

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung von N-Acetyl-Aspartat in der Pathogenese der
Schizophrenie - Magnetresonanztomographische in-vivo-
Untersuchungen zur Quantifizierung zerebraler neurometabolischer
Veränderungen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andreas Arthur Klär

aus Illingen (Saar)

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. J. Gallinat

2.: Prof. Dr. med. U. Hegerl

3.: Prof. Dr. med. G. Juckel

Datum der Promotion: 4. Februar 2011

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
1	ABSTRACT	1
2	EINLEITUNG	2
3	MATERIAL UND METHODEN.....	3
3.1	<i>Probanden, Patienten und Kontrollgruppe.....</i>	3
3.2	<i>Neuropsychologische Testverfahren sowie Verfahren zur Erfassung der Psychopathologie</i>	4
3.3	<i>Blutdruckmessung und Bestimmung der arteriellen Elastizität mittels Augmentationsindex</i>	4
3.4	<i>Einzelnukleotid-Polymorphismen-Genotypisierung.....</i>	4
3.5	<i>Magnetresonanztomographie</i>	5
3.6	<i>Volumetrische Bestimmung der hippocampalen Volumina</i>	5
3.7	<i>Statistik.....</i>	6
4	ERGEBNISSE	6
4.1	<i>Ergebnisse der kombinierten ¹H-MRS und MRT Studie</i>	6
4.2	<i>Korrelationen zwischen Ergebnissen der Genotypisierung und zerebraler Metabolitenkonzentrationen</i> <i>7</i>	7
4.3	<i>Der Einfluss somatischer Faktoren auf zerebrale Metabolitenkonzentrationen bzw. auf kognitive</i> <i>Parameter.....</i>	7
5	DISKUSSION	8
5.1	<i>Der Zusammenhang zwischen hippocampaler Volumenminderung und Verlust an hippocampalem</i> <i>NAA bei der Pathogenese der Schizophrenie.....</i>	8
5.2	<i>Der Einfluss des BDNF-Polymorphismus Val66Met auf die Glutamat- sowie NAA- Konzentrationen im</i> <i>Hippocampus sowie im ACC</i>	9
5.3	<i>Der Einfluss somatischer Faktoren auf die hippocampale Glutamatkonzentration sowie auf die</i> <i>Gedächtnisfunktion</i>	11
6	LITERATURVERZEICHNIS	12
II	ANTEILSERKLÄRUNG	14
III	DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN.....	15
1	INTERACTION OF HIPPOCAMPAL VOLUME AND N-ACETYLASPARTATE CONCENTRATION DEFICITS IN SCHIZOPHRENIA: A COMBINED MRI AND (1)H-MRS STUDY	16
2.	MET CARRIERS OF BDNF VAL66MET GENOTYPE SHOW INCREASED N-ACETYLASPARTATE CONCENTRATION IN THE ANTERIOR CINGULATE CORTEX	23
3.	THE IMPACT OF BLOOD PRESSURE ON HIPPOCAMPAL GLUTAMATE AND MNESTIC FUNCTION	28
IV	LEBENSLAUF.....	35
V	KOMPLETTE PUBLIKATIONSLISTE	36
VI	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	37
VII	DANKSAGUNG	38

I ZUSAMMENFASSUNG

1 ABSTRACT

Hintergrund: Die Protonen-Magnetresonanzspektroskopie (^1H -MRS) ermöglicht, *in vivo* zerebrale Substanzkonzentrationen zu messen. Dabei spiegeln Konzentrationsänderungen bestimmter Substanzen subtile zerebrale Störungen wider. Daher sind die in der ^1H -MRS nachweisbaren neurochemische Veränderungen möglicherweise geeignet, die bisher wenig verstandene Pathobiologie psychiatrischer Störungen zu klären. Veränderungen der neurometabolischen Integrität sind bei der Schizophrenie gut belegt; spektroskopisch konnten u.a. regionale Verminderungen der zerebralen N-Acetyl-Aspartat-Konzentrationen (NAA) nachgewiesen werden. In dieser kumulativen Dissertation wird an Hand von drei publizierten Studien untersucht, ob diese bei schizophrenen Patienten gefundenen NAA-Defizite weitere strukturelle oder funktionelle Störungen des ZNS (Volumen, Kognition, Psychopathologie) bedingen oder damit in Zusammenhang stehen. Außerdem wurde untersucht, ob die NAA-Konzentration (und die anderer Metabolite) durch weitere genetische bzw. somatische Faktoren beeinflusst wird. So wurde der Einfluss des „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) - Val66Met Polymorphismus auf zerebrale Metabolitenkonzentrationen untersucht. BDNF ist einerseits relevant für die neuronale Plastizität, als dessen neurometabolisches Korrelat NAA- und andere Metabolitenkonzentrationen gelten. Andererseits gibt es Hinweise, dass BDNF mit der Schizophrenie verknüpft ist, da der BDNF Val66Met Polymorphismus als protektiver Faktor gilt. Die dritte Studie untersuchte, ob und in welchem Maß somatische Faktoren (Blutdruck, Gefäßsteifigkeit) einen direkten Einfluss auf hippocampale Transmitterkonzentrationen haben.

Methoden: Bei 171 Studienteilnehmern (87 Männer und 84 Frauen) wurde mittels einer 3-Telsa ^1H -MRS die Glu- bzw. NAA-Konzentration im Hippocampus und im ACC gemessen. Darüber hinaus wurde bei 29 schizophrenen Patienten sowie 44 Kontrollprobanden simultan zur ^1H -MRS eine MRT basierte Volumetrie des Hippocampus durchgeführt. Zusätzlich zur ^1H -MRS wurde bei 16 Probanden der MAP sowie die Gedächtnisleistung untersucht, sowie bei weiteren 82 Probanden eine Genotypisierung des BDNF Polymorphismus durchgeführt.

Ergebnisse: Im Vergleich zu Gesunden zeigen Schizophrene im Hippocampus sowohl eine signifikante Volumen- als auch NAA-Verminderung. Das Hippocampusvolumen und die NAA-Konzentration zeigen eine signifikante negative Korrelation. Die NAA-Konzentration im ACC ist signifikant erhöht bei Trägern des BDNF Met-Allels. Der MAP zeigt altersbereinigt eine signifikante negative Korrelation mit der hippocampalen Glu-Konzentration.

Diskussion: Die negative Korrelation zwischen der hippocampalen NAA-Konzentration und dem Volumen bei

Schizophrenen verweist auf das Vorhandensein eines Mechanismus, der seinerseits sowohl neurometabolische als auch morphologische Veränderungen hervorruft. Erhöhte NAA Konzentrationen im ACC können als protektiver Faktor dazu beitragen, dass die BDNF Met-Allel-Träger seltener an Schizophrenie erkranken. Die hippocampale glutamaterge Neurotransmission und die kognitive Leistung werden unmittelbar vom Blutdruck beeinflusst, sodass der Blutdruck als Störfaktor bei der Bewertung von zerebralen Metabolitenkonzentrationen zu werten ist. Andererseits erschließen sich aus den Ergebnissen neue Impulse für die Demenzforschung.

2 EINLEITUNG

Mittels ^1H -MRS ist es möglich, *in vivo* zerebrale Substanzkonzentrationen in verschiedenen Hirnregionen zu messen. Bereits subtile zerebrale Störungen können zu Veränderungen der intrazerebralen Substanzkonzentrationen führen. Die in der ^1H -MRS nachweisbaren neurochemischen Veränderungen sind daher möglicherweise geeignet, die bisher wenig verstandene Pathobiologie psychiatrischer Störungen zu klären. Bei der Schizophrenie sind Veränderungen der neurometabolischen Integrität gut belegt. Spektroskopisch konnten u.a. regionale Verminderungen der zerebralen NAA-Konzentrationen nachgewiesen werden. NAA, das ausschließlich in Neuronen gebildet wird, ist in der Literatur als ein Marker für die neuronale Integrität und die Anzahl eutropher Neuronen beschrieben worden (Clark et al., 2006). NAA ist für die ^1H -MRS von großer Bedeutung, da NAA den bestabgrenzbaren Peak erzeugt, weshalb seine Konzentration auch mit hoher Genauigkeit und Verlässlichkeit (Re-Test-Reliabilität) gemessen werden kann (Schubert et al., 2004). Des Weiteren ist NAA mit dem Glutamat-Metabolismus sehr eng verbunden (Einzelheiten in der Originalpublikation). Dies ist bedeutsam, da Glutamat in der Pathogenese der Schizophrenie eine entscheidende Rolle zugeschrieben wird.

In dieser kumulativen Dissertation wird an Hand von drei publizierten Studien der Frage nachgegangen, ob diese bei schizophrenen Patienten gefundenen NAA-Defizite weitere strukturelle oder funktionelle Störungen des ZNS (Volumen, Kognition, Psychopathologie) bedingen oder damit in Zusammenhang stehen. Obwohl bei schizophrenen Patienten sowohl strukturelle als auch neurometabolische Veränderungen in diversen kortikalen und subkortikalen Regionen nachgewiesen wurden (Abbott and Bustillo, 2006) und das topographische Verteilungsprofil jener Veränderungen annähernd deckungsgleich ist, wurde bisher nicht systematisch untersucht, ob es zwischen den Volumendefiziten und den NAA-Verlusten einen Zusammenhang gibt. Ziel der ersten Studie ist es, mit Hilfe einer multimodalen Bildgebung (MRT und ^1H -MRS) sowohl neurometabolische als auch strukturelle Daten zu erheben. Es soll

geprüft werden, ob sich im Hippocampus der einzelnen schizophrenen Studienteilnehmer sowohl die in der Literatur beschriebene NAA-Konzentrationsminderung als auch der Volumenverlust replizieren lässt. Im Anschluss daran soll unsere Hypothese einer Assoziation zwischen den zu erwartenden neurometabolischen und strukturellen Veränderungen geprüft werden. Darüber hinaus wurde in zwei weiteren Studien untersucht, ob die NAA-Konzentration (und die anderer Metabolite) durch genetische bzw. somatische Faktoren beeinflusst wird. So wurde der Einfluss des BDNF-Val66Met Polymorphismus auf zerebrale Metabolitenkonzentrationen untersucht. BDNF ist relevant für die neuronale Plastizität; diese neuronale Plastizität findet ihr neurometabolisches Korrelat in den Konzentrationen von NAA- und weiterer Metaboliten. Daneben haben Studien einen Zusammenhang zwischen einem Mangel an BDNF und Schizophrenie zeigen können. Der BDNF Val66Met Polymorphismus gilt als protektiver Faktor und bei Trägern des Genotyps Val66Met sind höhere BDNF Konzentrationen nachweisbar (Lang et al., 2009). An diese Forschungsergebnisse anschließend stellt sich die Frage, ob bei Trägern des Met-Allels veränderte zerebrale Metabolitenkonzentrationen im Hippocampus oder im „anterior cingulate cortex“ (ACC) nachzuweisen sind; wird die intrazerebrale NAA-Konzentration durch genetische Faktoren beeinflusst? Die dritte Studie untersuchte, ob auch somatische Faktoren wie etwa der Blutdruck einen direkten Einfluss auf hippocampale Transmitterkonzentrationen haben. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde bei gesunden, normotensiven Probanden der Einfluss des Blutdrucks bzw. der arteriellen Steifigkeit auf zerebrale NAA- und Glutamat-Konzentrationen sowie die Gedächtnisleistung untersucht.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probanden, Patienten und Kontrollgruppe

Die vorliegende kumulative Promotionsarbeit bezieht sich auf drei voneinander unabhängige Stichproben. Alle Studien wurden durch die Ethikkommission der Charité genehmigt; die schriftliche Einwilligungserklärung aller Studienteilnehmer wurde im Vorfeld eingeholt. Insgesamt wurden 171 Studienteilnehmer (87 Männer und 84 Frauen) rekrutiert und eine ¹H-MRS Untersuchung nach dem unten beschriebenen Protokoll durchgeführt. Bei 16 psychiatrisch gesunden Probanden (8 Männer und 8 Frauen) mit normalen/hochnormalen Blutdruckwerten bzw. mit Bluthochdruck im Stadium 1 wurden zusätzlich zur ¹H-MRS kardiovaskuläre Parameter erhoben sowie neuropsychologische Testungen durchgeführt. Bei 82 gesunden Probanden (40 Männer und 42 Frauen) wurde zusätzlich zur ¹H-MRS eine Einzelnukleotid-Polymorphismen-Genotypisierung vorgenommen. 29 schizophrene Patienten (19 Männer und 10 Frauen) sowie 44 gesunde Kontrollprobanden (20 Männer und 24 Frauen) wurden zur

multimodalen Bildgebung (MRT basierte Volumetrie + ^1H -MRS) rekrutiert. Bei den schizophrenen Patienten wurden die psychopathologischen Symptome mit Hilfe der Fremdbeurteilungsskala „Positive and Negative Syndrome Scale“ (PANSS) beurteilt. Detaillierte Informationen zu den jeweiligen Ein- und Ausschlusskriterien sowie weitere klinische und demographische Daten zum Patienten- bzw. Probandenkollektiv sind den Original-Publikationen zu entnehmen.

3.2 Neuropsychologische Testverfahren sowie Verfahren zur Erfassung der Psychopathologie

Zur Messung des deklarativen Verbalgedächtnisses bedienten wir uns des „Auditory Verbal Learning Test“ (AVLT) in seiner deutschen Übersetzung. Es wurde insgesamt 5 Mal eine Liste mit 15 semantisch unabhängigen Wörtern in derselben Reihenfolge vorgelesen und nach jedem Lerndurchgang wurde der Proband zur freien Reproduktion der Wörter aufgefordert. Messgröße ist die Summe der richtig wiedergebenden Items der einzelnen Lerndurchgänge. Zur Untersuchung der verbalen, semantischen Gedächtnisfunktion und des Kurzzeitgedächtnis führten wir einen Untertest (i.e. „Nacherzählen einer kurzen Geschichte“) des „Rivermead Behavioural Memory Test“ (RBMT) durch. Diese Geschichte ist insgesamt in 21 Items unterteilt und für jede richtige Wiedergabe eines Items wurde ein Punkt vergeben, sodass maximal 21 Rohpunktwerte erreicht werden konnten.

3.3 Blutdruckmessung und Bestimmung der arteriellen Elastizität mittels Augmentationsindex

Die standardisierten Bedingungen, unter denen alle Messungen durchgeführt wurden, sind in der Original-Publikation genau beschrieben (Westhoff et al., 2010). Die Messung des Augmentationsindex (AI), des systolische Blutdrucks, des diastolische Blutdrucks sowie der Herzfrequenz wurden mittels des HEM-9000AI Gerätes (Omron Healthcare, Kyoto, Japan) durchgeführt. Blutdruckwerte wurden oszillometrisch gemessen und der mittlere arterielle Druck (MAP) errechnet; der AI wurde computergesteuert durch das HEM-9000AI Gerät auf der Grundlage einer tonometrischen Pulswellenanalyse der A. radialis ermittelt und als frequenzkorrigierter AI_{75} angegeben.

3.4 Einzelnukleotid-Polymorphismen-Genotypisierung

Die genomische DNS wurde aus venösen Blutproben der Probanden mittels Aussalzmethode isoliert, die Genotypisierung des BDNF SNP rs6265 erfolgte mittels eines TaqMan 5'-Exonuclease Assays. Eine detaillierte Beschreibung des Verfahrens sowie Ergebnisse der

Reliabilitätsprüfung des Genotypisierungsverfahrens sind in der Original-Arbeit beschrieben (Gallinat et al., 2010).

3.5 Magnetresonanztomographie

Die magnetresonanztomographischen Messungen erfolgten an einem 3-Tesla-Scanner (MEDSPEC 30/100, Bruker Biospin, Ettlingen), wobei eine zirkularpolarisierte Kopfspule verwendet wurde. Nachdem T1-gewichtete Bilder mittels MDEFT (modified driven equilibrium Fourier transform) mit TE = 3,8 ms, TR = 20,53 ms; 128 Schichten mit einer Auflösung von 1 x 1 x 1,5 mm³, erzeugt wurden, erfolgte die Aufnahme der MR-Spektren in 2 x 3 x 2 cm³ bzw. 2,5 x 4 x 2 cm³ großen Voxeln, die den linken Hippokampus bzw. den ACC umfassten. Bei der Quantifizierungsprozedur der Metaboliten folgten wir einer in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methodik (Schubert et al. 2004). Zur exakten Metabolitenquantifizierung wurde ein „Time domain-frequency domain“-Verfahren (Schubert et al. 2004) benutzt, das Phantomspektren, A-priori-Informationen sowie eine nicht-parametrische Hintergrundbewertung berücksichtigt. Aus den Spektren wurden die Amplituden der Resonanzen von Gesamt-Cholin (tCho), Gesamt-Kreatin (tCr), NAA, Glutamat und Glutamin gewonnen; zur exakten Quantifizierung von Glutamat wurden konstante Frequenzunterschiede und gleiche Linienbreiten für Glutamat, Glutamin und NAA postuliert. Diese Methode zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität bei der Bestimmung der C4-Resonanz von Glutamat gegenüber den Resonanzen von Glutamin und GABA aus. Die Glutamat- sowie NAA-Amplituden wurden für unterschiedliche Spulenbeladungen sowie für transversale Relaxationseffekte korrigiert und die einzelnen Konzentrationen für NAA und Glutamat mittels einer SPM2-gestützten Segmentierung um den Anteil an zerebrospinaler Flüssigkeit in den Zielregionen bereinigt.

3.6 Volumetrische Bestimmung der hippocampalen Volumina

Um die manuelle Segmentierung der Hippocampusformation zu ermöglichen, verwendeten wir ein etabliertes Protokoll (Narr et al., 2004). Mit Hilfe der Software MultiTracer (<http://air.bmap.ucla.edu/MultiTracer/>) wurde manuell die Grenzlinie, die die graue Substanz des Hippocampus von der ihn umgebenden weißen Substanz trennt, in hochauflösenden T₁-gewichteten MRT-Bildern von einem Mitarbeiter (A.K.), der bezüglich der Gruppenzugehörigkeit (Patienten vs. Kontrollen) verblindet war, eingezeichnet. Die Einzeichnung der hippocampalen Grenzlinie erfolgte ausschließlich in fortlaufenden koronaren Schnittbildern von *anterior* nach *posterior*, wobei die sagittalen und transversalen Ansichten gleichzeitig in den Abgrenzungsprozess einbezogen wurden, um eine anatomisch korrekte Einzeichnung zu erleichtern. Nachdem in allen koronaren Schnittbildern der Hippocampus

eingezeichnet war, konnte das hippocampale Volumen als Summe der einzelnen Flächeninhalte multipliziert mit der Dicke der koronaren MRT-Schichten errechnet werden. Alle methodischen Einzelheiten zum Segmentierungsprotokoll sowie -verfahren sind in der Originalarbeit dargestellt (Klär et al., 2010).

3.7 Statistik

Alle P-Werte waren zweiseitig, die statistische Signifikanz wurde auf $\alpha = 0,05$ gesetzt. Für alle Berechnungen wurde die jeweils aktuelle Version des Statistikprogramms SPSS/PASW von SPSS Inc.[®] benutzt. Eine multiple lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um den Einfluss von Alter, Blutdruck und AI auf die hippocampale Glutamatkonzentration sowie die Gedächtnisfunktion zu prüfen. Der Effekt des Genotyps auf die untersuchten zerebralen Metaboliten wurde mittels MANOVA untersucht. Ebenfalls mit multiplen Varianzanalysen wurde der Effekt der Gruppenzugehörigkeit auf die hippocampalen Volumina, sowie auf die hippocampale NAA- bzw. Glutamatkonzentration analysiert. Mittels partieller Korrelation wurden dann hippocampale Volumina und NAA-Konzentrationen unter Auspartialisierung des Einflusses von Alter, Gesamthirnvolumen und Geschlecht miteinander korreliert. Für die exakte Beschreibung aller angewandten Testmethoden soll auf die Originalarbeiten verwiesen werden.

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der kombinierten ¹H-MRS und MRT Studie

Die Volumetrie zeigt, dass schizophrene Patienten im Vergleich zu den gesunden Kontrollprobanden eine deutliche hippocampale Volumenreduktion sowohl des rechten als auch des linken Hippocampus (links: 9,9%; rechts: 8,5%) aufwiesen. Die durchgeführten Analysen (MANOVA bzw. Post-hoc ANOVA) zeigten, dass die abhängigen Variablen (rechtes bzw. linkes Hippocampusvolumen) signifikant beeinflusst werden durch den Faktor der Gruppenzugehörigkeit zum gesunden Probandenkollektiv bzw. zur Gruppe der schizophrenen Patienten (für das linke hippocampale Volumen: $F=7,397$; $p=0,008$; für das rechte hippocampale Volumen: $F=11,714$; $p=0,001$). Des Weiteren wiesen die schizophrenen Patienten eine deutlich erniedrigte hippocampale NAA Konzentration im Voxel des linken Hippocampus auf. Die Minderung betrug 5,1%, wenn man das arithmetische Mittel zu Grunde legt, bzw. 6,3% beim Median. Die ANOVA zeigte, dass die NAA-Konzentration signifikant beeinflusst wird durch die Gruppenzugehörigkeit ($F=9,842$; $p=0,003$). Unter Ausschaltung des Einflusses des Alters, des Geschlechtes sowie des Gesamthirnvolumens zeigte die partielle Korrelation eine signifikant negative Assoziation zwischen der hippocampalen NAA-Konzentration und dem Volumen des linken Hippocampus in der Gruppe der schizophrenen Patienten ($r=-0,557$; $p=0,003$), in der

Gruppe der Kontrollprobanden fand sich eine solche Korrelation nicht. Ebenso zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen der Glutamatkonzentration und dem hippocampalen Volumen der Patienten bzw. der Gesunden ($r=-0,356$; $p=0,074$ bzw. $r=-0,129$; $p=0,426$). Es konnte keine Assoziation zwischen den Parametern der Bildgebung und den klinischen Parameter (PANSS) gefunden werden.

4.2 Korrelationen zwischen Ergebnissen der Genotypisierung und zerebraler Metabolitenkonzentrationen

Die Genotypfrequenz für Val/Val ($n=62$) und Val/Met ($n=20$) betrug 75.6% und 24.4%; der Met/Met Genotype wurde in dieser Stichprobe nicht nachgewiesen. Die Allelfrequenz betrug 87.8% für Val und 12.2 % für Met. Die MANOVA zeigte, dass die abhängigen Variablen (NAA, tCho und tCr) im ACC beeinflusst werden im Sinne eines statistischen Trends durch den Faktor Genotyp (Val/Val, Val/Met; $F=2,609$; $df=3$; $p=0,057$). Die Post-hoc ANOVA zeigte, dass die abhängige Variable NAA im ACC signifikant vom Genotyp ($F=5,216$; $df=1$; $p=0,025$) beeinflusst wird, während dies für tCr ($F=0,484$; $df=1$; $p=0,489$) bzw. tCh ($F=2,171$; $df=1$; $p=0,145$) nicht beobachtet werden konnte. Individuen mit dem Val/Met Genotyp zeigten signifikant höhere NAA-Konzentrationen im ACC ($F=5,216$; $p=0,025$), als die Individuen mit dem Val/Val Genotyp. Die zweite MANOVA zeigte, dass die abhängigen Variablen (NAA, tCho und tCr) im Hippocampus signifikant durch den Genotyp beeinflusst werden (Val/Val, Val/Met; $F=3,140$, $df=3$; $p=0,030$). In der Post-hoc ANOVA zeigte sich ausschließlich die hippocampale tCr-Konzentration signifikant durch den Faktor Genotyp beeinflusst ($F=4,913$; $df=1$; $p=0,030$). Individuen mit dem Val/Met Genotyp zeigen geringere hippocampale tCr-Konzentrationen als die Val/Val-Träger. Im Anschluss der beschriebenen Post-hoc Analysen mit absoluten Metabolitenkonzentrationen wurden dieselben Analysen mit den Indices NAA/tCr und tCho/tCr durchgeführt; näheres hierzu in der Originalpublikation.

4.3 Der Einfluss somatischer Faktoren auf zerebrale Metabolitenkonzentrationen bzw. auf kognitive Parameter

Der MAP zeigt altersbereinigt eine signifikante negative Korrelation mit der hippocampalen Glutamatkonzentration ($r=-0,655$; $p=0,011$), ohne dass eine solche Korrelation zur Glutamatkonzentration im ACC nachzuweisen war. Weder im Voxel des Hippokampus noch im Voxel des ACC ließ sich ein signifikanter Einfluss des MAP auf die NAA-Konzentrationen nachweisen. Ein signifikanter Einfluss des AI_{75} wurde weder auf die hippocampale Glutamatkonzentration noch auf die Punktwerte der kognitiven Testung (RBMT- bzw. AVLT-Score) gefunden. Es konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen dem MAP und dem

AVLT-Score ($r = -0,558$; $p = 0,025$) sowie dem RBMT-Score ($r = -0,555$; $p = 0,026$) gezeigt werden.

5 DISKUSSION

5.1 Der Zusammenhang zwischen hippocampaler Volumenminderung und Verlust an hippocampalem NAA bei der Pathogenese der Schizophrenie

Zur Überprüfung der Hypothese eines Zusammenhanges zwischen den im Hippocampus bei Schizophrenen beschriebenen neurometabolischen und strukturellen Veränderungen, wurde bei allen Studienteilnehmern sowohl mit Hilfe der $^1\text{H-MRS}$ die hippocampale NAA-Konzentration als auch das hippocampale Volumen bestimmt. Sowohl die in der Literatur beschriebene, im Vergleich zu gesunden Probanden, signifikante Volumenminderung als auch die signifikante NAA Verminderung im Hippocampus bei schizophrenen Patienten konnte in unserer Studie gezeigt werden und ist im Einklang mit der weitaus größten Anzahl an Studien in diesem Feld. Hieraus lässt sich folgern, dass die Schizophrenie eine psychiatrische Erkrankung ist, bei der pathogenetisch zugleich neurometabolische als auch strukturelle hippocampale Veränderungen bestehen. Darüber hinaus zeigt sich zwischen der hippocampalen NAA-Konzentration und dem Volumen eine negative Korrelation, womit zum ersten Mal die Hypothese einer Assoziation zwischen neurometabolischen und strukturellen Veränderungen gezeigt werden konnte. Dieses auf den ersten Blick kontraintuitiv erscheinende Ergebnis einer negativen Korrelation zwischen NAA-Konzentration und Volumen ist durchaus mit dem aktuellen Verständnis der Pathogenese der Schizophrenie vereinbar, wenn man die Implikationen der sogenannten Glutamat-Hypothese näher betrachtet. Auf Grund klinischer Beobachtungen, dass durch eine NMDA-Rezeptorblockade (z.B. durch Ketamin) bei gesunden Individuen sowohl paranoid-halluzinatorische Symptome als auch solche Symptome hervorgerufen werden, die denen der schizophrenen Negativsymptomatik sehr ähnlich sind, gehen die Begründer der Glutamat-Hypothese davon aus, dass der Ätiologie der Schizophrenie eine NMDA-Rezeptorhypofunktion zu Grunde liegt. In Folge wird bei schizophrenen Patienten, um dieser NMDA-Rezeptorhypofunktion entgegenzuwirken, Glutamat hochreguliert; dies führt auf Grund der nachgewiesenen Neurotoxizität von erhöhten Glutamatkonzentrationen zu einer Neurodegeneration (Konradi and Heckers, 2003), die sich u.a. als hippocampale Volumenreduktion manifestiert. Diese Argumentation wird auch dadurch gestützt, dass sich in der Gruppe der schizophrenen Studienteilnehmer eine negative Korrelation (Trend) zwischen hippocampaler Glutamat-Konzentration und Volumen nachweisen ließ; eine hohe Glutamatkonzentration hat einen Einfluss auf morphologische Veränderungen des Hippocampus.

Ein alternativer Erklärungsversuch für die negative Korrelation zwischen hippocampaler NAA-Konzentration und Volumen gründet auf der Beobachtung, dass in *post-mortem* Studien nachgewiesen wurde, dass die hippocampale Volumenreduktion in keinsten Weise einem Nervenzelluntergang, sondern einer Verminderung des Neuropils geschuldet ist (Hurlemann et al., 2005). Daraus folgt, dass die relative Anzahl an Nervenzellen im Voxel des Hippocampus bei Schizophrenen höher sein muss als bei den Kontrollprobanden. Wenn man NAA als ein Marker für die Anzahl von Nervenzellen versteht, dann ist es plausibel, dass die hippocampale NAA-Konzentration bei Schizophrenen erhöht ist. Beide Erklärungsversuche schließen sich nicht gegenseitig aus, sondern können sich ergänzen. Auch bei Verwandten ersten Grades konnten hippocampale NAA und Volumenveränderungen nachgewiesen werden, ebenso sind diese Veränderung auch bereits sehr früh im Verlauf der Krankheit nachweisbar, was gut mit der fehlenden Assoziation zwischen den Parametern der Bildgebung und den klinischen Parameter (PANSS) vereinbar ist. In der Literatur sind nur sehr wenige Studien beschrieben, die simultane ¹H-MRS und MRT Messungen bei schizophrenen Patienten durchgeführt haben. Abweichend zu unseren Ergebnissen konnten diese Studien keine Assoziation zwischen strukturalen und neurochemischen Veränderungen im Hippocampus nachweisen (Bertolino et al., 1998; Bertolino et al., 1996; Deicken et al., 1999; Fannon et al., 2003). Die Diskrepanz zwischen diesen Studien und unseren Ergebnissen könnte darin begründet sein, dass wir im Vergleich zu den älteren Studien deutlich verbesserte Messmethoden angewandt haben und unsere untersuchte Stichprobe größer ist als die Mehrzahl jener Studien. Für die detaillierte Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studien sowie die eigene Methodenkritik verweisen wir auf die Originalarbeit (Klär et al., 2010). Die Zusammenschau aller Ergebnisse lässt den Schluss zu, dass der Pathogenese der Schizophrenie sowohl eine strukturelle als auch neurochemische Dysfunktion zu Grunde liegt. Die negative Korrelation zwischen der hippocampalen NAA-Konzentration und dem Volumen des Hippocampus verweist auf das Vorhandensein eines pathogenetischen Mechanismus, der seinerseits sowohl Veränderungen der hippocampalen Hirnstruktur als auch neurometabolische Veränderungen hervorruft.

5.2 Der Einfluss des BDNF-Polymorphismus Val66Met auf die Glutamat- sowie NAA-Konzentrationen im Hippocampus sowie im ACC

Ausgehend von der Frage, ob der BDNF Genotyp einen Einfluss auf die neuronale Integrität hat, sodass bei Trägern des Met-Allels veränderte NAA Konzentrationen nachzuweisen wären, wurden mittels ¹H-MRS bei 82 gesunden, bezüglich des BDNF Gens genotypisierten Probanden die absoluten NAA-Konzentrationen im ACC und Hippocampus, den Hirnregionen mit äußerst

hohen BDNF- Gewebskonzentration, gemessen. Die bei den Trägern des BDNF 66Met Allels gefundene signifikante erhöhte NAA-Konzentration im ACC interpretieren wir als einen Hinweis darauf, dass diese Personen eine besonders ausgeprägte neuronale Integrität im ACC auszeichnet, was sie weniger vulnerabel für psychiatrische Krankheiten machen könnte. Diese Hypothese fügt sich gut in die neusten Forschungsergebnisse ein, wonach einerseits Träger der BDNF-Met-Variante ein erniedrigtes Erkrankungsrisiko hinsichtlich Schizophrenie und Bipolaren Störung haben (Lang et al., 2007b) und andererseits schizophrene Patienten eine deutlich erniedrigte NAA-Konzentration im ACC aufweisen (Steen et al., 2005), der eine Schlüsselrolle bei der Integration sensorischer sowie kognitiver Informationen mit emotionalen Prozessen im Hinblick auf zielgerichtetes Handeln spielt. Aktuelle Studien zeigen, dass die Met-BDNF-Variante mit einer beeinträchtigten aktivitätsabhängigen BDNF Regulation im Hippocampus assoziiert ist, was sich in den Studien auch in einer verminderten Hippocampus-assoziierten kognitiven Leistungsfähigkeit der Probanden niederschlug (Egan et al., 2003). Daher interpretieren wir die bei den Met-Allel-Trägern gefunden erhöhte NAA-Konzentration im ACC sowie die BDNF Erhöhung als körpereigenen Versuch einer kompensatorischen Gegenregulation, um der defizitären BDNF Regulation entgegenzuwirken. Beim Vergleich der hippocampalen NAA Konzentration zwischen den Met-Trägern und den homozygoten Val-Allel-Trägern konnte im Gegensatz zu anderen Arbeiten kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Egan et al., 2003; Stern et al., 2008). Als eine Hauptursache vermuten wir methodische Unterschiede, da in diesen Arbeiten keine absoluten Konzentrationen gemessen wurden, sondern von den Verhältniswerten NAA/tCr bzw. NAA/tCh auf die NAA Konzentration geschlossen wurde. Solche Verhältniswerte sind jedoch schwierig zu interpretieren. Des Weiteren zeigen neue Studien, dass sich Frequenzen des Met-Allels der afrikanischen, europäischen und asiatischen Bevölkerung deutlich unterscheiden, was einen direkten Vergleich der Ergebnisse mit anderen Stichproben, bei denen Probanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft eingeschlossen wurden, erschwert. Für die detaillierte Diskussion der Ergebnisse im Vergleich zu anderen Studien sowie die eigene Methodenkritik soll auf die Originalarbeit (Gallinat et al., 2010) verwiesen werden. Unserer Meinung nach schließen sich eine Verminderung der NAA-Konzentration im Hippocampus und die damit verbundene Verminderung der synaptischen Plastizität sowie eine kompensatorische NAA Hochregulierung im ACC, woraus die protektiven Effekte in Bezug auf bestimmte psychiatrische Störungen resultieren, keineswegs aus. Zusammenfassend ziehen wir die Schlussfolgerung, dass der - bei den Träger des BDNF Met-Allels gefundene - NAA-Konzentrationsanstieg ein protektiver Faktor im Hinblick auf die Entstehung einer schizophrenen Erkrankung darstellen könnte.

5.3 Der Einfluss somatischer Faktoren auf die hippocampale Glutamatkonzentration sowie auf die Gedächtnisfunktion

Die Ergebnisse dieser Studie können neue Impulse zum Verständnis der Pathogenese der (vaskulären) Demenz liefern. Das Ergebnis einer signifikanten negativen Korrelation zwischen dem arteriellen Blutdruck und der hippocampalen Glutamatkonzentration zeigt, dass der Blutdruck direkt und unabhängig von arteriosklerotischen Gefäßwandveränderungen an der Entwicklung kognitiver Einschränkungen beteiligt ist. Dies ist mit der klinischen Beobachtung vereinbar, dass viele hypertensive Patienten kognitive Einbußen aufweisen, lange bevor sich in der Bildgebung morphologische Hinweise einer angiopathischen Läsion zeigen. Das Fehlen einer Assoziation zwischen Blutdruck und Glutamat im ACC interpretieren wir dahingehend, dass es sich bei der gefundenen Korrelation zwischen Glutamat und MAP um kein unspezifisches globales Phänomen handelt, sondern selektiv den für die Gedächtnisleistung wichtigen Hippocampus betrifft. Wie erwartet, konnten zwischen den NAA-Konzentrationen (im Hippocampus bzw. im ACC) und dem Blutdruck keine signifikanten Assoziationen gefunden werden. Denn in unserer Studie wurden ausschließlich gesunde Probanden eingeschlossen, so dass keine Verminderung der NAA-Konzentrationen, die einen neuronalen Verlust widerspiegeln würden, zu erwarten war. Die Punktwerte der neuropsychologischen Testungen, die als grober Indikator die Integrität der hippocampalen Gedächtnisleistung widerspiegeln, werden signifikant vom MAP beeinflusst. In der Zusammenschau werten wir diese Ergebnisse dahingehend, dass der negative Einfluss der MAP sowohl auf die kognitive Leistung als auch auf die hippocampale Glutamatkonzentration nicht auf arteriosklerotisch bedingte Gefäßwandveränderungen zurückzuführen sind, insofern die AI₇₅ keinen Einfluss auf diese abhängigen Variablen zeigte. Auch somatische Faktoren wie der Blutdruck haben einen unmittelbaren, direkten Einfluss auf die hippocampale glutamaterge Neurotransmission und in Folge dessen auf die kognitive Leistungsfähigkeit. Dies bedeutet, dass bei der Beurteilung von neurometabolischen Veränderungen im Rahmen der Schizophrenie und anderer psychiatrischer Erkrankungen, somatische Faktoren als Störfaktoren beachtet werden müssen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, C., Bustillo, J., 2006. What have we learned from proton magnetic resonance spectroscopy about schizophrenia? A critical update. *Curr Opin Psychiatry* 19, 135.
- Bertolino, A., Callicott, J.H., Elman, I., Mattay, V.S., Tedeschi, G., Frank, J.A., Breier, A., Weinberger, D.R., 1998. Regionally Specific Neuronal Pathology in Untreated Patients with Schizophrenia: A Proton Magnetic Resonance Spectroscopic Imaging Study. *Biological Psychiatry* 43, 641.
- Bertolino, A., Nawroz, S., Mattay, V.S., Barnett, A.S., Duyn, J.H., Moonen, C.T., Frank, J.A., Tedeschi, G., Weinberger, D.R., 1996. Regionally specific pattern of neurochemical pathology in schizophrenia as assessed by multislice proton magnetic resonance spectroscopic imaging. *Am J Psychiatry* 153, 1554.
- Clark, J.F., Doepke, A., Filosa, J.A., Wardle, R.L., Lu, A., Meeker, T.J., Pyne-Geithman, G.J., 2006. N-acetylaspartate as a reservoir for glutamate. *Med Hypotheses* 67, 506-512.
- Deicken, R.F., Pegues, M., Amend, D., 1999. Reduced hippocampal N-acetylaspartate without volume loss in schizophrenia. *Schizophrenia Research* 37, 217.
- Egan, M.F., Kojima, M., Callicott, J.H., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Bertolino, A., Zaitsev, E., Gold, B., Goldman, D., Dean, M., Lu, B., Weinberger, D.R., 2003. The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112, 257-269.
- Fannon, D., Simmons, A., Tennakoon, L., O'Ceallaigh, S., Sumich, A., Doku, V., Shew, C., Sharma, T., 2003. Selective deficit of hippocampal N-acetylaspartate in antipsychotic-naïve patients with schizophrenia. *Biol Psychiatry* 54, 587-598.
- Gallinat, J., Schubert, F., Bruhl, R., Hellweg, R., Klär, A.A., Kehrer, C., Wirth, C., Sander, T., Lang, U.E., 2010. Met carriers of BDNF Val66Met genotype show increased N-acetylaspartate concentration in the anterior cingulate cortex. *Neuroimage* 49, 767-771.
- Hurlemann, R., Tepest, R., Maier, W., Falkai, P., Vogeley, K., 2005. Intact hippocampal gray matter in schizophrenia as revealed by automatized image analysis postmortem. *Anat Embryol (Berl)* 210, 513-517.

Klär, A.A., Ballmaier, M., Leopold, K., Häke, I., Schaefer, M., Brühl, R., Schubert, F., Gallinat, J., 2010. Interaction of hippocampal volume and N-acetylaspartate concentration deficits in schizophrenia: A combined MRI and 1H-MRS study. *Neuroimage*.

Konradi, C., Heckers, S., 2003. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther* 97, 153-179.

Lang, U.E., Hellweg, R., Sander, T., Gallinat, J., 2009. The Met allele of the BDNF Val66Met polymorphism is associated with increased BDNF serum concentrations. *Mol Psychiatry* 14, 120-122.

Lang, U.E., Hellweg, R., Seifert, F., Schubert, F., Gallinat, J., 2007a. Correlation between serum brain-derived neurotrophic factor level and an in vivo marker of cortical integrity. *Biol Psychiatry* 62, 530-535.

Lang, U.E., Puls, I., Muller, D.J., Strutz-Seebohm, N., Gallinat, J., 2007b. Molecular mechanisms of schizophrenia. *Cell Physiol Biochem* 20, 687-702.

Narr, K.L., Thompson, P.M., Szeszko, P., Robinson, D., Jang, S., Woods, R.P., Kim, S., Hayashi, K.M., Asuncion, D., Toga, A.W., Bilder, R.M., 2004. Regional specificity of hippocampal volume reductions in first-episode schizophrenia. *Neuroimage* 21, 1563.

Schubert, F., Gallinat, J., Seifert, F., Rinneberg, H., 2004. Glutamate concentrations in human brain using single voxel proton magnetic resonance spectroscopy at 3 Tesla. *Neuroimage* 21, 1762.

Steen, R.G., Hamer, R.M., Lieberman, J.A., 2005. Measurement of brain metabolites by 1H magnetic resonance spectroscopy in patients with schizophrenia: a systematic review and meta-analysis. *Neuropsychopharmacology* 30, 1949-1962.

Stern, A.J., Savostyanova, A.A., Goldman, A., Barnett, A.S., van der Veen, J.W., Callicott, J.H., Mattay, V.S., Weinberger, D.R., Marenco, S., 2008. Impact of the brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism on levels of hippocampal N-acetyl-aspartate assessed by magnetic resonance spectroscopic imaging at 3 Tesla. *Biol Psychiatry* 64, 856-862.

Westhoff, T.H., Schubert, F., Wirth, C., Joppke, M., Klär, A.A., Zidek, W., Gallinat, J., 2010. The impact of blood pressure on hippocampal glutamate and mnemonic function. *J Hum Hypertens*.

II ANTEILSERKLÄRUNG

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

1. **Klär** A. A., Ballmaier M., Leopold K., Hake I., Schaefer M., Bruhl R., Schubert F., Gallinat J.: Interaction of hippocampal volume and N-acetylaspartate concentration deficits in schizophrenia: A combined MRI and (1)H-MRS study. *Neuroimage* (2010; in press).

Beteiligung: ca. 80%

Beiträge im Einzelnen: Selbständige Durchführung der manuellen MRT-volumetrischen Vermessung, Erstellung des Manuskriptes inkl. Diskussion und Interpretation der Daten auf Basis eigener volumetrischen Daten und selbstständiger Literatursuche, Anfertigung graphischer Darstellungen und Tabellen. Diskussionsleitung mit Koautoren und Durchführung von Korrekturarbeiten, Durchführung des Publikationsprozesses inkl. Korrespondenz mit Herausgeber des Journals und Durchführung von Korrekturen.

2. Gallinat J., Schubert F., Bruhl R., Hellweg R., **Klär** A. A., Kehrer C., Wirth C., Sander T., Lang U. E.: Met carriers of BDNF Val66Met genotype show increased N-acetylaspartate concentration in the anterior cingulate cortex. *Neuroimage* (2010); 49:767-771.

Beteiligung: ca. 15%

Beiträge im Einzelnen: Mitarbeit an der gemeinschaftlichen Publikation im Rahmen des Forschungsnetzwerks durch Bereitstellung von Teilergebnissen wissenschaftlicher Daten, Übernahme kleinerer Textarbeiten, sowie Beteiligung an der Diskussion der Ergebnisse.

3. Westhoff T.H., Schubert F., Wirth C., Joppke M., **Klär** A. A., Zidek W., Gallinat J.: The impact of blood pressure on hippocampal glutamate and mnemonic function. *J Hum Hypertens* (2010).

Beteiligung: ca. 15%

Beiträge im Einzelnen: Mitarbeit an der gemeinschaftlichen Publikation im Rahmen des Forschungsnetzwerks durch Bereitstellung von Teilergebnissen wissenschaftlicher Daten, Beteiligung an der Diskussion der Ergebnisse.

III DRUCKEXEMPLARE DER AUSGEWÄHLTEN PUBLIKATIONEN

Die Publikationen können aus Gründen des Copyright in der elektronischen Arbeit nicht veröffentlicht werden.

1. Klär A. A., Ballmaier M., Leopold K., Hake I., Schaefer M., Bruhl R., Schubert F., Gallinat J.: Interaction of hippocampal volume and N-acetylaspartate concentration deficits in schizophrenia: A combined MRI and (1)H-MRS study. Neuroimage (2010; in press).

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20541020>

2. Gallinat J., Schubert F., Bruhl R., Hellweg R., Klär A. A., Kehrer C., Wirth C., Sander T., Lang U. E.: Met carriers of BDNF Val66Met genotype show increased N-acetylaspartate concentration in the anterior cingulate cortex. Neuroimage (2010); 49:767-771.

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19683059>

3. Westhoff T.H., Schubert F., Wirth C., Joppke M., Klär A. A., Zidek W., Gallinat J.: The impact of blood pressure on hippocampal glutamate and mnemonic function. Journal of Human Hypertension (2010).

→ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463749>

Originalarbeiten S. 16 - 34

IV LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

V KOMPLETE PUBLIKATIONSLISTE

1. Klär A. A., Ballmaier M., Leopold K., Hake I., Schaefer M., Bruhl R., Schubert F., Gallinat J.: Interaction of hippocampal volume and N-acetylaspartate concentration deficits in schizophrenia: A combined MRI and (1)H-MRS study. *Neuroimage* (2010; in press).
2. Gallinat J., Schubert F., Bruhl R., Hellweg R., Klär A. A., Kehrer C., Wirth C., Sander T., Lang U. E.: Met carriers of BDNF Val66Met genotype show increased N-acetylaspartate concentration in the anterior cingulate cortex. *Neuroimage* (2010); 49:767-771.
3. Westhoff T.H., Schubert F., Wirth C., Joppke M., Klär A. A., Zidek W., Gallinat J.: The impact of blood pressure on hippocampal glutamate and mnesic function. *Journal of Human Hypertension* (2010).

VI SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

„Ich, Andreas A. Klär, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema *"Die Bedeutung von N-Acetyl-Aspartat in der Pathogenese der Schizophrenie - Magnetresonanztomographische in-vivo-Untersuchungen zur Quantifizierung zerebraler neurometabolischer Veränderungen "* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, 17.7.2010

Andreas Arthur Klär

VII DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Jürgen Gallinat, unter dessen Betreuung und Anleitung diese Arbeit entstand, für die Überlassung des Themas, sowie die angenehme Zusammenarbeit in der Durchführung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau PD Dr. Dr. Martina Ballmaier und Herrn Dr. Florian Schubert herzlich für ihre hilfreiche Unterstützung bedanken.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.