxid Med Cell Longev 2016.
- Juhász, C., Dwivedi, S., et al., 2014. Comparison of Amino Acid Positron Emission Tomographic Radiotracers for Molecular Imaging of Primary and Metastatic Brain Tumors Mol Imaging 13.
- Kanazawa, M., Ninomiya, I., et al., 2017. Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke Int J Mol Sci 18, 10.
- Karasawa, N., Hayashi, M., et al., 2007. Tyrosine Hydroxylase (TH)- and Aromatic-L-Amino Acid Decarboxylase (AADC)-Immunoreactive Neurons of the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Brain: An Immunohistochemical Analysis Acta Histochem Cytochem 40, 3, 83–92.
- Kaur, K., Gill, J.S., et al., 2017. Neuroinflammation - A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease J. Neurol. Sci. 381, 308–314.
- Kaur, U., Banerjee, P., et al., 2015. Reactive oxygen species, redox signaling and neuroinflammation in Alzheimer's disease: the NF-κB connection Curr Top Med Chem 15, 5, 446–457.
- Kent, A.P., Stern, G.M., et al., 1990. The effect of benserazide on the peripheral and central distribution and metabolism of levodopa after acute and chronic administration in the rat. Br J Pharmacol 100, 4, 743–748.

- Kim, D.K., Kim, I.J., et al., 2004. System L-amino acid transporters are differently expressed in rat astrocyte and C6 glioma cells *Neurosci. Res.* 50, 4, 437–446.
- Kim, J.H., Kim, J.H., et al., 2006. Blood-neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface *J. Biochem. Mol. Biol.* 39, 4, 339–345.
- Kim, Y.S. & Joh, T.H., 2006. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease *Experimental & Molecular Medicine* 38, 4, 333–347.
- Kostrzewa, R.M. & Jacobowitz, D.M., 1974. Pharmacological Actions of 6-Hydroxydopamine *Pharmacol Rev* 26, 3, 199–288.
- Kumakura, Y. & Cumming, P., 2009. PET Studies of Cerebral Levodopa Metabolism: A Review of Clinical Findings and Modeling Approaches *The Neuroscientist* 15, 6, 635–650.
- Kumral, E., Bayulkem, G., et al., 2002. Spectrum of anterior cerebral artery territory infarction: clinical and MRI findings *European Journal of Neurology* 9, 6, 615–624.
- Kyono, K., Takashima, T., et al., 2011. Use of [18F]FDOPA-PET for in vivo evaluation of dopaminergic dysfunction in unilaterally 6-OHDA-lesioned rats *EJNMMI Res* 1, 25.
- Lanciego, J.L., Luquin, N., et al., 2012. Functional Neuroanatomy of the Basal Ganglia *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, 12.
- Lattera, J., Keep, R., et al., 1999. Blood—Brain Barrier *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects*. 6th edition.
- Lavisse, S., Guillermier, M., et al., 2012. Reactive astrocytes overexpress TSPO and are detected by TSPO positron emission tomography imaging *J. Neurosci.* 32, 32, 10809–10818.
- Lee, H.J., Weitz, A.J., et al., 2016. Activation of Direct and Indirect Pathway Medium Spiny Neurons Drives Distinct Brain-wide Responses *Neuron* 91, 2, 412–424.
- Lenz, K.M. & Nelson, L.H., 2018. Microglia and Beyond: Innate Immune Cells As Regulators of Brain Development and Behavioral Function *Front Immunol* 9.
- Leung, K., 2004. L-3,4-Dihydroxy-6-[18F]fluorophenylalanine In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Li, C.T., Palotti, M., et al., 2014. A dual-tracer study of extrastriatal 6-[18F]fluoro-m-tyrosine and 6-[18F]-fluoro-L-dopa uptake in Parkinson's disease *Synapse* 68, 8, 325–331.
- Li, F., Liu, J., et al., 2015. Crystal structures of translocator protein (TSPO) and mutant mimic of a human polymorphism *Science* 347, 6221, 555–558.

- Ling, E.-A. & Wong, W.-C., 1993. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts *Glia* 7, 1, 9–18.
- Liu, W., Rabinovich, A., et al., 2017. Anti-inflammatory and protective effects of MT-031, a novel multitarget MAO-A and AChE/BuChE inhibitor in scopolamine mouse model and inflammatory cells *Neuropharmacology* 113, 445–456.
- London, A., Cohen, M., et al., 2013. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair *Front Cell Neurosci* 7.
- Luxen, A., Guillaume, M., et al., 1992. Production of 6-[18F]fluoro-L-dopa and its metabolism in vivo--a critical review *Int J Rad Appl Instrum B* 19, 2, 149–158.
- Maeda, J., Sahara, T., et al., 2004. Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain *Synapse* 52, 4, 283–291.
- Maggiorani, D., Manzella, N., et al., 2017. Monoamine Oxidases, Oxidative Stress, and Altered Mitochondrial Dynamics in Cardiac Ageing *Oxid Med Cell Longev* 2017.
- Malarkey, E.B. & Parpura, V., 2008. Mechanisms of glutamate release from astrocytes *Neurochem Int* 52, 1–2, 142–154.
- Manninen, T., Havela, R., et al., 2018. Computational Models for Calcium-Mediated Astrocyte Functions *Front Comput Neurosci* 12.
- Männistö, P.T. & Kaakkola, S., 1999. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors *Pharmacol. Rev.* 51, 4, 593–628.
- Martí, M.J., Saura, J., et al., 2002. Striatal 6-hydroxydopamine induces apoptosis of nigral neurons in the adult rat *Brain Research* 958, 1, 185–191.
- Mazloom, M. & Smith, Y., 2006. SYNAPTIC MICROCIRCUITRY OF TYROSINE HYDROXYLASE-CONTAINING NEURONS AND TERMINALS IN THE STRIATUM OF MPTP-TREATED MONKEYS *J Comp Neurol* 495, 4, 453–469.
- McCready, V.R., Taylor, D.M., et al., 2013. Radioactive Isotopes in the Localization of Tumours: The Proceedings of the International Nuclear Medicine Symposium Arranged by the Institute of Cancer Research: Royal Cancer Hospital and Held at the Imperial College of Science and Technology, London, in September, 1967. Elsevier.
- McEnery, M.W., Snowman, A.M., et al., 1992. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 8, 3170–3174.
- Medcyclopaedia - Pet imaging 2012. Available at <http://archive.is/885n4>.
- Meiser, J., Weindl, D., et al., 2013. Complexity of dopamine metabolism *Cell Communication and Signaling* 11, 1, 34.

- Melamed, E. & Youdim, M.B., 1985. Prevention of dopaminergic toxicity of MPTP in mice by phenylethylamine, a specific substrate of type B monoamine oxidase. *Br J Pharmacol* 86, 3, 529–531.
- Melega, W.P., Perlmutter, M.M., et al., 1989. 4-[18F]fluoro-L-m-tyrosine: an L-3,4-dihydroxyphenylalanine analog for probing presynaptic dopaminergic function with positron emission tomography *J. Neurochem.* 53, 1, 311–314.
- Melega, W.P., Grafton, S.T., et al., 1991. L-6-[18F]Fluoro-DOPA Metabolism in Monkeys and Humans: Biochemical Parameters for the Formulation of Tracer Kinetic Models with Positron Emission Tomography *J Cereb Blood Flow Metab* 11, 6, 890–897.
- Michell-Robinson, M.A., Touil, H., et al., 2015. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair *Brain* 138, 5, 1138–1159.
- Midzak, A.S., Akula, N., et al., 2015. Computational modeling and biological validation of novel non-steroidal ligands for the cholesterol recognition/interaction amino acid consensus (CRAC) motif of the mitochondrial translocator protein (TSPO) *Pharmacological Research* 99, 393–403.
- Miller, P.W., Long, N.J., et al., 2008. Synthesis of ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O, and ¹³N Radiolabels for Positron Emission Tomography *Angewandte Chemie International Edition* 47, 47, 8998–9033.
- Mizrahi, R., Rusjan, P.M., et al., 2012. Translocator protein (18 kDa) polymorphism (rs6971) explains in-vivo brain binding affinity of the PET radioligand [18F]-FEPPA *J Cereb Blood Flow Metab* 32, 6, 968–972.
- Nagaratnam, N., Davies, D., et al., 1998. Clinical effects of anterior cerebral artery infarction *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 7, 6, 391–397.
- Nagatsu, T., Levitt, M., et al., 1964. TYROSINE HYDROXYLASE. THE INITIAL STEP IN NOREPINEPHRINE BIOSYNTHESIS *J. Biol. Chem.* 239, 2910–2917.
- Narayanaswami, V., Dahl, K., et al., 2018. Emerging PET Radiotracers and Targets for Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases: Outlook Beyond TSPO *Mol Imaging* 17.
- Navntoft, C.A. & Dreyer, J.K., 2016. How compensation breaks down in Parkinson's disease: Insights from modeling of denervated striatum *Mov Disord* 31, 3, 280–289.
- Obeso, J.A., Rodriguez-Oroz, M.C., et al., 2004. How does Parkinson's disease begin? The role of compensatory mechanisms *Trends in Neurosciences* 27, 3, 125–127.
- Ohsawa, K., Imai, Y., et al., 2004. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity *J. Neurochem.* 88, 4, 844–856.
- Okamura, N., Harada, R., et al., 2018. The development and validation of tau PET tracers: current status and future directions *Clin Transl Imaging* 6, 4, 305–316.

- Orihuela, R., McPherson, C.A., et al., 2016. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states *Br J Pharmacol* 173, 4, 649–665.
- Orr, M.B. & Gensel, J.C., 2018. Spinal Cord Injury Scarring and Inflammation: Therapies Targeting Glial and Inflammatory Responses *Neurotherapeutics* (May, 1), 1–13.
- Owen, D.R., Yeo, A.J., et al., 2012. An 18-kDa translocator protein (TSPO) polymorphism explains differences in binding affinity of the PET radioligand PBR28 *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1, 1–5.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., et al., 2006a. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 8, 402–409.
- Papadopoulos, V., Baraldi, M., et al., 2006b. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 8, 402–409.
- Papadopoulos, V., Liu, J., et al., 2007. Is there a mitochondrial signaling complex facilitating cholesterol import? *Molecular and Cellular Endocrinology* 265–266, 59–64.
- Pardridge, W.M. & Oldendorf, W.H., 1975. Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids *Biochim. Biophys. Acta* 401, 1, 128–136.
- Parpura, V. & Verkhratsky, A., 2012. The astrocyte excitability brief: from receptors to gliotransmission *Neurochem. Int.* 61, 4, 610–621.
- Pavese, N. & Brooks, D.J., 2009. Imaging neurodegeneration in Parkinson's disease *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1792, 7, 722–729.
- Perdiguero, E.G. & Geissmann, F., 2016. Development and maintenance of resident macrophages *Nat Immunol* 17, 1, 2–8.
- Perry, V.H. & Teeling, J., 2013. Microglia and macrophages of the central nervous system: the contribution of microglia priming and systemic inflammation to chronic neurodegeneration *Semin Immunopathol* 35, 5, 601–612.
- Petrelli, F., Dallérac, G., et al., 2018. Dysfunction of homeostatic control of dopamine by astrocytes in the developing prefrontal cortex leads to cognitive impairments *Molecular Psychiatry* (August, 20), 1.
- Pinder, R.M., 2002. *Neurotransmitters, Drugs, and Brain Function* Edited by R. A. Webster. John-Wiley & Sons, Ltd., Chichester, U.K. 2001. vi + 534 pp. 17 × 25 cm. ISBN 0-47197819-1. \$145.00. *Journal of Medicinal Chemistry* 45, 15, 3325–3325.
- Ponomarev, E.D., Veremeyko, T., et al., 2013. MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS *Glia* 61, 1, 91–103.

- Porter, J.T. & McCarthy, K.D., 1996. Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals *J. Neurosci.* 16, 16, 5073–5081.
- Prada, M.D., Kettler, R., et al., 1987. Inhibition of Decarboxylase and Levels of Dopa and 3-O-Methyldopa: A Comparative Study of Benserazide versus Carbidopa in Rodents and of Madopar Standard versus Madopar HBS in Volunteers *ENE* 27, Suppl. 1, 9–20.
- Prante, O., Maschauer, S., et al., 2013. Radioligands for the dopamine receptor subtypes J Labelled Comp Radiopharm 56, 3–4, 130–148.
- Pulagam, K.R., Colás, L., et al., 2017. Evaluation of the novel TSPO radiotracer [18 F] VUIIS1008 in a preclinical model of cerebral ischemia in rats *EJNMMI Research* 7, 1, 93.
- Qi, J., Leahy, R.M., et al., 1998. High-resolution 3D Bayesian image reconstruction using the microPET small-animal scanner *Phys Med Biol* 43, 4, 1001–1013.
- Real, C.C., Garcia, P.C., et al., 2017. Treadmill Exercise Prevents Increase of Neuroinflammation Markers Involved in the Dopaminergic Damage of the 6-OHDA Parkinson's Disease Model *J Mol Neurosci* 63, 1, 36–49.
- Reith, J., Dyve, S., et al., 1990. Blood-brain transfer and metabolism of 6-[18F]fluoro-L-dopa in rat *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 10, 5, 707–719.
- Roberts, L.M., Black, D.S., et al., 2008. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation *Neuroscience* 155, 2, 423–438.
- Rodrigues, R.W.P., Gomide, V.C., et al., 2001. Astroglial and Microglial Reaction After A Partial Nigrostriatal Degeneration Induced by The Striatal Injection of Different Doses of 6-Hydroxydopamine *International Journal of Neuroscience* 109, 1–2, 91–126.
- Rodriguez-Vieitez, E. & Nordberg, A., 2018. Imaging Neuroinflammation: Quantification of Astrocytosis in a Multitracer PET Approach *Methods Mol. Biol.* 1750, 231–251.
- Rojas, C., Stathis, M., et al., 2018. The Low-Affinity Binding of Second Generation Radiotracers Targeting TSPO is Associated with a Unique Allosteric Binding Site *J Neuroimmune Pharmacol* 13, 1, 1–5.
- Romeo, E., Cavallaro, S., et al., 1993. Stimulation of brain steroidogenesis by 2-aryl-indole-3-acetamide derivatives acting at the mitochondrial diazepam-binding inhibitor receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 267, 1, 462–471.
- Rubí, B. & Maechler, P., 2010. Minireview: New Roles for Peripheral Dopamine on Metabolic Control and Tumor Growth: Let's Seek the Balance *Endocrinology* 151, 12, 5570–5581.
- Ruottinen, H.M. & Rinne, U.K., 1998. COMT inhibition in the treatment of Parkinson's disease *J. Neurol.* 245, 11 Suppl 3, P25-34.

- Rupprecht, R., Papadopoulos, V., et al., 2010. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders *Nat Rev Drug Discov* 9, 12, 971–988.
- Russo, M.V. & McGavern, D.B., 2015. Immune Surveillance of the CNS following Infection and Injury *Trends Immunol.* 36, 10, 637–650.
- Saint-Aubert, L., Lemoine, L., et al., 2017. Tau PET imaging: present and future directions *Mol Neurodegener* 12.
- Sala, Q., Metellus, P., et al., 2014. 18F-DOPA, a clinically available PET tracer to study brain inflammation? *Clin Nucl Med* 39, 4, e283-5.
- Salokangas, R.K., Vilkmann, H., et al., 2000. High levels of dopamine activity in the basal ganglia of cigarette smokers *Am J Psychiatry* 157, 4, 632–634.
- Sasaki, Y., Ohsawa, K., et al., 2001. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 286, 2, 292–297.
- Schain, M., Benjaminsson, S., et al., 2013. Arterial input function derived from pairwise correlations between PET-image voxels *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 7, 1058–1065.
- Schapira, A.H.V., 2007. CHAPTER 71 - PARKINSON'S DISEASE In: A.H.V. Schapira, E. Byrne, S. DiMauro, R.S.J. Frackowiak, R.T. Johnson, Y. Mizuno, M.A. Samuels, S.D. Silberstein, & Z.K. Wszolek (eds). *Neurology and Clinical Neuroscience*. Mosby, Philadelphia 927–960.
- Schiepers, C., Chen, W., et al., 2007. 18F-FDOPA kinetics in brain tumors *J. Nucl. Med.* 48, 10, 1651–1661.
- Schnaitman, C., Erwin, V.G., et al., 1967. The submitochondrial localization of monoamine oxidase. An enzymatic marker for the outer membrane of rat liver mitochondria *J. Cell Biol.* 32, 3, 719–735.
- Serra, M., Madau, P., et al., 1999. 2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats *Br J Pharmacol* 127, 1, 177–187.
- Shen, D., Wang, X., et al., 2014. Scar-modulating treatments for central nervous system injury *Neurosci Bull* 30, 6, 967–984.
- Shin, E., Tronci, E., et al., 2012. Role of Serotonin Neurons in L-DOPA- and Graft-Induced Dyskinesia in a Rat Model of Parkinson's Disease *Parkinsons Dis* 2012.
- Simats, A., García-Berrocó, T., et al., 2016. Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862, 3, 411–424.
- Smith, S.M. & Nichols, T.E., 2009. Threshold-free cluster enhancement: addressing problems of smoothing, threshold dependence and localisation in cluster inference *Neuroimage* 44, 1, 83–98.

- Sofroniew, M.V., 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation *Trends in Neurosciences* 32, 12, 638–647.
- Sossi, V., Holden, J.E., et al., 2003. Effect of dopamine loss and the metabolite 3-O-methyl-[18F]fluoro-dopa on the relation between the 18F-fluorodopa tissue input uptake rate constant K_{occ} and the [18F]fluorodopa plasma input uptake rate constant K_i *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 23, 3, 301–309.
- Spina, M.B. & Cohen, G., 1989. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 4, 1398–1400.
- Swanson, L.W., 1998. *Brain maps : structure of the rat brain : a laboratory guide with printed and electronic templates for data, models, and schematics /*. (2nd rev. ed. ed.). Elsevier, Amsterdam ;
- Szulzewsky, F., Pelz, A., et al., 2015. Glioma-Associated Microglia/Macrophages Display an Expression Profile Different from M1 and M2 Polarization and Highly Express *Gpnmb* and *Spp1* *PLoS One* 10, 2.
- Tang, Y. & Le, W., 2016. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases *Mol. Neurobiol.* 53, 2, 1181–1194.
- Tansey, M.G. & Goldberg, M.S., 2010. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention *Neurobiol. Dis.* 37, 3, 510–518.
- The MICAD Research Team, 2004. 6-[18F]Fluoro-l-m-tyrosine In: *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD).
- Thiele, S.L., Warre, R., et al., 2012. Development of a Unilaterally-lesioned 6-OHDA Mouse Model of Parkinson's Disease *J Vis Exp* 60.
- Tieu, K., 2011. *A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease* Cold Spring Harb Perspect Med 1, 1.
- Torres-Platas, S.G., Comeau, S., et al., 2014. Morphometric characterization of microglial phenotypes in human cerebral cortex *J Neuroinflammation* 11, 12.
- Tredwell, M., Preshlock, S.M., et al., 2014. Inside Cover: A General Copper-Mediated Nucleophilic 18F Fluorination of Arenes (*Angew. Chem. Int. Ed.* 30/2014) *Angewandte Chemie International Edition* 53, 30, 7678–7678.
- Treseder, S.A., Rose, S., et al., 2003. Commonly used L-amino acid decarboxylase inhibitors block monoamine oxidase activity in the rat *Journal of Neural Transmission* 110, 3, 229–238.
- Trigo-Damas, I., Rey, N.L.-G. del, et al., 2018. Novel models for Parkinson's disease and their impact on future drug discovery *Expert Opinion on Drug Discovery* 13, 3, 229–239.

- Ugrumov, M.V., Melnikova, V.I., et al., 2004. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats *Neuroscience* 124, 3, 629–635.
- Ungerstedt, U., 1971. Adipsia and Aphagia after 6-Hydroxydopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System *Acta Physiologica Scandinavica* 82, 367 S, 95–122.
- Ungerstedt, U., n.d. Adipsia and Aphagia after 6-Hydroxydopamine Induced Degeneration of the Nigro-striatal Dopamine System - Ungerstedt - 1971 - *Acta Physiologica Scandinavica* - Wiley Online Library Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-201X.1971.tb11001.x>.
- Vaquero, J.J. & Kinahan, P., 2015. Positron Emission Tomography: Current Challenges and Opportunities for Technological Advances in Clinical and Preclinical Imaging Systems *Annual Review of Biomedical Engineering* 17, 1, 385–414.
- Veenman, L. & Kugler, M.G. and W., 2014. Apoptosis Induction by Erucylphosphocholine via the 18 kDa Mitochondrial Translocator Protein: Implications for Cancer Treatment Available at <http://www.eurekaselect.com/120830/article>.
- Vela, J.M., Yáñez, Á., et al., 2002. Time Course of Proliferation and Elimination of Microglia/Macrophages in Different Neurodegenerative Conditions *Journal of Neurotrauma* 19, 11, 1503–1520.
- Venneti, S., Wang, G., et al., 2008. The Positron Emission Tomography Ligand DAA1106 Binds With High Affinity to Activated Microglia in Human Neurological Disorders *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 10, 1001–1010.
- Verkhatsky, A., Matteoli, M., et al., 2016. Astrocytes as secretory cells of the central nervous system: idiosyncrasies of vesicular secretion *The EMBO Journal* 35, 3, 239.
- Villa, G., Ceruti, S., et al., 2010. Temporomandibular Joint Inflammation Activates Glial and Immune Cells in Both the Trigeminal Ganglia and in the Spinal Trigeminal Nucleus *Molecular Pain* 6, 1744-8069-6–89.
- Vivekanantham, S., Shah, S., et al., 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease: role in neurodegeneration and tissue repair *International Journal of Neuroscience* 125, 10, 717–725.
- Vollmar, S., Hampl, J.A., et al., 2007. Integration of Functional Data (PET) into Brain Surgery Planning and Neuronavigation In: T.M. Buzug, D. Holz, J. Bongartz, M. Kohl-Bareis, U. Hartmann, & S. Weber (eds). *Advances in Medical Engineering*. (Springer Proceedings in Physics). Springer Berlin Heidelberg 98–103.
- Wahl, L., Chirakal, R., et al., 1994. The Distribution and Kinetics of [18F]6-Fluoro-3-O-Methyl-l-Dopa in the Human Brain *J Cereb Blood Flow Metab* 14, 4, 664–670.

- Walker, M.D., Dinelle, K., et al., 2013. In-vivo measurement of LDOPA uptake, dopamine reserve and turnover in the rat brain using [18F]FDOPA PET *J Cereb Blood Flow Metab* 33, 1, 59–66.
- Wang, Q., Liu, Y., et al., 2015. Neuroinflammation in Parkinson's disease and its potential as therapeutic target *Transl Neurodegener* 4.
- Wanner, I.B., Anderson, M.A., et al., 2013. Glial Scar Borders Are Formed by Newly Proliferated, Elongated Astrocytes That Interact to Corral Inflammatory and Fibrotic Cells via STAT3-Dependent Mechanisms after Spinal Cord Injury *J Neurosci* 33, 31, 12870–12886.
- Ward, N.M., Sharkey, J., et al., 1998. Simple and choice reaction-time performance following occlusion of the anterior cerebral arteries in the rat *Exp Brain Res* 123, 3, 269–281.
- Weyler, W., P. Hsu, Y.-P., et al., 1990. Weyler W, Hsu YP, Breakefield XO. Biochemistry and genetics of monoamine oxidase. *Pharmacol Ther* 47: 391-417. Vol. 47.
- Wile, D.J., Agarwal, P.A., et al., 2017. Serotonin and dopamine transporter PET changes in the premotor phase of LRRK2 parkinsonism: cross-sectional studies *Lancet Neurol* 16, 5, 351–359.
- Youdim, M.B.H. & Bakhle, Y.S., 2006. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness *Br J Pharmacol* 147, Suppl 1, S287–S296.
- Youdim, M.B.H., Edmondson, D., et al., 2006. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors *Nature Reviews Neuroscience* 7, 4, 295–309.
- Zhang, M.-R., Kida, T., et al., 2003. [(11)C]DAA1106: radiosynthesis and in vivo binding to peripheral benzodiazepine receptors in mouse brain *Nucl. Med. Biol.* 30, 5, 513–519.
- Zhang, M.-R., Kumata, K., et al., 2007. A practical route for synthesizing a PET ligand containing [18F]fluorobenzene using reaction of diphenyliodonium salt with [18F]F⁻ *Tetrahedron Letters* 48, 49, 8632–8635.
- Zhou, H., Lapointe, B.M., et al., 2006. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide *J. Immunol.* 177, 11, 8103–8110.
- Zhu, Y., Zhang, J., et al., 2012. Overview of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11, 4, 350–358.
- Zischler, J., Krapf, P., et al., 2016. Automated synthesis of 4-[18F]fluoroanisole, [18F]DAA1106 and 4-[18F]FPhe using Cu-mediated radiofluorination under “minimalist” conditions *Applied Radiation and Isotopes* 115, 133–137.

- Zlatopolskiy, B.D., Zischler, J., et al., 2015. A Practical One-Pot Synthesis of Positron Emission Tomography (PET) Tracers via Nickel-Mediated Radiofluorination *ChemistryOpen* 4, 4, 457–462.
- Zuch, C.L., Nordstroem, V.K., et al., 2000. Time course of degenerative alterations in nigral dopaminergic neurons following a 6-hydroxydopamine lesion *J. Comp. Neurol.* 427, 3, 440–454.

11 Abkürzungsverzeichnis

[¹¹ C]DED	[¹¹ C]Deuterium-L-deprenyl
[¹¹ C]PK11195	[¹¹ C]N-Butan-2-yl-1-(2-chlorophenyl)-N-methylisochinolin-3-carboxamid
[¹⁸ F]DAA1106	6-[¹⁸ F]N-(2,5-Dimethoxybenzyl)-N-(5-fluor-2-phenoxyphenyl)acetamid
[¹⁸ F]DPA714 ..	[¹⁸ F]N,N-Diethyl-2-[4-(2-fluorethoxy)phenyl]-5,7-dimethylpyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-acetamid
[¹⁸ F]FET	(S)-O-(2-[¹⁸ F]Fluorethyl)tyrosin
3-[¹⁸ F]HVA	(2-[¹⁸ F]Fluor-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)essigsäure
3-[¹⁸ F]MT	6-[¹⁸ F]Fluor-3-methoxytyramin
3-[¹⁸ F]OMFD	(S)-3-(2-[¹⁸ F]Fluor-4-hydroxy-5-methoxyphenyl)alanin
5-[¹⁸ F]FMT	(S)-3-[¹⁸ F]Fluor-5-hydroxyphenylalanin
6-[¹⁸ F]FDA	2-(2-[¹⁸ F]Fluor-4,5-dihydroxyphenyl)ethylamin
6-[¹⁸ F]FDOPA	(S)-3,4-Dihydroxy-6-[¹⁸ F]fluorphenylalanin
6-[¹⁸ F]FDOPAC	(2-[¹⁸ F]Fluor-4,5-dihydroxyphenyl)essigsäure
6-[¹⁸ F]FMT	(S)-2-[¹⁸ F]Fluor-5-hydroxyphenylalanin
6-[¹⁸ F]FMTA	2-(2-[¹⁸ F]Fluor-5-hydroxyphenyl)ethylamin
6-[¹⁸ F]FPAC	(2-[¹⁸ F]Fluor-5-Hydroxyphenyl)essigsäure
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
AADC	Aromatische-L-aminosäure-decarboxylase
AC	Adenylzyklase
ACA	Arteria cerebri anterioris
ACAo	Okklusion der Arteria cerebri anterioris
AIF-1	engl. Allograft inflammatory factor 1
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
COMT	Catecho-O-Methyltransferase
DAB	3,3 Diaminobenzidin
DAT	Dopamintransporter
DOPAC	Dihydroxyphenylessigsäure
ET-1	Endothelin 1
FOV	engl. Field of View
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafaserprotein (engl. Glial fibrillary acidic protein)
GPe	Globus Pallidus externa

GPI	Globus Pallidus interna
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. Horseradish peroxidase)
HVA	Homovanillinsäure
Iba1	engl. Ionized calcium binding adapter molecule 1
IgG	Immunglobulin G
LAT1	L-Aminosäure Transporter 1
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
LOR	Line of response
MAO	Monoaminoxidase
MCA	Arteria cerebri media
MCAo	Okklusion der Arteria cerebri media
MFB	Mediales Vorderhirnbündel (engl. Medial forebrain bundle)
MRT	Magnetresonanztomographie
MT	Methoxytyramin
NGS	engl. Normal Goat Serum
NHS	engl. Normal Horse Serum
PBS	engl. Phosphate buffered saline
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
ROS	Rektive Sauerstoffspezies (engl. Reactive Oxygen Species)
SNpc	Substantia nigra pars compacta
STN	engl. subthalamic nucleus
SUVR	engl. Standardized uptake value ratio
TFCE	engl. Threshold Free Cluster Enhancement
TGF	engl. Transforming Growth Factor
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TMEM19	engl. Transmembrane protein 19
TNF	Tumornekrosefaktor
TSPO	Translocator Protein (engl. Tryptophan-rich sensory protein)
VMAT	vesikuläre Monoamintransporter
VOI	engl. Volume of Interest
VTA	Area tegmentalis ventralis
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran danke ich meiner Betreuerin PD Dr. Heike Endepols, die mich mit ihrer großen wissenschaftlichen und methodischen Kompetenz stets unterstützt, geduldig gelehrt und mit viel Zuspruch und Ermutigung durch die Promotionszeit begleitet hat. Gleiches gilt für Dr. Cathrin Rohleder, ohne die ich diese Arbeit wohl nie begonnen hätte. Beide sind mir sowohl wissenschaftlich als auch menschlich ein Vorbild.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Bernd Neumaier. Nicht nur für die Genehmigung der zahlreichen Tracersynthesen und -lieferungen des INM-5, sondern dafür, dass er mir diese Arbeit am Institut für Radiochemie und Experimentelle Bildgebung erst ermöglicht hat. Ich danke ihm vor allem für seine Unterstützung und für das Vertrauen, das er mir in dieser Zeit entgegenbrachte. Für die Ermöglichung dieser Arbeit danke ich auch Prof. Dr. Alexander Drzezga und dem DZNE Bonn.

Ein aufrichtiges Dankeschön richte ich an PD Dr. Boris Zlatopolskiy, der mir mit seinen wissenschaftlichen Anregungen in den letzten Jahren häufig weiterhalf und ohne den es die evaluierten Radiotracer in dieser Form nicht gegeben hätte. Diesbezüglich gilt mein Dank auch Dr. Johannes Zischler, Dr. Fadi Zarrad, Dr. Daniel Modemann, Dr. Philipp Krapf und allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Radiopharmakaproduktion und der Qualitätskontrolle des INM-5.

Meinen MitdoktorandInnen und KollegInnen Olesia Bannykh, Austin Craig, Mehrab Guliyev, Elizaveta Urusova, Lukas Vieth und vor allem Nadine Apetz danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, ihre Unterstützung im Labor, für die zahlreichen fachlichen aber noch mehr für die nicht fachlichen Gespräche, den freundschaftlichen Zusammenhalt und den Spaß bei der Arbeit.

Ich möchte mich bei Julia Büser, Marcus Jannes, Martin Jäntgen, Jennifer Mertens, Nicolai Mettbach, Katharina Schneider, Florian Stümer, Elena Wagener, Julia Weber, Andreas Werner und Laura von Witzenhausen für ihre jahrelange Freundschaft und die moralische Unterstützung bedanken. Insbesondere bei Dr. Christopher Stoffels, ohne den ich aus vielerlei Gründen nicht dort wäre, wo ich heute bin. Ihm und Katharina Schneider

Danksagung

danke ich außerdem von Herzen für das Korrekturlesen und die großartige Unterstützung in den letzten Wochen.

In tiefer Verbundenheit danke ich meinem Freund Mehmet Tuglu dafür, dass er mich mit seiner unerschütterlichen Geduld und Stärke durch die Promotionszeit und diverses Leergut aus dem Institut getragen hat. Er hat die Ruhe, Unbeschwertheit und den IT-Support in mein Leben gebracht, ohne die mir diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Abschließend möchte ich einen ganz besonderen Dank an meine Eltern richten, die mir alles im Leben ermöglicht und nichts erzwungen, immer gegeben und niemals verlangt haben. Dafür, dass sie mir keine Grenzen gesetzt, sondern alle für mich eingerissen haben.

Danke.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau PD Dr. Heike Endepols und Prof. Dr. Bernd Neumaier betreut worden.

Datum und Unterschrift

Teilpublikationen

April 2017

[F¹⁸]FDOPA PET: Does neuroinflammation-related [F¹⁸]FDOPA uptake mask dopamine depletion in Parkinson's Disease?

S. Vus, J. Zischler, C. Rohleder, B. Zlatopolskiy, H. Boecker, T. Klockgether, A. Drzezga, B. Neumaier, H. Endepols. European Molecular Imaging Meeting, Köln

April 2017

[F¹⁸]FDOPA uptake during brain inflammation in a rat hemiparkinson model.

S. Vus, J. Zischler, C. Rohleder, B. Zlatopolskiy, H. Boecker, T. Klockgether, A. Drzezga, B. Neumaier, H. Endepols. 55. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, Dresden

Oktober 2017

[F¹⁸]FDOPA PET: Does neuroinflammation-related [F¹⁸]FDOPA uptake mask dopamine depletion in Parkinson's Disease?

S. Vus, J. Zischler, C. Rohleder, B. Zlatopolskiy, H. Boecker, T. Klockgether, A. Drzezga, B. Neumaier, H. Endepols. 25. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Radiochemie und Radiopharmazie der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, Starnberg

April 2018

Imaging dopamine metabolism: preclinical evaluation of 5-[F¹⁸]FMT and 6-[F¹⁸]FMT compared to 6-[F¹⁸]FDOPA.

S. Vus, D. Modemann, B. Zlatopolskiy, T. Klockgether, A. Drzezga, B. Neumaier, H. Endepols. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nuklearmedizin, Bremen