

**Auswirkungen von interindividueller Variabilität  
dopaminergener Neuromodulation auf kortikale und  
subkortikale Mechanismen bei menschlichen  
Lernprozessen**

**Der Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dr. med. Björn Hendrik Schott

geb. am 29. 10. 1975 in Scherzingen / Schweiz

Gutachter: Prof. Dr. Eckart Gundelfinger

Prof. Dr. Christiane Thiel

eingereicht am: 27. 10. 2007

verteidigt am: 6. 3. 2008

## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinen Betreuern PD Dr. Constanze Seidenbecher, Prof. Dr. Eckart Gundelfinger, Prof. Dr. Hans-Jochen Heinze und Prof. Dr. Emrah Düzel – ohne sie hätte ich nicht die Möglichkeit gehabt, eine solche Methoden-übergreifende Arbeit durchzuführen. Bedanken möchte ich mich bei Constanze auch ganz besonders für die herzliche Aufnahme in die Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie des IfN und für die Einführung in das molekularbiologische Arbeiten. Emrah gilt mein Dank für die Einführung in die kognitiven Neurowissenschaften und die funktionelle Bildgebung und die nun schon viele Jahre dauernde großartige Zusammenarbeit. Bei Prof. Dr. Hans-Jochen Heinze möchte ich mich für die jahrelange Förderung bedanken.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Neurologie II und der Abteilung Neurochemie und Molekularbiologie des IfN für ihre Hilfe bei vielen kleinen und größeren Problemen bei der Durchführung und Auswertung der Experimente. Mein besonderer Dank gilt Wilko Altrock, Nico Bunzeck, Daniela Fenker, Renato Frischknecht, Grazyna Debska-Vielhaber, Max Hopf, Karl-Heinz Smalla, Ariel Schoenfeld, Michael Scholz, Hartmut Schütze, und Bianca Wittmann. Bei PD Dr. Ludwig Niehaus bedanke ich mich für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der Parkinson-Studie. Bei meinen Kollegen und Freunden Sebastian Guderian und Alan Richardson-Klavehn bedanke ich mich für viele wertvolle Diskussionen in den letzten Jahren.

Gusalija Behnisch und Maria Michelmann danke ich für die wertvolle technische Hilfe im Labor. Ebenso bedanke ich mich auch bei Prof. Dr. Hans-Gert Bernstein und seinen Mitarbeitern für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Immunhistochemie.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und Freunden für ihre Unterstützung weit über die Arbeit hinaus.

Whosoever seeks the truth will not proceed by studying the writings of his predecessors and by simply accepting his own good opinion of them. Rather, the truth-seeker will mistrust his established opinion. He will rely solely on his understanding of the texts by following the criteria of logic rather than the statements of authors who are, after all, human, with the errors and faults with this naturally involves. Whosoever studies works of science must, if he wants to find the truth, transform himself into a critic of everything he reads. He must examine texts and explanations with the greatest precision and question them from all angles and aspects. But he must also observe himself with a critical eye in this process, so that his judgement is neither too strict nor too lax. If he follows this path, the truths will reveal themselves to him and the possible inadequacies and uncertainties in the works of his predecessors will come to the fore.

(Ibn al-Haitham, d. ca. 1041 C.E.)

*gefunden in Kuala Lumpur, Malaysia, Februar 2007*

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	7
Summary.....	8
Abkürzungen.....	9
Thema und Aufbau der Arbeit .....	10
<b>1. EINFÜHRUNG.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Das dopaminerge System.....</b>	<b>11</b>
1.1.1. Funktionelle Anatomie des dopaminergen Systems.....	11
1.1.1.1. Das nigrostriatale Dopamin-System.....	11
1.1.1.2. Das mesolimbische und mesokortikale Dopamin-System.....	13
1.1.2. Pharmakologie dopaminergener Neuromodulation.....	13
1.1.2.1. Dopamin-Rezeptoren und ihre Signalkaskaden.....	14
1.1.2.2. Terminierung des Dopamin-Signals im Striatum: Der Dopamin-Transporter.....	15
1.1.2.3. COMT und die Terminierung des Dopamin-Signals im PFC.....	16
<b>1.2. Lern- und Gedächtnisprozesse und ihre dopaminerge Neuromodulation.....</b>	<b>17</b>
1.2.1. Gedächtnismodelle .....	17
1.2.2. Konditionierung und Belohnungs-abhängiges Lernen .....	17
1.2.2.1. Tierexperimentelle Befunde zur Konditionierung.....	18
1.2.2.2. Befunde aus der funktionellen Bildgebung beim Menschen .....	18
1.2.3. Deklaratives Gedächtnis und seine dopaminerge Modulation .....	19
1.2.3.1. Das episodische Gedächtnis .....	19
1.2.3.2. Die besondere Rolle des Hippocampus beim episodischen Gedächtnis.....	20
1.2.3.3. Dopaminerge Modulation Hippocampus-abhängiger Gedächtnisprozesse .....	22
1.2.3.4. Die Hippocampus-VTA-Schleife .....	23
<b>1.3. Interindividuelle Variabilität im dopaminergen System .....</b>	<b>25</b>
1.3.1. Störungen der dopaminergen Neuromodulation.....	25
1.3.1.1. Altersveränderungen dopaminergener Neuromodulation.....	25
1.3.1.2. Kognitive und psychiatrische Störungen bei der Parkinsonschen Krankheit.....	25
1.3.2. Genetische Variabilität des dopaminergen Systems.....	27
1.3.2.1. Genetische Polymorphismen .....	27
1.3.2.3. Kopplungsungleichgewicht .....	27
1.3.2.4. Auswirkung genetischer Polymorphismen auf kognitive Leistungen.....	28
1.3.2.5. Der Dopamin-Transporter-VNTR-Polymorphismus .....	29
1.3.2.6. Der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus.....	29
1.3.2.6. Der D2-Dopamin-Rezeptor-TaqIA-Polymorphismus.....	30
<b>1.4. Fragestellungen und experimentelle Ansätze .....</b>	<b>30</b>
1.4.1. Genetik des dopaminergen Systems und episodisches Gedächtnis .....	31
1.4.1.1. Anatomisch spezifische Einflüsse genetischer Polymorphismen von DAT1 und COMT.....	31
1.4.1.2. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus .....	32
1.4.2. Auswirkung von Alter und M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen .....	32
1.4.3. Zellbiologische Fragestellungen zur Dopamin-Inaktivierung .....	33
1.4.3.1. Wird der Dopamin-Transporter im humanen Hippocampus exprimiert? .....	33
1.4.3.2. Ist MB-COMT in Neuronen intra-oder extrazellulär orientiert?.....	33
<b>2. METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1. MRT-Untersuchungen.....</b>	<b>35</b>
2.1.1. fMRI-Experiment 1: Genetische Variabilität im Dopamin-System und episodische Gedächtnisbildung beim Menschen .....	35
2.1.1.1. Probanden.....	35

2.1.1.2. Paradigma .....	35
2.1.1.3. Bildakquisition .....	36
2.1.1.4. Bildvorverarbeitung und Datenanalyse .....	37
2.1.1.5. Analyse der funktionellen Konnektivität .....	39
2.1.2. fMRI-Experiment 2: Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson .....	41
2.1.2.1. Probanden .....	41
2.1.2.2. Paradigma .....	41
2.1.2.3. Bildakquisition .....	43
2.1.2.4. Bildvorverarbeitung und Datenanalyse .....	43
2.1.2.5. Analyse der funktionellen Konnektivität .....	44
2.1.3. Akquisition und Bildverarbeitung anatomischer MRT-Bilder .....	45
2.1.3.1. Magnetisierungs-Transfer-Bildgebung .....	45
2.1.3.2. T1-gewichtete Bildgebung und Voxel-basierte Morphometrie (VBM) .....	45
<b>2.2. Untersuchung genetischer Polymorphismen .....</b>	<b>47</b>
2.2.1. DAT1-VNTR-Polymorphismus .....	47
2.2.2. COMT-Val108/158Met-Polymorphismus .....	48
2.2.3. DRD2-TaqIA-Polymorphismus .....	48
2.2.4. Weitere Genotypisierungen .....	49
<b>2.3. Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen .....</b>	<b>49</b>
2.3.1. Immunhistochemie und Western Blots des humanen Hippocampus .....	49
2.3.1.1. Humanes post mortem-Hirnmaterial .....	49
2.3.1.2. Immunhistochemische Verfahren .....	50
2.3.1.3. Protein-Präparation und Western-Blotting .....	50
2.3.2. Immunocytochemische Untersuchungen von COMT-GFP-Fusionskonstrukten .....	51
2.3.2.1. Generierung von COMT-GFP-Fusionskonstrukten .....	51
2.3.2.2. Proteinbiochemische Überprüfung der COMT-GFP-Fusionskonstrukte .....	52
2.3.2.3. Kultivierung von COS7-Zellen .....	53
2.3.2.4. Immunocytochemische und biochemische Untersuchungen in COS7-Zellen .....	53
2.3.2.5. Neuronale Primärkultur .....	53
2.3.2.6. Immunocytochemische Untersuchungen in neuronalen Zellen .....	54
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>3.1. Verteilung genetischer Polymorphismen .....</b>	<b>55</b>
<b>3.2. fMRI-Experiment 1: Genetische Variabilität im Dopamin-System und episodische Gedächtnisbildung beim Menschen .....</b>	<b>56</b>
3.2.1. Verhaltensdaten .....	56
3.2.2. fMRI-Daten .....	58
3.2.2.1. fMRI-Korrelate der Verarbeitungstiefe (LOP-Effekt) .....	58
3.2.2.2. fMRI-Korrelate erfolgreicher Enkodierung (DM-Effekt) .....	58
3.2.2.3. Auswirkungen des DAT1 VNTR auf DM-Effekt und LOP-Effekt .....	59
3.2.2.4. Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Genotyps auf DM-Effekt und LOP-Effekt .....	62
3.2.2.5. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf DM-Effekt und LOP-Effekt .....	65
3.2.2.6. Polymorphismen im Dopamin-System und fronto-hippocampale Konnektivität .....	66
<b>3.3. fMRI-Experiment 2: Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson .....</b>	<b>69</b>
3.3.1. Verhaltensdaten .....	69
3.3.2. fMRI-Daten .....	70
3.3.2.1. Neuronale Korrelate der Belohnungsverarbeitung bei jungen Probanden .....	70
3.3.2.2. Belohnungserwartung und Feedback bei älteren Probanden und Parkinson-Patienten .....	71
3.3.2.3. Mesolimbische funktionelle Konnektivität im Alter und bei M. Parkinson .....	75
3.3.3. Altersbedingte neuromorphologische Veränderungen .....	77
<b>3.4. Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen .....</b>	<b>79</b>
3.4.1. Dopamin-Transporter-Expression im humanen Hippocampus .....	79
3.4.1.1. Immunhistochemie .....	79
3.4.1.2. Western Blot .....	80
3.4.2. Zelluläre Verteilung und Membranorientierung membranständiger COMT .....	81

3.4.2.1. Expression der COMT-GFP-Fusionskonstrukte .....	81
3.4.2.2. Immuncytochemie in COS7-Zellen .....	82
3.4.2.2. Immuncytochemie in neuronalen Zellen .....	83
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1. Dopaminerge Einflüsse auf Hippocampus-abhängige Gedächtnisprozesse.....</b>	<b>85</b>
4.1.1. Die Rolle des dopaminergen Mittelhirns bei episodischer Enkodierung.....	85
4.1.1.1. Co-Aktivierung von Mittelhirn und Hippocampus .....	85
4.1.1.2. Auswirkungen des DAT1-VNTR auf die Mittelhirnaktivierung .....	88
4.1.1.3. Dopamin-Transporter-Expression im humanen Hippocampus.....	90
4.1.3. Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus .....	91
4.1.3.1. COMT und präfrontale Verarbeitungseffizienz .....	91
4.1.3.2. Aktivierungsunterschiede in frühen visuellen Arealen .....	93
4.1.3.3. Intrazelluläre Membranorientierung der COMT .....	94
4.1.4. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus.....	95
4.1.5. Genetisch bedingte Aktivierungsunterschiede bei gleicher Performance.....	98
4.1.5.1. Statistische Limitierungen des Genetic Imaging .....	98
<b>4.2. Auswirkung von Alter und M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen .....</b>	<b>99</b>
4.2.1. Störungen der Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson .....	100
4.2.2. Störung der mesolimbischen funktionellen Konnektivität bei M. Parkinson .....	102
4.2.3. Klinische Implikationen .....	103
<b>4.3. Schlussbetrachtungen und Ausblick.....</b>	<b>104</b>
4.3.1. Bedeutung für das Konzept der Hippocampus-VTA-Schleife .....	104
4.3.2. In vivo-Bildgebung von Transmittersystemen beim Menschen .....	105
4.3.3. Klinische Bedeutung .....	105
<b>5. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>107</b>
<b>6. ANHANG.....</b>	<b>121</b>
<b>6.1. Vorstudie zu fMRI-Experiment 1.....</b>	<b>121</b>
6.1.1. Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns durch Stimulus-Neuheit.....	121
6.1.1.1. Methoden.....	121
6.1.1.2. Ergebnisse.....	122
6.1.2. Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns bei episodischer Gedächtnisbildung .....	123
6.1.2.1. Methoden.....	123
6.1.2.2. Ergebnisse.....	124
<b>6.2. Schriftliche Probanden-Instruktionen für fMRI-Experiment 2 .....</b>	<b>125</b>
<b>6.3. Weitere Erläuterungen zu den verwendeten Methoden .....</b>	<b>126</b>
6.3.1. Formeln .....	126
6.3.2. Lösungen und Medien .....	126
6.3.2.1. Lösungen und Puffer .....	126
6.3.2.2. Medien.....	127
6.3.3. Primer und Annealing-Teperaturen .....	127
6.3.3.1. Zusätzliche Genotypisierungen .....	127
6.3.3.2. Klonierung und Mutagenese von COMT-GFP-Fusionsproteinen .....	127
6.3.4. Ausführliche Protokolle für Molekularbiologie und Proteinbiochemie .....	128
6.3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese .....	128
6.3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	128
6.3.4.4. Western Blots .....	129
6.3.4.5. Diagnostische Präparation von DNA-Plasmiden aus Bakterien .....	129
<b>6.4. Lebenslauf und Publikationsliste.....</b>	<b>130</b>

## **Zusammenfassung**

Dopamin spielt eine wichtige Rolle bei einer Reihe unterschiedlicher Lern- und Gedächtnisprozesse, wie etwa beim Stimulus-Belohnungs-Assoziationslernen, aber auch beim Hippocampus-abhängigen Langzeitgedächtnis. Im dopaminergen System des Menschen findet sich eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität, die sowohl durch genetische Unterschiede, als auch durch physiologische (z. B. Altern) und pathologische Veränderungen (etwa bei M. Parkinson oder Schizophrenie) bedingt sein kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie sich solche interindividuellen Unterschiede in der dopaminergen Neuromodulation auf limbische Lern- und Gedächtnisprozesse des Menschen auswirken, wobei zum einen auf das Hippocampus-abhängige episodische Gedächtnis zum anderen das Belohnungs-abhängige assoziative Lernen im ventralen Striatum eingegangen wurde.

Mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie (functional magnetic resonance imaging, fMRI) wurde im ersten Experiment untersucht, wie sich genetische Variationen im Dopamin-Transporter (DAT1), im Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT), und im Dopamin-Rezeptor D2 (DRD2) auf kortikale und subkortikale fMRI-Aktivierungsmuster beim erfolgreichen Hippocampus-abhängigen Lernen von Wörtern auswirken. Dabei zeigte sich, dass eine genetische Variation, die die DAT1-Expression beeinflusst, mit veränderter Aktivität des dopaminergen Mittelhirns selbst assoziiert ist, während ein COMT-Polymorphismus vor allem die Aktivität des präfrontalen Kortex (PFC) und dessen funktionelle Kopplung mit dem Hippocampus beeinflusst. Eine genetische Variation des DRD2 ist mit Veränderungen der Aktivität sowohl im Mittelhirn als auch im PFC assoziiert. Zur weiteren Aufklärung der Rolle von DAT1 und COMT bei der synaptischen Inaktivierung von Dopamin wurden molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass DAT1 im Hippocampus selbst exprimiert wird, vor allem in der CA3-Region. Außerdem wurde nachgewiesen, dass membranständige COMT in Neuronen intrazellulär orientiert ist, Dopamin also postsynaptisch aufgenommen werden muss, um inaktiviert zu werden.

In der zweiten fMRI-Studie wurden die Auswirkungen reduzierter dopaminergischer Aktivität im Alter und bei M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen untersucht. Sowohl gesunde ältere Probanden als auch Parkinson-Patienten zeigten dabei eine stark reduzierte Antwort des ventralen Striatums auf Belohnungs-prädizierende Stimuli, aber normale positive Prädiktionsfehler bei Präsentation des Belohnungs-Feedbacks, was darauf hindeutet, dass die Belohnungsverarbeitung selbst intakt ist, ihre Prädiktion aber gestört. Parkinson-Patienten zeigten überdies eine stark reduzierte funktionelle Konnektivität innerhalb des mesolimbischen Systems, möglicherweise als Folge der massiv reduzierten Dopamin-Freisetzung.

## Summary

Dopamine plays an important role in a variety of human learning and memory processes, including stimulus-reward association learning, but also hippocampus-dependent long term memory. The human dopaminergic system is subject to considerable interindividual variability, which is related to, genetic differences as well as to physiological (e. g. aging) and pathological alterations (as found in Parkinson's disease and schizophrenia). The goal of this thesis was to investigate how such individual differences in dopaminergic neuromodulation affect limbic learning and memory mechanisms in humans. Both hippocampus-dependent long term memory and mesolimbic stimulus-reward association learning were investigated.

In the first experiment the influence of genetic variations in the dopamine system on cortical and subcortical activation patterns during hippocampus-dependent verbal learning was characterized using functional magnetic resonance imaging (fMRI). Specifically, polymorphisms in the dopamine transporter (DAT1), in the dopamine-metabolizing enzyme catechol-O-methyl transferase (COMT) and in the dopamine receptor D2 (DRD2) were investigated. It could be demonstrated that a genetic variation that affects DAT1 expression is associated with altered activity of the dopaminergic midbrain itself, while a COMT polymorphism primarily influences the activity of the prefrontal cortex (PFC) and the functional connectivity between the PFC and the hippocampus. A DRD2 polymorphism is associated with alterations of both midbrain and prefrontal brain activity. To further elucidate the roles of DAT1 and COMT in the synaptic inactivation of dopamine, molecular biological and biochemical investigations were carried out. It could be shown that DAT1 is expressed in the hippocampus itself, especially in the CA3 region. Moreover, the investigations of COMT show that the membrane-bound form of the enzyme is oriented towards the intracellular space in neurons, suggesting the presence of a postsynaptic dopamine uptake mechanism.

In the second fMRI study the impact of reduced dopaminergic activity in aging and in Parkinson's disease on stimulus-reward association learning was investigated. Both healthy elderly participants and Parkinson's patients showed a markedly reduced response of the ventral striatum to reward-predicting stimuli, but normal positive prediction errors to the reward itself, suggesting that reward processing *per se* was intact, but prediction of future rewards was impaired. Additionally, patients also displayed reduced functional connectivity within the mesolimbic system, possibly as a result of the drastically reduced dopamine release.

## **Abkürzungen**

ANOVA: analysis of variance

BOLD: blood-oxygen-level-dependent

Chr: Chromosom

COMT: Catechol-O-Methyltransferase

DAT1: Dopamin-Transporter [1]

DM: difference due to [subsequent] memory

DRD2: Dopamin-Rezeptor D2

EPI: echo-planar image/imaging

fMRI: functional magnetic resonance imaging

FWHM: Halbwertsbreite (full width at half maximum)

GFP: grünes fluoreszierendes Protein

HRF: hemodynamic response function

LD: Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium)

LOP: Verarbeitungstiefe (level of processing)

MTL: medialer Temporallappen

PCR: Polymerasekettenreaktion

PFC: präfrontaler Kortex

PPI: psycho-physiological interaction

RT: Reaktionszeit

SDS-PAGE: sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SN: Substantia nigra

SNP: single nucleotide polymorphism

SPECT: single photon emission tomography

SPGR: spoiled gradient echo

SPM: statistical parametric mapping

TBS: Tris-buffered saline

TE: Echozeit

TH: Tyrosinhydroxylase

TR: Repetitionszeit

VNTR: variable number of tandem repeats

VTA: ventrales tegmentales Areal

## **Thema und Aufbau der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Modulation limbischer Lern- und Gedächtnisprozesse des Menschen durch dopaminerge Neuromodulation, wobei sowohl das Hippocampus-abhängige episodische Gedächtnis, als auch Belohnungs-abhängiges Lernen im ventralen Striatum berücksichtigt wurden. Neuronale Grundlagen von Lern- und Gedächtnisprozessen wurden dabei mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie (functional magnetic resonance imaging, fMRI) untersucht. Um die Bedeutung der Rolle dopaminergere Signalwege näher zu charakterisieren, wurden bei den Studienteilnehmern der ersten Studie genetische Polymorphismen im Dopamin-Transporter (DAT1) und im Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT) sowie im Dopamin-Rezeptor D2 (DRD2) bestimmt und deren Auswirkungen auf fMRI-Aktivierungsmuster charakterisiert. Darüber hinaus erfolgten molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur weiteren Aufklärung der Rolle von DAT1 und COMT bei der synaptischen Inaktivierung von Dopamin. In der zweiten fMRI-Studie wurde dann die Auswirkung einer reduzierten dopaminergen Aktivität im Alter und bei M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen untersucht.

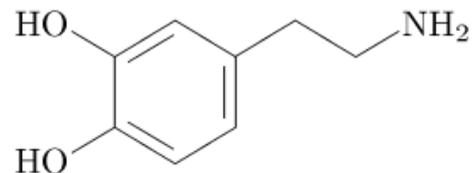
Im ersten Teil wird zunächst ein Überblick über den derzeit aus der Literatur bekannten Stand der Forschung gegeben. Dabei werden zunächst die funktionelle Anatomie und Pharmakologie des dopaminergen Systems sowie Störungen des Dopamin-Stoffwechsels beim Menschen betrachtet, gefolgt von einem Überblick über bisher bekannte Einflüsse dopaminergere Neuromodulation auf Lern- und Gedächtnisprozesse im limbischen System und einer kurzen Einführung in die genetische Variabilität des Dopamin-Systems, einschließlich der Nutzung genetischer Polymorphismen in der funktionellen Bildgebung. Im zweiten und dritten Kapitel folgen die methodische Beschreibung der durchgeführten Untersuchungen und die erzielten Ergebnisse. Im vierten Teil werden die Ergebnisse der Untersuchungen im Zusammenhang mit bisher bekannten Ergebnissen zur Bedeutung von Dopamin bei Gedächtnisprozessen sowie zu den unterschiedlichen Rollen von DAT1 und COMT bei der Dopamin-Inaktivierung diskutiert.

## 1. Einführung

Lernprozesse bei Menschen und Tieren hängen kritisch von der aktivitätsabhängigen Veränderungsfähigkeit des Nervensystems auf molekularer und zellulärer, wie auch auf Netzwerkebene ab. Dieses Phänomen wird in den Neurowissenschaften auch als Plastizität bezeichnet. Obwohl Plastizitätsprozesse grundsätzlich alleine durch den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat vermittelt werden können, wird doch häufig eine Beteiligung anderer, modulatorisch wirkender Transmitter beobachtet. Ein verbreiteter modulatorischer Transmitter im Säugetier-Gehirn ist Dopamin, das an einer großen Zahl verschiedener Prozesse wie Motorkontrolle, Motivations-basiertem Lernen und höheren exekutiven Funktionen der Frontallappen beteiligt ist. Angesichts dieser vielen unterschiedlichen Funktionen von Dopamin ist es wenig überraschend, dass Dysfunktionen der dopaminergen Neurotransmission mit so unterschiedlichen klinischen Erscheinungsbildern wie Morbus Parkinson, Schizophrenie oder Suchterkrankungen einhergehen können. Aber auch beim gesunden Menschen kann die subtile Variabilität des dopaminergen Systems, die sich durch genetische Unterschiede ergibt, kognitive Leistungen beeinflussen.

### 1.1. Das dopaminerge System

Das Catecholamin Dopamin (DA; Abb. 1.1) gehört zu den neuromodulatorischen Transmittern des zentralen Nervensystems. DA wird im Gehirn nahezu ausschließlich von Neuronen des Mittelhirns aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert und an dopaminergen Synapsen wie auch extrasynaptisch ausgeschüttet. Durch zwei Klassen von Dopamin-Rezeptoren kann DA sowohl exzitatorisch wie auch inhibitorisch wirken, wobei die Wirkung in der Regel eine langsame, metabotrop vermittelte ist. Dopamin spielt sowohl bei der Kontrolle motorischer Funktionen als auch im intrinsischen Belohnungssystem des Gehirns und bei Lern- und Gedächtnisprozessen eine wichtige



**Abb. 1.1: Strukturformel von Dopamin.**

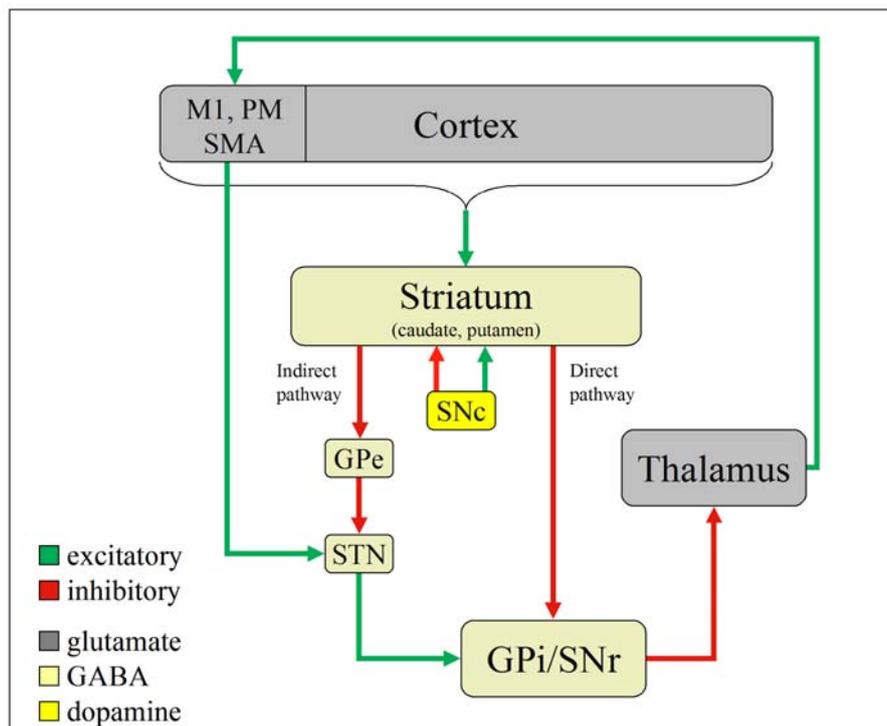
Rolle. Störungen des Dopamin-Systems können sich sowohl durch motorische Symptome (M. Parkinson) als auch durch kognitive und psychopathologische Symptomatik (Sucht, Schizophrenie) äußern. Diese große Bandbreite an unterschiedlichen Wirkungen von Dopamin lässt sich aus der Anatomie und Pharmakologie des dopaminergen Systems verstehen.

#### 1.1.1. Funktionelle Anatomie des dopaminergen Systems

##### 1.1.1.1. Das nigrostriatale Dopamin-System

Die höchste Dichte an Dopamin-Rezeptoren im menschlichen Gehirn findet sich in den Basalganglien, insbesondere im Nucleus caudatus und dem Putamen, die zusammen auch

als Corpus striatum (bzw. Striatum) bezeichnet werden. Hier findet sich eine dichte Innervation durch dopaminerge Neurone, deren Perikaryen sich in der Substantia nigra (SN), einem Melanin-haltigen Kerngebiet des Mittelhirns befinden. Das nigro-striatale System spielt eine wichtige Rolle bei der Motorik, etwa bei der Steuerung komplexer Bewegungsabläufe und beim Lernen motorischer Sequenzen. Der Rückkopplungs-Schaltkreis zwischen den Basalganglien und dem Cortex und seine dopaminerge Modulation sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.



**Abb. 1.2: Nigrostriatales Dopamin-System (Übersicht).** Glutamaterge Pyramidenzellen des motorischen (M1), prämotorischen (PM) und supplementär-motorischen (SMA) Kortex senden exzitatorische Efferenzen in das dorsale Striatum, wo sie GABAerge *Medium Spiny Neurons* erregen. Diese striatalen Neurone sind in zwei unterschiedlichen Schaltkreisen organisiert, dem direkten und dem indirekten Weg. Der direkte Weg verbindet das Striatum mit der Pars interna des Globus pallidus (GPi) und der Substantia nigra, Pars reticulata (SNr). GPi und SNr senden inhibitorische GABAerge Projektionen zum Thalamus, welcher wiederum über glutamaterge exzitatorische Efferenzen zum Kortex projiziert. Der indirekte Weg verbindet ebenfalls das Striatum mit GPi und SNr, allerdings über zwei weitere Verschaltungen, zunächst auf die GABAergen Neurone des Globus pallidus, pars externa (GPe), und anschließend auf die glutamatergen Neurone des Nucleus subthalamicus (STN), die gleichzeitig direkte Signale aus dem Kortex erhalten. Der STN übt einen exzitatorischen Einfluss auf GPi/SNr aus, wodurch der Thalamus verstärkt gehemmt wird. Dopamin aus der Substantia nigra, pars compacta (SNc) erregt (über D1-Rezeptoren) den direkten Weg und hemmt (über D2-Rezeptoren) den indirekten Weg. So kommt es zu einer Reduktion der Inhibition des Thalamus/GPi/SNr und damit zu einer verstärkten Aktivität der thalamo-kortikalen Projektion.

Pathologische Veränderungen der nigro-striatalen dopaminergen Neurotransmission sind klassischerweise mit Bewegungsstörungen assoziiert, wobei Dopamin-Mangel zu hypokinetischen Störungen wie dem M. Parkinson (siehe 1.1.3.2.) führt, während Dopamin-Überschuss oder eine Degeneration der von Dopamin gehemmten Anteile des Striatums mit hyperkinetischen Störungen wie der Chorea Huntington oder auch den L-Dopa-induzierten Dyskinesien bei Parkinson-Patienten in Verbindung gebracht wird.

### 1.1.1.2. Das mesolimbische und mesokortikale Dopamin-System

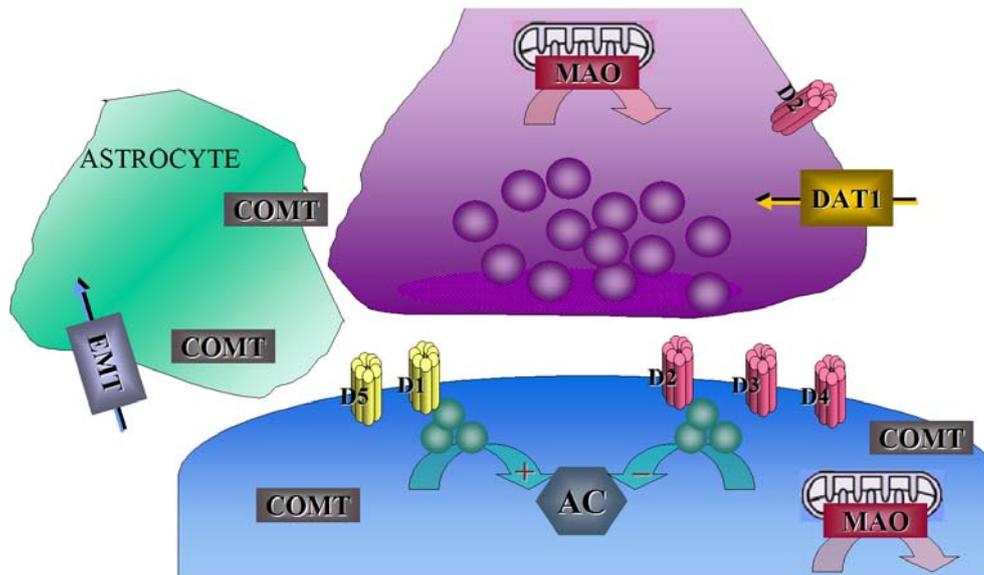
Ventromedial zur SN befindet sich ein weiteres dopaminerges Kerngebiet, das ventrale tegmentale Areal (Area ventralis tegmenti, VTA). Die VTA projiziert in ausgedehnte Regionen des Kortex (insbesondere des präfrontalen Kortex, PFC) und in limbische Strukturen, vor allem in das ventrale Striatum mit seiner Kernstruktur, dem Nucleus accumbens, in die Amygdala und in den Hippocampus. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom mesokortikalen bzw. mesolimbischen Dopamin-System.

Von besonderer Bedeutung sind die Projektionen der VTA (und auch der medialen SN) in den Nucl. accumbens, da diesem eine zentrale Rolle bei der Belohnungsverarbeitung zugeschrieben wird (siehe 1.2.2.). In den letzten Jahren wurde zunehmend auch die Bedeutung der dopaminergen Projektionen in den Hippocampus erkannt – diese können die hippocampale Langzeitpotenzierung (long term potentiation, LTP) modulieren. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass Hippocampus-abhängige Lernprozesse auch *in vivo* dopaminerg moduliert werden können (Bach et al., 1999; Li et al., 2003). Lisman und Grace (2005) entwickelten das Modell eines Regelkreises, der die VTA, den Hippocampus und den Nucl. accumbens beinhaltet, die Hippocampus-VTA-Schleife und postulierten, dass diese Feedback-Schleife an der Kontrolle des Informationsflusses in den Hippocampus beteiligt ist (siehe 1.2.3.).

Dopaminerge Projektionen der VTA in den PFC sind insbesondere mit Arbeitsgedächtnis, aber auch mit höheren exekutiven Funktionen wie Planen und Aufgabenwechsel (*task switching*) in Verbindung gebracht worden (Weinberger et al., 2001; Braver & Barch, 2002). Dabei besteht offenbar keine lineare Beziehung zwischen Dopamin-Konzentration und PFC-Funktion; vielmehr gibt es offenbar einen optimalen Wert der präfrontalen Dopamin-Konzentration, dessen Unterschreitung, aber auch Überschreitung mit einem geringeren Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) und mit einer geringeren Verarbeitungseffizienz im PFC assoziiert ist (Seamers & Yang, 2004; Meyer-Lindenberg et al., 2006). Dopamin wirkt im PFC phasisch über D1-Rezeptoren erregend-modulierend, kann aber durch eine eher tonische D4-Rezeptor-vermittelte Inhibition GABAerger Neurone auch indirekten exzitatorischen Einfluss ausüben (Wang et al., 2002; Onn et al., 2004).

### 1.1.2. Pharmakologie dopaminergener Neuromodulation

Abb. 1.3 zeigt einen schematischen Überblick über den putativen Aufbau einer dopaminergen Synapse<sup>1</sup>. Dopamin wird in den dopaminergen Neuronen des Mittelhirns über die Zwischenstufe L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) aus der Aminosäure Tyrosin synthetisiert, wobei das Enzym Tyrosin-Hydroxylase (TH) den limitierenden Schritt bildet. Durch den vesikulären Monoamin-Transporter (VMAT), einen Protonen-Antiporter, wird Dopamin in synaptische Vesikel aufgenommen und wie andere Neurotransmitter nach Depolarisation der Zelle Ca<sup>2+</sup>-abhängig freigesetzt (McGinty, 1999).

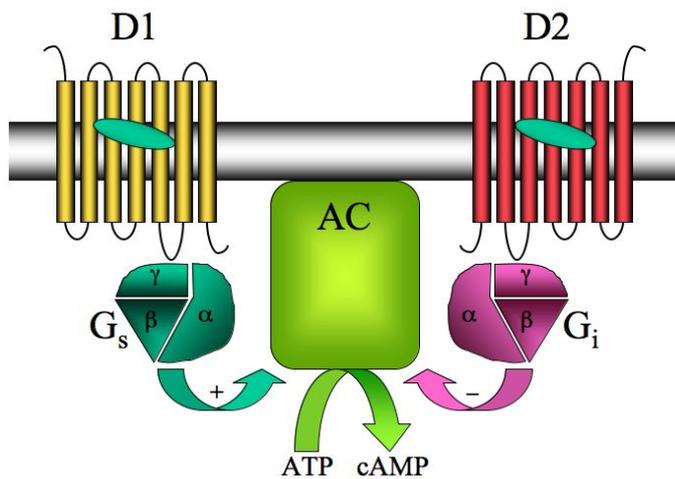


**Abb. 1.3: Schema einer putativen dopaminergen Synapse<sup>1</sup>.** Eine wie in der Abbildung dargestellte DA-Synapse ist am ehesten im Striatum zu finden. DAT1: Dopamin-Transporter; D1-D5: Dopamin-Rezeptoren DRD1-DRD5; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; MAO: Monoaminooxidase; AC: Adenylat-Cyclase; EMT: extraneuronaler Monoamin-Transporter.

#### 1.1.2.1. Dopamin-Rezeptoren und ihre Signalkaskaden

Alle bekannten Dopamin-Rezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Abb. 1.4). Grundsätzlich lassen sich zwei Klassen von Dopamin-Rezeptoren unterscheiden, die D1-Subtypen (D1, D5) und die D2-Subtypen (D2, D3, D4). Beide Rezeptorklassen wirken dabei über G-Proteine auf den cAMP-Stoffwechsel, wobei die D1-Subtypen über ein G<sub>s</sub>-Protein die Adenylat-Cyclase stimulieren, während die D2-Subtypen über ein G<sub>i</sub>-Protein inhibitorisch auf die Adenylat-Cyclase wirken. Der D2-Rezeptor kann darüber hinaus über Aktivierung eines K<sup>+</sup>-Kanals zu einer Hyperpolarisation der Membran führen und damit eine direkte inhibitorische Wirkung entfalten. Kürzlich konnte überdies nachgewiesen werden, dass D1/D2-Heterooligomere auch über den Phospholipase-C-Signalweg zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führen können (Rashid et al., 2007).

<sup>1</sup> Das Schema der dopaminergen Synapse ist hypothetisch. Wahrscheinlich sind dopaminerge Synapsen wie in der Abbildung am ehesten im Striatum zu finden. Im Kortex wirkt Dopamin möglicherweise in erster Linie über Volumentransmission (siehe 1.1.2.2., 1.1.2.3.).

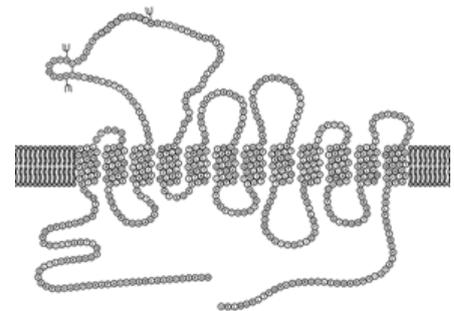


**Abb. 1.4: Antagonistische Wirkung der Dopamin-Transporter-Subtypen auf den cAMP-Signalweg.** Wie alle G-Proteingekoppelten Rezeptoren besitzen die Dopamin-Rezeptoren sieben Transmembrandomänen. Die Interaktion mit dem G-Protein wird in erster Linie über die dritte intrazelluläre Schleife vermittelt. Die DA-Bindungsstellen (grüne Ellipsen) befinden sich auf Membranniveau und werden von den Transmembrandomänen begrenzt. Während D1-Rezeptor-Subtypen (D1, D5) über ein  $G_s$ -Protein aktivierend auf die Adenylat-Cyclase (AC) wirken, wird die AC durch D2-Rezeptor-Subtypen (D2, D3, D4) über ein  $G_i$ -Protein gehemmt.

Die anatomische Verteilung der Dopamin-Rezeptoren im Gehirn ist regional unterschiedlich. D1-Rezeptoren finden sich in hoher Konzentration im ventralen und dorsalen Striatum. Außerdem ist der D1-Rezeptor der dominierende Dopamin-Rezeptor-Subtyp im Kortex (insbesondere im PFC) und im Hippocampus. Dagegen finden sich D2-Rezeptor-Subtypen [mit Ausnahme des im PFC exprimierten D4-Rezeptors] ganz überwiegend im Striatum, wobei der D2-Rezeptor gleichermaßen im ventralen und dorsalen Striatum zu finden ist, während der D3-Rezeptor in erster Linie im ventralen Striatum exprimiert wird (Seeman et al., 2006). Insbesondere D2-Rezeptoren werden auch präsynaptisch exprimiert, wo sie in erster Linie eine autoinhibitorische Funktion haben.

#### 1.1.2.2. Terminierung des Dopamin-Signals im Striatum: Der Dopamin-Transporter

Der im Gehirn ausschließlich präsynaptisch exprimierte Dopamin-Transporter (DAT1) ist für die schnelle Wiederaufnahme von Dopamin in die präsynaptischen Varikositäten striataler Axone dopaminerger Neurone verantwortlich und spielt damit eine zentrale Rolle bei der Regulierung der extrazellulären Dopamin-Konzentration im Striatum (Jaber et al., 1997; Piccini, 2003). Das DAT1-Protein besteht aus einer einzigen, 12



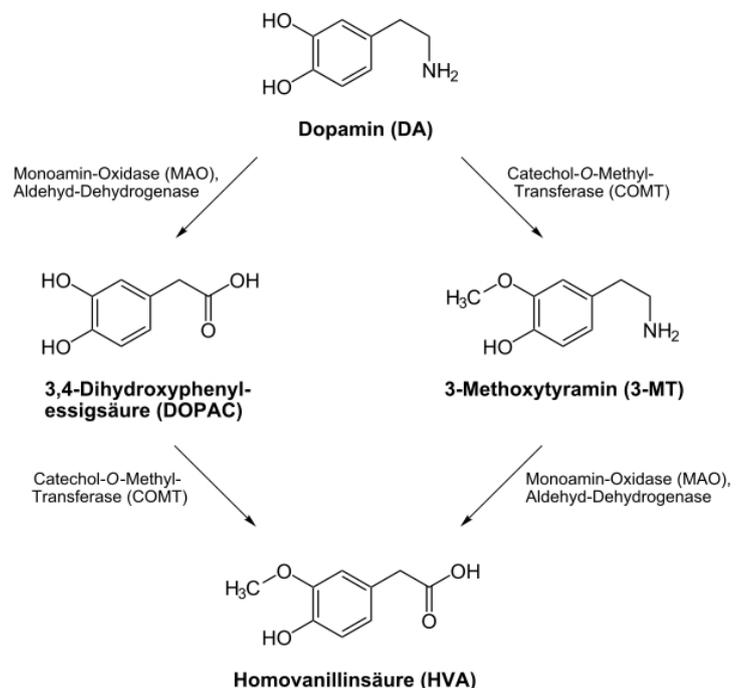
**Abb. 1.5: Membrantopologie des Dopamin-Transporters.** N- und C-Terminus befinden sich intrazellulär.

Transmembrandomänen umfassenden Peptidkette mit 620 Aminosäuren (Abb. 1.5). Dopamin wird durch den Transporter im Co-Transport mit zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen und einem  $\text{Cl}^-$ -Ion in die Zelle aufgenommen (Krueger 1990; Ingram et al., 2002); die benötigte Energie wird durch den elektrochemischen Gradienten bereitgestellt. DAT1 unterliegt einem schnellen Transport zwischen der Plasmamembran und endosomalen Kompartimenten, ein Prozess, der teilweise durch Protein-Kinase-C-abhängige Phosphorylierung des Rezeptors reguliert wird (Foster et al., 2006). Überraschenderweise befinden sich die meisten Dopamin-Transporter nicht direkt am synaptischen Spalt, sondern in der Umgebung der Synapsen, wobei ihre Entfernung von der Synapse den Grad der

Diffusion ("spillover") von Dopamin zu extrasynaptischen Dopamin-Rezeptoren bestimmt – ein Phänomen, das auch als Dopamin-Volumentransmission bekannt ist (Cragg & Rice, 2004). Diese könnte von besonderer Bedeutung im PFC sein, wo die DAT1-Expression niedrig ist und in relativ großer Entfernung zu den Axonterminals der DA-Neurone beobachtet wurde (Sesack et al., 1998).

### 1.1.2.3. COMT und die Terminierung des Dopamin-Signals im PFC

An den Axonen dopaminerger VTA-Neurone, die in den präfrontalen Kortex projizieren, findet sich im Gegensatz zu den dopaminergen Fasern im Striatum eine geringe Expression des Dopamin-Transporters, was zu einer relativ ausgeprägten Volumentransmission führt (Sesack et al., 1998; Ciliax et al., 1999; siehe auch 1.1.2.2.). Dazu passend haben Tierexperimente und Untersuchungen in *post mortem*-Humangewebe gezeigt, dass Dopamin-Inaktivierung im PFC – anders als im Striatum – nicht nur über die DAT1-abhängige Wiederaufnahme erfolgt, sondern in beträchtlichem Maße von der Aktivität des postsynaptisch und glial exprimierten Enzyms Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) abhängt (Karoum et al., 1994; Matsumoto et al., 2003; Tunbridge et al., 2006). COMT überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf die in m-Stellung befindliche OH-Gruppe



**Abb. 1.6: Zweistufige Inaktivierung von Dopamin über COMT und MAO.** Die beiden Schritte sind austauschbar, wobei das Zwischenprodukt entweder 3-MT (COMT) oder 3,4-DOPAC (MAO) ist.

von Catecholaminen und inaktiviert Dopamin in einem zweistufigen Prozess zusammen mit der mitochondrialen Monoaminoxidase A oder B (MAO-A, MAO-B) zu Homovanillinsäure (HVA; siehe Abb. 1.6).

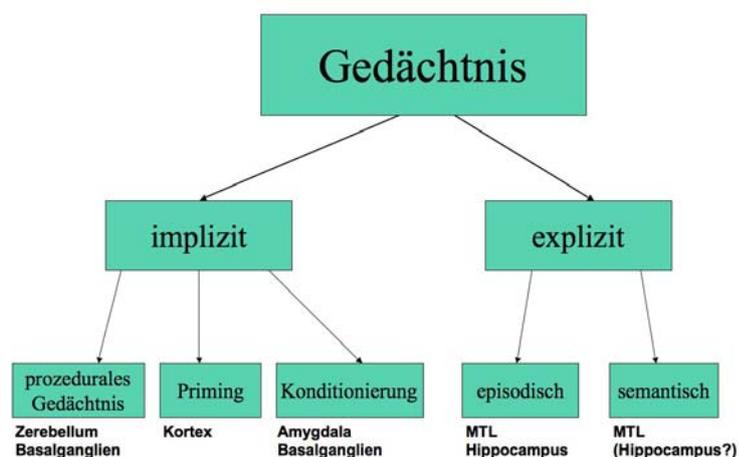
COMT existiert in zwei Isoformen, einer löslichen (S-COMT) und einer membranständigen Form (MB-COMT), die beide durch dasselbe Gen auf Chromosom 22q11.2 kodiert werden. Dabei findet sich im ZNS vor allem MB-COMT, während S-COMT in den meisten anderen Geweben die dominierende Form ist. Das Startcodon der S-COMT ist Codon 51 der MB-COMT; entsprechend unterscheiden sich die beiden Proteine durch die nur in der MB-COMT vorhandenen ersten 50 Aminosäuren, die die Transmembrandomäne bilden. In Neuronen findet sich COMT im perisynaptischen Bereich (Karhunen et al., 1995). Bisher war unklar, ob

der enzymatisch aktive Anteil des Proteins bei der MB-COMT in Neuronen intra- oder extrazellulär orientiert ist. Zwar deutet die Proteinstruktur auf eine intrazelluläre Orientierung hin, und in nicht-neuronalen Zellen wurde diese auch gezeigt (Ulmanen et al., 1997), andererseits wurde gezeigt, dass COMT-abhängiger Dopamin-Metabolismus besonders dann von Bedeutung ist, wenn die DAT1-abhängige Wiederaufnahme blockiert ist (Budygin et al., 1999; Tunbridge et al., 2006).

## 1.2. Lern- und Gedächtnisprozesse und ihre dopaminerge Neuromodulation

### 1.2.1. Gedächtnismodelle

Lern- und Gedächtnisprozesse des Menschen können in implizite und explizite Gedächtnismechanismen unterteilt werden (Abb. 1.7). Zu den expliziten Gedächtnissystemen zählen das semantische Gedächtnis („Weltwissen“) und das episodische (autobiographische) Gedächtnis (Tulving, 2002).



**Abb. 1.7: Einteilung von Langzeitgedächtnisprozessen.**

Unter implizitem Gedächtnis werden unterschiedliche Phänomene wie prozedurales Gedächtnis (Lernen von Handlungsabläufen), Priming und Konditionierung zusammengefasst. Das explizite Gedächtnis wird in episodisches Gedächtnis (Ereignisse) und semantisches Gedächtnis (Fakten) aufgeteilt.

Unter dem Oberbegriff „implizites Gedächtnis“ werden so unterschiedliche Lernmechanismen wie das prozedurale Gedächtnis (Lernen von Handlungsabläufen), Priming (verbesserte Verarbeitung eines Stimulus bei wiederholter Präsentation durch effizientere semantische oder perzeptuelle Repräsentationen des Stimulus), Gewohnheitslernen und einfache Konditionierungsformen zusammengefasst.

### 1.2.2. Konditionierung und Belohnungs-abhängiges Lernen

Die Idee, dass erfolgreiches Lernen entscheidend vom Vorhandensein oder Fehlen von positiven oder negativen Verstärkern (*Reinforcern*) abhängt, wurde entscheidend durch die Behavioristen geprägt, die Lernen als anpassendes Verhalten eines Organismus auffassen (Skinner, 1938). In den 50er Jahren entwickelte sich zunehmend die Vorstellung von einem intrinsischen Verstärkersystems des Gehirns. Olds und Milner (1954) konnten zeigen, dass nicht nur primäre und [erlernte] sekundäre *Reinforcer* verhaltensverstärkend wirken, sondern auch die direkte Stimulation bestimmter Hirnareale. Nach heutigem Stand der Forschung

spielt bei der Verarbeitung solcher Verstärker das dopaminerge Belohnungssystem des ventralen Striatums eine entscheidende Rolle (Berridge & Robinson, 1998; Montague et al., 2004; Knutson et al., 2005). Eine Kernstruktur dieses Systems ist der dem Nucleus caudatus inferior-medial anliegende Nucleus accumbens (NAcc).

#### *1.2.2.1. Tierexperimentelle Befunde zur Konditionierung*

Unerwartete Belohnung (aber nicht unerwartete Strafe) ist im Tierexperiment mit einer phasischen Erhöhung der Feuerrate dopaminergener Neurone in der VTA (Bozarth et al., 1994) und infolgedessen mit einer Dopamin-Ausschüttung im ventralen Striatum assoziiert (Schultz 1997; Schultz et al., 1997). In geringerem Maße kommt es auch zu einer erhöhten Dopamin-Ausschüttung im präfrontalen Kortex und im dorsalen Striatum. Wenn neutrale Stimuli regelmäßig von einer Belohnung gefolgt werden, werden sie durch Pawlowsche Konditionierung zu Belohnungs-prädizierenden Stimuli (konditionierten Stimuli, CS+). In Folge tritt die Dopamin-Ausschüttung dann bereits nach Präsentation des konditionierten Stimulus auf, korreliert also mit Belohnungs-Prädiktion. Bleibt umgekehrt eine Belohnung nach der Präsentation eines CS+ aus, kommt es zu einer Abnahme der Feuerrate dopaminergener Neurone auf einen Wert unterhalb der Basis-Feuerrate. Schultz und Kollegen (1997) schlossen daraus, dass Dopamin-Ausschüttung kein Korrelat des angenehmen Erlebens der Belohnung per se ist, sondern mit Kontrollprozessen korreliert, die für die Ausrichtung der Aufmerksamkeit auf die folgende Belohnung wichtig sind. Das dopaminerge Signal kodiert dabei zum einen für den Prädiktionsfehler, also das Auftreten bzw. Ausbleiben einer Belohnung entgegen der Erwartungshaltung, zum anderen für die Prädiktion, also die Erwartungshaltung aufgrund des Vorhandenseins von CS+ (Schultz, 2002, 2004).

Berridge und Robinson (2003) unterteilen dagegen die Verarbeitung eines Belohnungsereignisses im Gehirn in drei unterschiedliche Aspekte: Motivation („Wanting“), Affekt („Pleasure“) und das eigentliche Lernen (Pawlowsche und operante Konditionierung) und vertreten die Ansicht, dass das dopaminerge Signal in erster Linie mit dem Motivationsaspekt korreliert.

#### *1.2.2.2. Befunde aus der funktionellen Bildgebung beim Menschen*

In Übereinstimmung mit den Befunden aus der tierexperimentellen Forschung, wurde Belohnungsverarbeitung in der funktionellen Bildgebung mit Aktivierungen des ventralen Striatums und des dopaminergen Mittelhirns assoziiert (Knutson and Cooper, 2005). Ein häufig verwendetes Paradigma zur Untersuchung der Belohnungsverarbeitung beim Menschen ist der *Delayed Monetary Incentive*, bei dem das zu erwartende Resultat einer Handlung (typischerweise Gewinn oder Verlust eines definierten Geldbetrages vs. neutrales Resultat) angekündigt wird und die Versuchsteilnehmer das Resultat erst nach einer variablen Verzögerung (*delay*, typischerweise einige Sekunden) erfahren. Mit solchen Aufgaben konnte gezeigt werden, dass die hämodynamische Antwort des mesolimbischen

Systems analog zu den Ergebnissen der tierexperimentellen Untersuchungen sowohl für unerwartete Belohnung [i. e. Prädiktionsfehler] als auch für die Vorhersage einer durch Präsentation eines CS+ angekündigten Belohnung [i. e. Prädiktion] kodiert (Knutson et al., 2001; O'Doherty et al., 2003; Wittmann et al., 2005, Yacubian et al., 2006). Das bedeutet, dass sich die Antwort des ventralen Striatums / Nucl. accumbens bei erfolgreichem Lernen einer Stimulus-Belohnungs-Assoziation – und nur dann – vom Zeitpunkt der Belohnung selbst auf den Zeitpunkt der Präsentation des CS+ verschiebt (O'Doherty et al., 2003). Dabei zeigt sich ein Anstieg der NAcc-Antwort in Abhängigkeit von der Höhe des zu erwartenden Gewinnes (Erwartungswert, *expected value*, EV; Knutson et al., 2005). Der EV setzt sich aus einer Größenkomponente (Betrag des erwarteten Gewinns) und aus einer Wahrscheinlichkeitskomponente zusammen. In mehreren Studien konnte außerdem eine Ko-Aktivierung des medialen dopaminergen Mittelhirns, also der VTA und der medialen SN bei Belohnungserwartung beobachtet werden (Wittmann et al., 2005; Adcock et al., 2006; O'Doherty et al., 2006). Außerdem fanden sich bei Belohnungsaufgaben auch Aktivierungen des medialen PFC und des anterioren Gyrus cinguli. Während die fMRI-Korrelate von Belohnungserwartung im ventralen Striatum und im Mittelhirn mehrfach repliziert wurden, ist die Rolle medial-präfrontaler Strukturen bei der Belohnungsverarbeitung nicht eindeutig definiert. Aktivierungen in diesen Region wurden unter anderem bei positivem Belohnungs-Feedback nach vorheriger Erwartung der Belohnungen beobachtet (Knutson et al., 2001; Wittmann et al., 2005), aber auch während der Erwartungsphase als Funktion der Wahrscheinlichkeit einer Belohnung (Critchley et al., 2001; Knutson et al., 2005). Knutson und Kollegen (2005) vermuteten daher, dass der anteriore Gyrus cinguli / mediale PFC die Wahrscheinlichkeitskomponente von EVs kodieren könnte.

### **1.2.3. Deklaratives Gedächtnis und seine dopaminerge Modulation**

Beim deklarativen Gedächtnis werden semantisches und episodisches Gedächtnis unterschieden (Tulving, 1972, 2002). Das semantische Gedächtnis ist ein System zur Speicherung von Fakten („Weltwissen“, z. B. „Wie heißt die Hauptstadt von Frankreich?“). Das episodische Gedächtnis hingegen verarbeitet und speichert Einzelereignisse – typischerweise autobiographischer Natur – und zeichnet sich insbesondere dadurch aus, dass Ereignisse in ihrem zeitlichen Ablauf und Kontext gespeichert werden und abrufbar sind (Tulving, 2002).

#### **1.2.3.1. Das episodische Gedächtnis**

Die Enkodierung eines Ereignisses in das episodische Gedächtnis setzt keineswegs ein intentionales Lernen voraus; tatsächlich erfolgt die Einspeicherung von episodischen Gedächtnisinhalten sogar ganz überwiegend inzidentell, also beiläufig. Das bedeutet allerdings nicht, dass sie rein zufällig wäre, sondern sie hängt von bestimmten kognitiven Prozessen ab, die die Langzeitspeicherung von Episoden begünstigen. Insbesondere wurde

gezeigt, dass die „Tiefe“ der Informationsverarbeitung (level of processing, LOP) entscheidende Auswirkung auf die Gedächtnisleistung hat (Craik & Lockhart, 1972). Bei der Verarbeitung verbaler Information lassen sich beispielsweise folgende Verarbeitungsebenen unterscheiden:

1. graphemische Ebene: Verarbeitung visueller Muster, notwendig zur Erkennung der Buchstaben. Beispielaufgabe: Zahl der eingeschlossenen Flächen (z. B. bei den Buchstaben A, B, D, O, P vs. C, E, F, K, S).
2. alphabetische Ebene: Erkennen und Verarbeitung der Buchstaben. Beispielaufgabe: alphabetische Reihenfolge von erstem und letztem Buchstaben.
3. phonemische Ebene: Umsetzen der visuellen Information in auditorische Information, Bildung von Phonemen, z. B. Silben. Beispielaufgabe: Silben zählen.
4. semantische Ebene: Erfassung der Bedeutung von Wörtern. Beispielaufgaben: angenehm / unangenehm, lebend / nicht lebend, konkret / abstrakt.
5. kontextuelle Ebene: Einordnung der Information in einen zeitlichen, räumlichen oder semantischen Zusammenhang. Beispielaufgabe: Bildung eines Satzes aus zwei Wörtern einer Lernliste.

Je tiefer die Information während des Lernens verarbeitet wird, desto besser erfolgt auch ihre Enkodierung in das episodische Gedächtnis (Craik & Lockhart, 1972; Richardson-Klavehn & Gardiner, 1996, 1998; Henke et al., 1999; Schott et al., 2002).

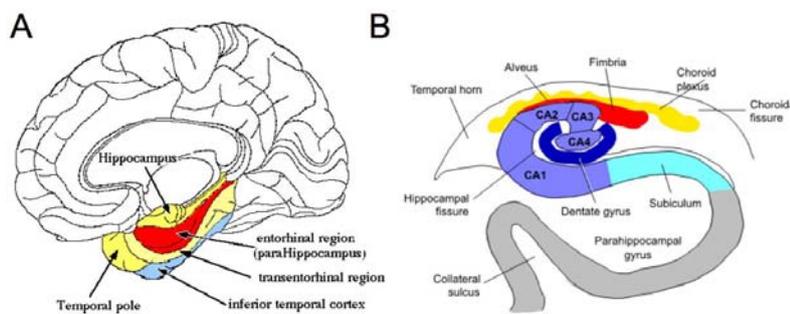
Beim Gedächtnisabruf kann grundsätzlich zwischen Wiedergabe (*recall*) und Wiedererkennung (*recognition*) unterschieden werden. Wiedergabe kann entweder frei erfolgen, d.h. Versuchspersonen werden instruiert, sich ohne weitere Hilfen an die Information zu erinnern, oder sie ist Reiz-induziert, d.h. es werden Hilfsstimuli (wie etwa Wortstämme; Richardson-Klavehn & Gardiner, 1996, 1998) präsentiert, die den Probanden helfen sollen, sich an die zuvor gelernte Information zu erinnern. Wiedererkennung bezeichnet den Vorgang, bereits bekannte von neuen Stimuli zu unterscheiden. Bei Wiedererkennungstests wird also die vollständige Information aus der Lernphase erneut präsentiert, wobei dies im gleichen oder auch in einem veränderten Kontext geschehen kann. Zudem kann bei Wiedererkennungstests durch die sogenannte „Remember/Know-Aufgabe“ (Tulving, 1985) zwischen Kontext-reichem „Erinnern“ („remember“) und Bekanntheit ohne Wissen um einen Kontext („know“) unterschieden werden. Nach Tulving (1985) ist das Kontext-reiche Erinnern ein entscheidendes Kennzeichen des episodischen im Gegensatz zum semantischen Gedächtnis.

#### *1.2.3.2. Die besondere Rolle des Hippocampus beim episodischen Gedächtnis*

Seit dem Fall des Patienten H.M., der nach beidseitiger Entfernung der anterior-medialen Schläfenlappen an einer ausgeprägten anterograden und retrograden Amnesie litt (Scoville & Milner, 1957) gilt der mediale Schläfenlappen mit der Hippocampus-Formation (Abb. 1.8)

als eine entscheidend an expliziten Gedächtnisprozessen beteiligte Hirnstruktur. Die Vermutung, dass der Hippocampus eine entscheidende Rolle bei Langzeitgedächtnisprozessen spielt, bestätigte sich in den folgenden Jahren sowohl in tierexperimentellen Untersuchungen, als auch in Läsionsstudien und funktionellen Bildgebungsexperimenten beim Menschen.

Das medio-temporale Gedächtnissystem lässt sich in neokortikale Areale, die parahippocampale Region (perirhinaler, entorhinaler und parahippocampaler Kortex) und den Hippocampus proper (Gyrus dentatus, die CA-Region und das Subiculum) einteilen. Die meisten Autoren gehen heute davon aus, dass der MTL mit dem Hippocampus und der parahippocampalen Region die eigentliche Gedächtnisbildung durchführt, indem er die im Neokortex gespeicherten – modalitätsspezifisch verteilten – Repräsentationen von Informationen verändert und neu miteinander verknüpft (Eichenbaum, 2000).



**Abb. 1.9: Anatomie der Hippocampus-Formation.** A: Lange des Hippocampus und der anliegenden Kortex-Regionen im medialen Temporallappen. B: Querschnitt durch die Hippocampus-Formation.

In den vergangenen zwei Dekaden haben die Positronenemissionstomographie (PET) und insbesondere die ereignisabhängige funktionelle Magnetresonanztomographie (*event-related fMRI*, s. 1.3.3.) entscheidend zum Verständnis expliziter Gedächtnisprozesse des Menschen beigetragen. Dabei wurden sowohl die neuronalen Korrelate der Enkodierung als auch des Abrufs mit bildgebenden Verfahren untersucht. Durch Entwicklung des ereignisabhängigen fMRI-Verfahrens war es zwei Arbeitsgruppen 1998 erstmals möglich, die neuronalen Korrelate der erfolgreichen Enkodierung verbaler (Wagner et al., 1998) und non-verbaler (Brewer et al., 1998) Stimuli in das episodischen Gedächtnis zu erfassen, indem sie die hämodynamischen Antworten des Gehirns auf später erinnerte Stimuli mit denen auf später vergessene Stimuli verglichen. Beide Gruppen fanden übereinstimmend Aktivierungen des MTL und unterschiedlicher Regionen des PFC beim Vergleich der fMRI-Antworten später erinnerter und später vergessener Stimuli. In den folgenden Jahren konnte dieser Befund mehrfach bestätigt werden (Buckner et al., 2000; Otten et al., 2002; Wittmann et al., 2005; Schott et al., 2006). Beim Gedächtnisabruf ist der Hippocampus ebenfalls beteiligt, insbesondere bei kontextreichem *Erinnern* (Eldridge et al., 2000). Darüber hinaus zeigen Studien zum Abruf expliziter Erinnerungen übereinstimmend ausgedehnte frontale und parietale Aktivierungen, und zwar sowohl bei Wiedererkennung (Henson et al., 1999) als auch bei Reiz-induziertem Abruf (Schott et al., 2005).

Dabei ist die genaue Rolle der einzelnen Komponenten des medialen Temporallappens allerdings bis heute umstritten. Viele Autoren gehen davon aus, dass der MTL hierarchisch gegliedert ist, wobei der Hippocampus in erster Linie assoziatives, episodisches Gedächtnis vermittelt, während der anliegende parahippocampale und entorhinale Kortex für das kontextfreie semantische Gedächtnis zuständig ist (Vargha-Khadem et al., 1997; Henke et al., 1999; Eldridge et al., 2000). Dagegen vertreten andere Autoren die Ansicht, dass eine solche Aufteilung des MTL in unterschiedliche Anteile nicht den verschiedenen Formen des expliziten Gedächtnisses gerecht werde und, dass Unterschiede zwischen episodischem und semantischem Gedächtnis im Wesentlichen über differentielle Modulation des Hippocampus durch den PFC zustande komme (Squire et al., 2004).

Unabhängig von einer möglichen hierarchischen Gliederung des MTL gehen zahlreiche Autoren heute davon aus, dass eine entscheidende Funktion des Hippocampus in der Erkennung neuer Stimuli und ihrer Enkodierung in das explizite Gedächtnis liegt (Tulving et al., 1996; Dolan & Fletcher, 1997; Lisman and Otmakhova, 2001; Vinogradova, 2001; Düzel et al., 2003a; Ranganath & Rainer, 2003). Die Detektion von Neuheit erfordert den Abgleich von eingehender sensorischer Information mit bereits im Gedächtnis gespeicherter Information einerseits und mit erwarteter Information andererseits. Der Hippocampus ist aufgrund seiner vielfältigen Verbindungen mit sensorischen und assoziativen Kortexarealen für diese Funktion besonders geeignet. Nach Lisman (Lisman & Otmakhova, 2001; Lisman & Grace, 2005) spielt vor allem die CA1-Region des Hippocampus eine entscheidende Rolle bei der Neuheitsdetektion. CA1 erhält sowohl Projektionen aus dem Gyrus dentatus und der CA3-Region, welche gespeicherte Erinnerungen und prädiktive Signale mit hoher zeitlicher Präzision kodieren, als auch Projektionen vom Kortex, die sensorische Information unterschiedlicher Modalitäten an die CA1-Region weiterleiten können. Aus dieser Information können in der CA1-Region sowohl Stimulus- als auch kontextuelle Neuheit errechnet werden (Hasselmo & Wyble, 1997; Lisman & Grace, 2005).

#### *1.2.3.3. Dopaminerge Modulation Hippocampus-abhängiger Gedächtnisprozesse*

Die Enkodierung neuer Stimuli in das Hippocampus-abhängige Gedächtnis ist mit synaptischen Plastizitätsvorgängen im Hippocampus assoziiert. Ein gut untersuchtes zelluläres Modell für solche Prozesse ist die Langzeitpotenzierung (long-term potentiation, LTP), insbesondere in der CA1-Region des Hippocampus (Kandel, 2000). Zwar ist der genaue Zusammenhang zwischen hippocampaler LTP und Gedächtnisbildung bis heute nicht eindeutig geklärt; es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass hippocampaler LTP und Hippocampus-abhängigen Lernprozessen gemeinsame molekulare Mechanismen zu Grunde liegen (Tsien et al., 1996). Zahlreiche Autoren nehmen an, dass für die Expression der LTP neben glutamatergen Signalen zusätzlich die Aktivität neuromodulatorischer Transmittersysteme notwendig ist. Insbesondere für die NMDA-

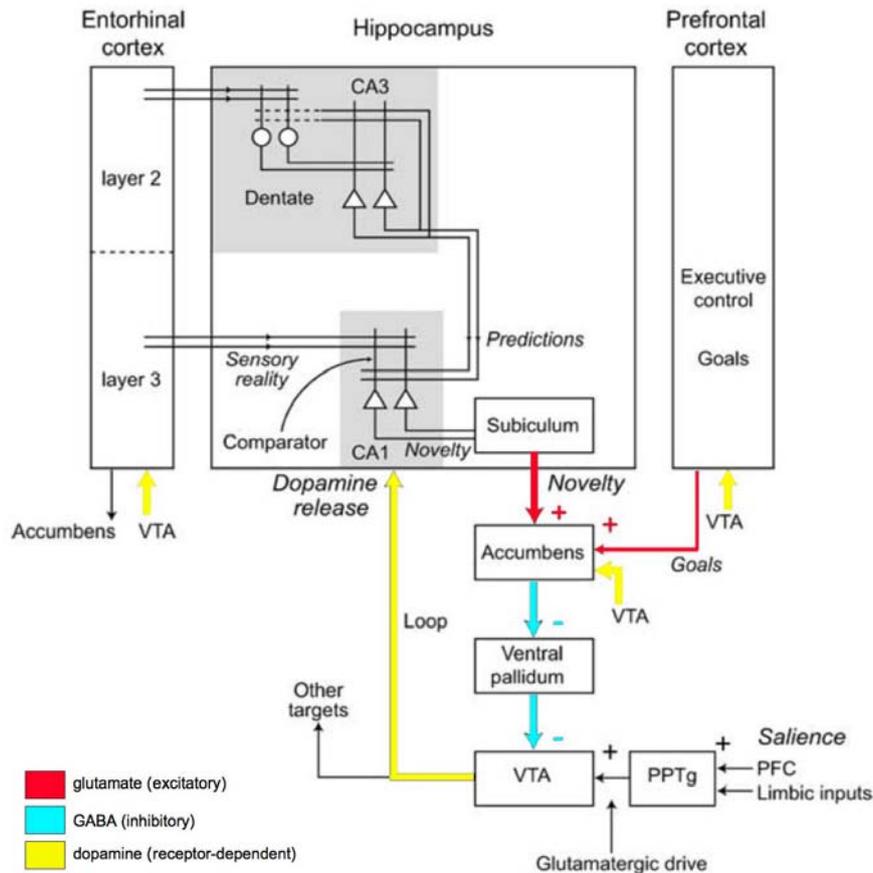
Rezeptor-abhängige LTP an den Schaffer-Kollateral-Synapsen konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung dopaminerger Rezeptoren vom D1-Typ eine wichtige Rolle bei der LTP spielt, und zwar sowohl in der Phase der Induktion (Li et al., 2003), als auch während der frühen (Otmakhova & Lisman, 1996) und späten (Frey et al., 1990; Huang & Kandel, 1995) Expression.

Untersuchungen an lebenden Tieren unterstützen die Hypothese, dass dopaminerge Neuromodulation an Hippocampus-abhängigen Lern- und Plastizitätsprozessen beteiligt ist. So ist die Präsentation neuer Stimuli mit verstärkter Aktivität dopaminerger Mittelhirnneurone, welche auch in den Hippocampus projizieren, assoziiert (Schultz, 1998). Durch Kombination von Verhaltensexperimenten mit LTP-Messungen konnten Li und Kollegen zeigen, dass Ratten, die einer neuen räumlichen Umgebung ausgesetzt sind, eine reduzierte Schwelle für die LTP-Induktion in der CA1-Region haben, und dass dieser Effekt durch D1/D5-Rezeptor-Antagonisten blockierbar ist (Li et al., 2003). Auch die Konsolidierung inhibitorischen Vermeidungslernens bei Ratten ist von der Aktivität von D1/D5-Typ-Dopaminrezeptoren in der CA1-Region abhängig (Bernabeu et al., 1997). Dopamin-Agonisten können bei Ratten auch Alters-bedingte Verschlechterungen bei Hippocampus-abhängigem Lernen reduzieren (Hersi et al., 1995; Bach et al., 1999). Umgekehrt führen neurotoxische Läsionen der dopaminergen Mittelhirnneurone zu schlechteren Lernleistungen (Gasbarri et al., 1996; Schröder et al., 2003).

Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass die Gabe von L-Dopa im Vergleich zu Placebo mit verbesserter Langzeitspeicherung repetitiv präsentierter verbaler Stimuli assoziiert ist (Knecht et al., 2004). In der fMRI-Bildgebung konnte gezeigt werden, dass Belohnungs-assoziierte Stimuli im Vergleich zu neutralen Stimuli besser in das Langzeitgedächtnis enkodiert werden und, dass diese Enkodierung mit einer Ko-Aktivierung des Hippocampus und des dopaminergen Mittelhirns assoziiert ist (Wittmann et al., 2005; Adcock et al., 2006).

#### *1.2.3.4. Die Hippocampus-VTA-Schleife*

Obwohl eine modulatorische dopaminerge Innervation limbischer Strukturen, insbesondere des Nucleus accumbens, des Hippocampus und der Amygdala schon lange bekannt ist (Koob & Swerdlow, 1988), wurde erst in den letzten Jahren das Konzept eines zum nigrostriatalen Dopamin-System analogen dopaminerg modulierten Regelkreises im limbischen System entwickelt, die Hippocampus-VTA-Schleife (*hippocampal-VTA-loop*; siehe Abb. 1.9).



**Abb. 1.9: Die Hippocampus-VTA-Schleife.** In der CA1-Region des Hippocampus wird aus dem Prädiktions-Signal der CA3-Region und den über Schicht 3 des entorhinalen Kortex eingehenden sensorischen Inputs ein Neuheitssignal generiert, das über Projektionsneurone des Subiculus weitergeleitet wird und exzitatorisch auf die GABAergen Neurone des Nucl. accumbens wirkt. Dadurch wird die tonische Inhibition der VTA reduziert. Die so resultierende Dopamin-Freisetzung in der CA1-Region verstärkt wiederum die LTP der Schaffer-Kollateral-Synapsen im Sinne eines positiven Feedbacks. Abbildung mit Modifikationen übernommen aus Lisman & Grace, 2005.

Die Hippocampus-VTA-Schleife beschreibt unter Berücksichtigung der anatomischen Beziehungen zwischen dem Hippocampus und dem mesolimbischen dopaminergen System ein Modell der dopaminergen Modulation Hippocampus-abhängiger Gedächtnisprozesse. Ein in der CA1-Region des Hippocampus generiertes Neuheitssignal kann durch einen Feedback-Mechanismus zu einer verstärkten Aktivität dopaminergischer Mittelhirnneurone führen, welche wiederum durch Dopamin-Ausschüttung in CA1 zu einer Verstärkung der LTP an den Schaffer-Kollateralen führt. Eine zentrale Rolle spielt dabei der Nucl. accumbens, dessen Blockade die positive Rückkopplungsschleife zwischen Hippocampus und VTA unterbrechen kann (Floresco et al., 2001).

### **1.3. Interindividuelle Variabilität im dopaminergen System**

#### **1.3.1. Störungen der dopaminergen Neuromodulation**

Aufgrund der vielfältigen Wirkungen von Dopamin auf motorische und kognitive Funktionen, können Störungen der dopaminergen Neuromodulation zu sehr unterschiedlichen Symptomen führen. Am bekanntesten sind die Auswirkungen des ausgeprägten präsynaptischen Dopamin-Mangels im nigrostriatalen System bei der Parkinsonschen Erkrankung. Eine gewisse Reduktion der dopaminergen Transmission findet sich auch physiologischerweise im Alter. Diese ist jedoch im Vergleich zum M. Parkinson wesentlich geringer ausgeprägt und betrifft sowohl die präsynaptische als auch die postsynaptische Seite.

##### *1.3.1.1. Altersveränderungen dopaminergener Neuromodulation*

Im dopaminergen System des Menschen werden mit zunehmendem Alter Veränderungen beobachtet, die wahrscheinlich Teil des physiologischen Alterungsprozesses sind. Durch Positronenemissionstomographie (PET) konnte sowohl eine Abnahme präsynaptischer Markermoleküle dopaminergener Transmission (DAT1, Dopa-Decarboxylase) als auch eine Reduktion der Dopamin-Rezeptordichte nachgewiesen werden. Dabei war das Striatum ebenso betroffen wie andere Hirnregionen. Die klinische Bedeutung dieser Befunde ergibt sich aus der Beobachtung, dass regressive Veränderungen im dopaminergen System mit der altersabhängigen Leistungsabnahme bei verschiedenen psychomotorischen und kognitiven Fähigkeiten assoziiert sind (Volkow et al., 1998a, b; Kaasinen & Rinne, 2005; Erixon-Lindroth et al., 2005; Bäckman et al., 2006). Untersuchungen zum Belohnungsassoziierten Lernen bei älteren Probanden zeigen auch hier Defizite, denen möglicherweise eine Abnahme des mesolimbischen Dopamin-Signals zugrunde liegen könnte (Marschner et al., 2005; Mell et al., 2005).

##### *1.3.1.2. Kognitive und psychiatrische Störungen bei der Parkinsonschen Krankheit*

In besonders ausgeprägter Form findet sich der (asymmetrische) Verlust präsynaptischer Elemente dopaminergener Neurotransmission bei der Parkinsonschen Krankheit (PD; auch Morbus Parkinson oder Idiopathisches Parkinson-Syndrom, IPS), die durch eine relativ selektive Degeneration dopaminergener Neurone in der Substantia nigra, pars compacta, gekennzeichnet ist. Die genaue Ursache des Neuronenverlustes ist bis heute nicht bekannt; diskutiert werden unter anderem oxidativer Stress, exogene Toxine und genetische Faktoren (Gerlach, Reichmann & Riederer, 2003). Das durch die Trias Tremor (grobschlägiger, niederfrequenter Ruhetremor), Rigor (Muskelsteifigkeit) und Akinese (Bewegungsverarmung) gekennzeichnete Krankheitsbild ist in erster Linie auf den Verlust dopaminergener Neurone im nigrostriatalen System zurückzuführen. Die Erkrankung beginnt typischerweise mit einseitigen Symptomen und verläuft durch zunehmende Degeneration der SN-Neurone

langsam progredient. Entsprechend dem klinischen Schweregrad der Erkrankung kann nach Hoehn und Yahr eine Einteilung in fünf Stadien vorgenommen werden:

- I) einseitige, milde Symptomatik
- II) bilaterale, milde Symptomatik
- III) zusätzlich posturale Instabilität
- IV) deutliche Behinderung, hilfsbedürftig im Alltag, Gehen noch möglich
- V) schwere Behinderung, Pflegebedürftigkeit

Die Diagnose eines M. Parkinson stützt sich in erster Linie auf das klinische Erscheinungsbild und auf die L-Dopa-Responsivität, d.h. ein klinisch relevantes Ansprechen auf den Dopamin-Precursor L-Dopa. Unterstützt werden kann die Diagnose durch nuklearmedizinischen Nachweis (FP-CIT-SPECT, F-Dopa-PET) eines lateralisierten Verlustes präsynaptischer Markermoleküle des dopaminergen Systems.

Auch wenn die durch die Degeneration der nigro-striatalen dopaminergen Projektionen bedingten motorischen Symptome das klinische Bild des M. Parkinson dominieren, sind kognitive Veränderungen (Carbon & Marie, 2003; Biggins et al., 1992) und depressive Symptomatik (Ishihara & Brayne, 2006; Poewe 1993; Shiba et al., 2000) nicht selten. Die depressive Symptomatik kann den motorischen Störungen um bis zu fünf Jahre vorausgehen und ist in ihrem Schweregrad meist geringer ausgeprägt als die klassische *major depression* (Shiba et al., 2000). Der genaue Pathomechanismus der Parkinson-assoziierten Depression ist nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass sowohl die durch Degeneration mesolimbischer dopaminergener Neurone bedingte Störung des Belohnungssystems als auch die – in geringem Umfang ebenfalls beobachteten – degenerativen Veränderungen noradrenerger und serotonerger Neurone im Hirnstamm dabei eine Rolle spielen könnten (Lemke & Reiff, 2001).

Etwa 30 Prozent der Patienten mit einem IPS entwickeln im Verlauf der Erkrankung eine manifeste Demenz (Aarsland et al., 1996; Gerlach, Reichmann & Riederer, 2003). Gekennzeichnet ist dieses – auch als subkortikale Demenz bezeichnete – Syndrom vor allem durch Denkverlangsamung, Verlust der Merkfähigkeit und auch Persönlichkeitsveränderungen (Gerlach, Reichmann & Riederer, 2003). Dabei ist eine Abgrenzung gegenüber der Lewy-Body-Demenz notwendig, einem dementiellen Syndrom, das durch paralleles Auftreten eines Parkinson-Syndroms und einer kortikalen Demenz gekennzeichnet ist. Aber auch Patienten, die keine Demenz entwickeln, zeigen im Verlauf der Erkrankung sehr häufig Aufmerksamkeits- und Gedächtnisstörungen (Riepe et al., 2006; Stolwyk et al., 2006). Zumindest ein Teil dieser kognitiven Veränderungen beruht nach neueren Erkenntnissen auch auf einer Degeneration des mesolimbischen und mesokortikalen DA-Systems (Ito et al., 2002; Mattay et al., 2002).

## **1.3.2. Genetische Variabilität des dopaminergen Systems**

### *1.3.2.1. Genetische Polymorphismen*

Als Polymorphismus (griech. *πολυμορφισμός*, „Vielgestaltigkeit“) bezeichnet man in der Genetik das Auftreten von zwei oder mehreren Varianten eines Gens (Allelen) in einer Population mit einer Allelfrequenz von mindestens 1%. Die häufigsten Polymorphismen sind so genannte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs), bei denen ein einzelnes Nucleotid des DNA-Moleküls verändert ist. Im menschlichen Genom finden sich SNPs im Durchschnitt etwa alle 200 – 1000 Basenpaare. SNPs in Exons können zu Aminosäureaustauschen in den entsprechenden Proteinen führen oder, bei Lage im Bereich von Exon/Intron-Grenzen, das Splicing der mRNA beeinflussen. Einen Spezialfall stellen die sogenannten Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) dar. In diesem Fall verfügt eines der Allele über eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym, so dass die Allelträgerschaft durch Restriktionsverdau des den Polymorphismus enthaltenden DNA-Fragmentes ermittelt werden kann.

Eine weitere häufige Form von Polymorphismen sind repetitive Sequenzen, sie sich in der Zahl ihrer Wiederholungen unterscheiden. Bei sehr kurzen Sequenzen (2 – 4 bp) mit sehr hohen Repeat-Zahlen spricht man auch von Mikrosatelliten. In einigen Fällen führen sehr hohe Repeat-Zahlen in kodierenden Genabschnitten zu genetischen Erkrankungen, wie dem M. Huntington, dessen Ursache eine krankhaft erhöhte Zahl von CAG-Repeats im Huntingtin-Gen ist. Repetitive Sequenzen mittlerer Länge (ca. 10 – 30 bp) mit mittleren Repeat-Zahlen werden auch als VNTRs (*variable number of tandem repeats*) bezeichnet. Sie liegen selten in kodierenden Genabschnitten [ein bekanntes Beispiel für einen kodierenden VNTR findet sich im Gen des D4-Dopamin-Rezeptors], finden sich aber relativ häufig in regulatorischen Gensequenzen und können, beispielsweise über Bindung von Transkriptionsfaktoren, die Expression von Genen beeinflussen (Heils et al., 1996; Zimprich et al., 2000).

### *1.3.2.3. Kopplungsungleichgewicht*

Eine statistische Beziehung zwischen einem genetischen Polymorphismus und einem Phänotyp muss nicht kausal sein. Eine Ursache dafür liegt darin, dass die homologe Rekombination nicht an allen Chromosomenabschnitten gleichmäßig erfolgt, sondern vor allem an sogenannten *Recombination Hot Spots* stattfindet, während die zwischen diesen *Hot Spots* liegenden Chromosomenabschnitte weitgehend zusammenhängend vererbt werden. Dadurch werden bei einer Reihe von Polymorphismen bestimmte Allel-Kombinationen bevorzugt vererbt; man spricht von Kopplungsungleichgewicht (*linkage disequilibrium*, LD). Besteht Kopplungsungleichgewicht zwischen einem funktionellen Polymorphismus und einer „stummen“ genetischen Variante, zeigt auch der „stumme“ Polymorphismus eine statistische Beziehung mit dem Phänotyp, der kausal durch den in LD

befindlichen funktionellen Polymorphismus ausgelöst wird. Gruppen von Polymorphismen, die sich im LD befinden, werden auch als Haplotypen bezeichnet.

#### *1.3.2.4. Auswirkung genetischer Polymorphismen auf kognitive Leistungen*

Angesichts der Tatsache, dass der größte Teil der bekannten Gene des Menschen im Gehirn exprimiert wird, ist es nicht überraschend, dass sich eine große Zahl genetisch bedingter Erkrankungen durch das Auftreten einer – unterschiedlich stark ausgeprägten – mentalen Retardierung auszeichnet. Aber auch in der gesunden Normalbevölkerung konnte in den letzten Jahren in einer Reihe von Untersuchungen gezeigt werden, dass genetische Polymorphismen, die zu Veränderungen der Expression oder der Struktur und Funktion von im Gehirn exprimierten Proteinen führen können, deutlichen Einfluss auf die interindividuelle Variabilität kognitiver Leistungen haben (Goldberg & Weinberger, 2004). Neben der Assoziation einer Reihe genetischer Polymorphismen mit allgemeinem Intelligenzniveau (i.d.R. über die Leistung in standardisierten Intelligenztests gemessen; Gosso et al., 2006; Dick et al., 2007; Zinkstok et al., 2007) konnten verschiedene Polymorphismen identifiziert werden, die relativ selektiv einzelne kognitive Funktionen beeinflussen können, ohne sich entscheidend auf das allgemeine Intelligenzniveau auszuwirken. Ein bekanntes Beispiel dafür ist eine Variation des Gens für das Neurotrophin Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF), die zu einem Austausch von Valin zu Methionin an Position 66 des Pro-BDNF-Proteins führt (BDNF Val66Met). Das Met-Allel dieses Polymorphismus ist mit relativ schwächerer Performance in episodischen Gedächtnistests assoziiert, und Allelträger zeigten im fMRI eine Minderaktivierung des Hippocampus bei episodischer Enkodierung, aber keine Unterschiede im allgemeinen Intelligenzniveau (Egan et al., 2003; Hariri et al., 2003). Zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass der relativ spezifische Einfluss auf episodisches Gedächtnis wahrscheinlich auf eine Störung der aktivitätsabhängigen Sekretion von BDNF zurückzuführen ist (Egan et al., 2003).

In den vergangenen Jahren hat sich die funktionelle Bildgebung, insbesondere die funktionelle Magnetresonanztomographie als sensitives Verfahren erwiesen, um Einflüsse genetischer Polymorphismen auf kognitive Prozesse zu charakterisieren, selbst dann, wenn in der untersuchten Gruppe kein messbarer Unterschied auf Verhaltensebene vorliegt (Bookeimer et al., 2000; Egan et al., 2001; Hariri et al., 2002) als. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die in der funktionellen Bildgebung gemessenen Parameter, also zumeist lokale Änderungen des Blutflusses bzw. der Blutoxygenierung oder – bei EEG und MEG – Potentialveränderungen an der Schädeloberfläche – enger mit den zu Grunde liegenden neuronalen Prozessen korreliert sind, als die messbaren Verhaltensparameter, welche durch eine Reihe intrinsischer und extrinsischer Parameter moduliert werden (Goldberg & Weinberger, 2004). Während beispielsweise die direkte Assoziation eines regulatorisch wirksamen Polymorphismus im Serotonin-Transporter-Gen mit Angst-

Phänotypen (Lesch et al., 1996) nur inkonsistent repliziert wurde (Serretti et al., 2006), bestätigen zahlreiche Studien die Auswirkung des Polymorphismus auf die Amygdala-Reaktivität in der fMRI-Bildgebung (Brown & Hariri, 2006).

Auch zahlreiche Gene, die für Proteine des Dopamin-Stoffwechsels und der dopaminergen Neurotransmission kodieren, weisen eine Reihe von funktionellen Polymorphismen auf, deren Auswirkungen teilweise auch zellbiologisch gut untersucht sind (Egan et al., 2001; Akil et al., 2003; Goldberg & Weinberger, 2004). Um die Rolle des dopaminergen Systems bei menschlichen Lern- und Gedächtnisprozessen zu untersuchen, bietet sich daher die Charakterisierung der Auswirkung solcher Polymorphismen an.

#### 1.3.2.5. Der Dopamin-Transporter-VNTR-Polymorphismus

Aufgrund der herausragenden Bedeutung des Dopamin-Transporters für die schnelle synaptische Inaktivierung von Dopamin, insbesondere im Striatum, sind Variationen im DAT1-Gen in der neuropsychiatrischen Genetik von herausragendem Interesse im Hinblick auf Störungen des Dopamin-Stoffwechsels. Ein Polymorphismus in der 3'-untranslatierten Region des DAT1-Gens ist durch eine unterschiedliche Anzahl von Wiederholungen einer [mit geringen Variationen] repetitiven Sequenz gekennzeichnet (*variable number of tandem repeats*, VNTR). Es wurde gezeigt, dass dieser Polymorphismus die DAT1-Expression *in vitro* (Fuke et al., 2001; Mill et al., 2002; van Ness 2005; Brookes et al., 2007) und *in vivo* (Heinz et al., 2000) beeinflussen kann, wobei das 9-Repeat-Allel mit geringerer DAT1-Expression assoziiert ist, als das häufigere 10-Repeat-Allel. Dieser VNTR-Polymorphismus wurde unter anderem mit Suchterkrankungen, dem Aufmerksamkeits-Defizit-Syndrom, aber auch mit extrapyramidalen Störungen wie dem Tourette-Syndrom assoziiert.

#### 1.3.2.6. Der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus

Catechol-O-methyl transferase (COMT) spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von Dopamin im präfrontalen Kortex (siehe oben) (Karoum et al., 1994; Matsumoto et al., 2003). Das humane COMT-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 22 (22q11.2) und ist häufig beim 22q-Deletionssyndrom mit betroffen (Gothelf et al., 2005). Ein häufiger funktioneller Polymorphismus im COMT-Gen (dbSNP: rs4680) führt zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Methionin an Position 108 der löslichen Form und an Position 158 der Membran-gebundenen Form (COMT Val108/158Met), was zu einer Thermolabilität des Proteins und zu einer 3-4-fachen Reduktion der enzymatischen Aktivität führt (Lotta et al., 1995; Chen et al., 2003). COMT Val108/158Met wurde wiederholt mit Erkrankungsrisiko für Schizophrenie assoziiert, wobei das (niedrig aktive) Met-Allel scheinbar einen protektiven Effekt hat (Egan et al., 2001; Meyer-Lindenberg et al., 2006). Bei Gesunden wurde wiederholt ein Einfluss des COMT-Polymorphismus auf Frontallappen-abhängige kognitive Funktionen gezeigt. Met-Homozygote schneiden beispielsweise besser in neuropsychologischen Tests wie dem Wisconsin-Card-Sorting-Test (WCST) ab (Egan et al., 2001; Goldberg et al., 2001). In einer

älteren Population zeigten Met-Homozygote auch eine bessere Leistung in episodischen Gedächtnistests, die auf freiem Abruf basieren (de Frias et al., 2004).

In Neuroimaging-Experimenten zum Frontallappen-abhängigen Arbeitsgedächtnis wurde bei Val-Homozygoten im Vergleich zu Met-Homozygoten eine verstärkte Aktivierung des präfrontalen Kortex beobachtet, obwohl sich die Probanden hinsichtlich ihrer Performance nicht unterschieden (Egan et al., 2001; Meyer-Lindenberg et al., 2006; Bertolino et al., 2006b). Weinberger und Kollegen vermuteten, dass dieses Phänomen ein Korrelat einer weniger effizienten präfrontalen Stimulus-Verarbeitung durch ein reduziertes Signal-Rausch-Verhältnis (signal-to-noise ratio, SNR) bei Val-Homozygoten darstellen könnte (Egan et al., 2001; Weinberger et al., 2001).

#### 1.3.2.6. Der D2-Dopamin-Rezeptor-TaqIA-Polymorphismus

In den Genen aller Dopamin-Rezeptoren wurden Polymorphismen beschrieben. Eine Reihe von Polymorphismen finden sich im DRD2-Gen auf Chromosom 11q23.1. Ein häufig untersuchter Polymorphismus ist der im 3'-untranslatierten Bereich gelegene DRD2-TaqIA-Polymorphismus, der durch das Vorhandensein bzw. Fehlen einer Schnittstelle für das Restriktionsenzym TaqI charakterisiert ist. Dieser SNP wurde bereits mit der initialen Lokalisierung des DRD2-Gens beschrieben (Grandy et al., 1989) und war seitdem Gegenstand zahlreicher genetischer Assoziationsstudien. Ein mehrfach replizierter Befund ist die Assoziation des A1-Allels mit Suchterkrankungen wie Alkoholismus, Nikotinabusus und Kokain-Abhängigkeit, obwohl die Datenlage angesichts einer Reihe negativer Befunde nach wie vor unklar ist (Noble 2000, 2003; Munafo et al., 2005). Gleichzeitig scheint das A2-Allel mit verstärkter Atrophie des Nucleus caudatus und reduzierter kognitiver Leistungsfähigkeit im Alter (Bartres-Faz et al., 2002) und mit einem erhöhten Risiko für Schizophrenie assoziiert zu sein (Dubertret et al., 2004). Durch PET und *post mortem*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das A1-Allel mit reduzierter D2-Rezeptorbindungskapazität (Pohjalainen et al., 1998; Jonsson et al., 1999; Thompson et al., 1997), aber auch mit verstärkter [präsynaptischer] Dopa-Decarboxylase-Aktivität (Laakso et al., 2005) und [zumindest bei abstinenten Alkoholikern] mit verstärkter Dopamin-Transporter-Expression (Laine et al., 2001) assoziiert ist.

### 1.4. Fragestellungen und experimentelle Ansätze

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung dopaminerger Transmission für Lern- und Gedächtnisprozesse beim Menschen anhand der Auswirkung interindividueller Unterschiede im Dopamin-Stoffwechsel auf Hirnaktivität und Lernleistung zu charakterisieren. Um die Hirnaktivität bei gesunden Menschen nicht-invasiv messen zu können, wurde die Methode der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRI) eingesetzt. Diese misst Hirnaktivität indirekt über Veränderungen des Blutflusses, wobei man sich die unterschiedlichen

magnetischen Eigenschaften von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin zu Nutze macht (BOLD-Effekt; *blood oxygen level dependent*). Logothetis und Kollegen (2001) konnten zeigen, dass das BOLD-Signal in erster Linie mit lokalen Feldpotential-Änderungen korreliert.

#### **1.4.1. Genetik des dopaminergen Systems und episodisches Gedächtnis**

Bisherige Hinweise auf eine Rolle dopaminergener Neuromodulation bei expliziter Gedächtnisbildung des Menschen stützen sich in erster Linie auf die Beobachtung, dass Regionen des Mittelhirns, die dopaminerge Zellpopulationen enthalten, bei erfolgreicher Enkodierung eine erhöhte fMRI-Aktivierung zeigen. Wenn diese Aktivierungen tatsächlich ein Korrelat erhöhter dopaminergener Transmission sind, könnten sie durch genetische Variationen im dopaminergen System beeinflusst werden. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass solche genetischen Variationen auch Aktivierungsmuster in Zielgebieten dopaminergener Projektionen beeinflussen. Um die Vermutung einer dopaminergen Modulation episodischer Enkodierung weiter zu untermauern, wurden im ersten fMRI-Experiment dieser Arbeit die Einflüsse von häufigen Polymorphismen im dopaminergen System auf fMRI-Aktivierungsmuster bei episodischer Gedächtnisbildung untersucht, wobei der DAT1 VNTR und der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus im Mittelpunkt standen. Außerdem wurden die Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf Hirnaktivität bei der episodischen Enkodierung charakterisiert.

##### *1.4.1.1. Anatomisch spezifische Einflüsse genetischer Variationen von DAT1 und COMT*

Um zu testen, wie sich allelische Variationen von DAT1, COMT und DRD2 auf Hirnaktivität bei episodischer Enkodierung auswirken, wurde ein Ereignis-bezogenes fMRI-Experiment, durchgeführt, in dem die Probanden Wörter mit unterschiedlicher Verarbeitungstiefe (LOP, s. o.) lernten. Durch Vergleich der Korrelate von LOP und DM war es so möglich, Effekte zu isolieren, die spezifisch für die episodische Enkodierung sind. Als tiefe Verarbeitungsbedingung wurde eine Angenehm/unangenehm-Entscheidung gewählt, als oberflächliche Verarbeitungsbedingung diente eine Silben-Zählaufgabe. Es war zuvor gezeigt worden, dass diese Aufgaben auf Verhaltensebene zu einem stabilen LOP-Effekt [i. e. besserer Abruf der tief verarbeiteten Wörter] bei episodischer Enkodierung führen, aber einen vergleichbaren Einfluss auf implizites *Priming* der zu lernenden Wörter haben (Richardson-Klavehn & Gardiner 1998; Schott et al., 2002). Da eine Aktivierung dopaminergener Mittelhirnareale bei episodischer Gedächtnisbildung unabhängig von LOP beobachtet worden war (siehe Anhang 6.1.2.), war eine Modulation der Mittelhirnaktivität als Funktion von späterem Erinnern (DM-Effekt, difference due to [subsequent] memory; Paller et al., 1987) erwartet worden, aber nicht in Abhängigkeit von LOP. Das experimentelle Paradigma war daher faktoriell ausgelegt, um Effekte von LOP und späterem Erinnern dissoziieren zu können (Schott et al., 2002).

Aufgrund der bekannten Auswirkungen der Polymorphismen auf die synaptische Inaktivierung von Dopamin wurde die Hypothese aufgestellt, dass der DAT1-Polymorphismus und möglicherweise auch der COMT-Polymorphismus die Mittelhirnaktivierung bei erfolgreicher episodischer Enkodierung modulieren könnte. Daneben wurde erwartet, dass der DAT1-VNTR die Gedächtnis-bezogene Aktivität in Regionen mit hoher DAT1-Expression wie dem Striatum beeinflussen könnte. Aufgrund der besonderen Rolle von COMT bei der präfrontalen Inaktivierung von Dopamin wurde außerdem die Hypothese aufgestellt, dass COMT Val108/158Met mit Unterschieden in der präfrontalen Aktivierung einhergehen würde und dass Val-Homozygote – ähnlich wie zuvor für Arbeitsgedächtnisaufgaben berichtet worden war – eine stärkere Aktivierung im PFC zeigen würden (Egan et al., 2001).

#### *1.4.1.2. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus*

Über die Auswirkungen des TaqIA-Polymorphismus des D2-Dopamin-Rezeptors konnten keine anatomisch so spezifischen Hypothesen aufgestellt werden, da seine Verteilung und Auswirkung deutlich komplexer ist. DRD2 findet sich postsynaptisch in hoher Konzentration im Striatum und wird außerdem präsynaptisch an dopaminergen Terminals in vielen kortikalen und subkortikalen Regionen exprimiert, wobei die Funktion der präsynaptischen D2-Rezeptoren in erster Linie eine autoinhibitorische ist. Insbesondere aufgrund dieser Funktion des Rezeptors wurde ein möglicher Einfluss auf die Mittelhirnaktivierung bei episodischer Gedächtnisbildung angenommen. Daneben wurde eine mögliche Modulation der striatalen, aber auch der kortikalen Aktivierung durch DRD2 TaqIA vermutet.

#### **1.4.2. Auswirkung von Alter und M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen**

Im zweiten fMRI-Experiment sollte die Auswirkungen physiologischer (Altern) und pathologischer (M. Parkinson) Zustände reduzierter dopaminergener Aktivität auf Belohnungs-Assoziationslernen untersucht werden. Insbesondere sollte geklärt werden, ob bei Belohnungs-assoziiertem Lernen im Alter und bei M. Parkinson die Generierung dopaminergener Prädiktionsfehler gestört ist, oder ob ältere Menschen und Parkinson-Patienten Probleme haben, diese Prädiktionsfehler zu benutzen, um EVs zu berechnen, die notwendig sind, um künftige Belohnungen korrekt zu prädictieren. Eine reduzierte Antwort des ventralen Striatums bei der Belohnungs-Prädiktion bei erhaltener Antwort auf das Belohnungs-Feedback würde für die letztere Hypothese sprechen, während ein generelle Reduktion bzw. ein Ausbleiben einer ventral-striatalen Antwort ein Hinweis auf eine allgemeinere Störung der Verarbeitung dopaminergener Prädiktionsfehler wäre. Es wurde daher ein fMRI-Paradigma verwendet, das eine zuverlässige Dissoziation der neuronalen Korrelate von Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback erlaubt (Wittmann et al., 2005).

Außerdem war bisher nicht bekannt, ob sich die neuronalen Mechanismen, die gestörtem Belohnungs-Assoziationslernen bei gesunden Älteren und Patienten zu Grunde liegen qualitativ oder lediglich quantitativ unterscheiden. Bei der Untersuchung dieser Fragestellung musste berücksichtigt werden, dass mögliche qualitative Unterschiede bei der Belohnungsverarbeitung zwischen Parkinson-Patienten und gesunden älteren Probanden bei den Patienten parallel mit Alterseffekten auftreten würden, da die Patientengruppe eine vergleichbare Altersstruktur aufwies wie die gesunden Älteren.

### **1.4.3. Zellbiologische Fragestellungen zur Dopamin-Inaktivierung**

#### *1.4.3.1. Wird der Dopamin-Transporter im humanen Hippocampus exprimiert?*

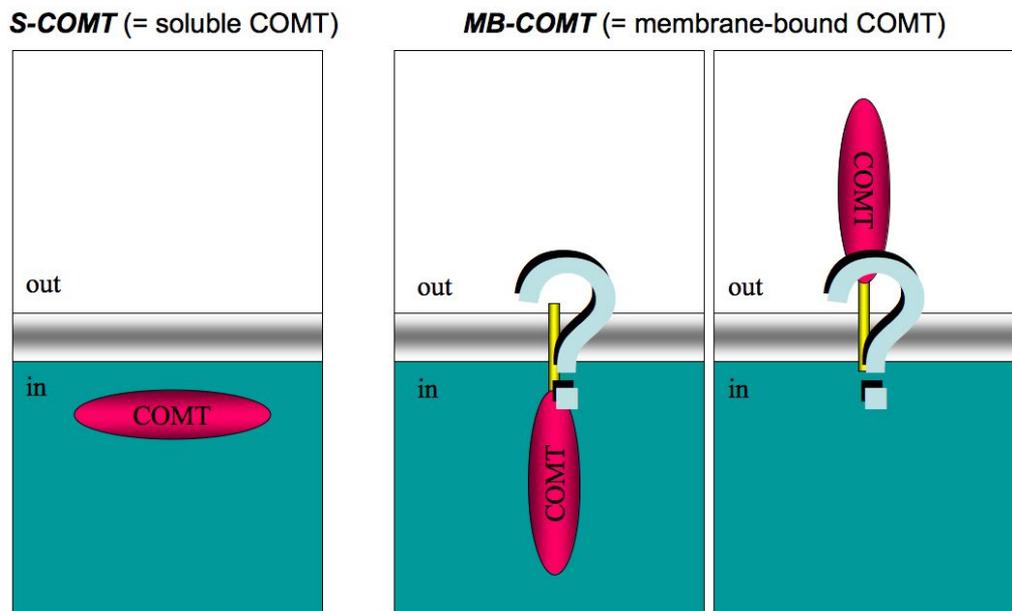
Während die Verteilung von Dopamin-Rezeptoren im Hippocampus relativ gut charakterisiert ist (Meador-Woodruff et al., 1994; Bergson et al., 1995), ist wenig über Art und Ausmaß der präsynaptischen dopaminergen Innervation des menschlichen Hippocampus bekannt. Das Modell der Hippocampus-VTA-Schleife (Lisman & Grace, 2005; siehe 1.2.3.4.) setzt eine direkte dopaminerge Innervation des Hippocampus voraus. Zwar wurden Tyrosin-Hydroxylase-positive Fasern im Hippocampus nachgewiesen (Verney et al., 1985), doch ist die Art der Terminierung des Dopamin-Signals in dieser Region bisher nicht bekannt. Diese könnte möglicherweise entscheidenden Einfluss auf die zeitliche Kinetik des hippocampalen Dopamin-Signals haben.

#### *1.4.3.2. Ist MB-COMT in Neuronen intra-oder extrazellulär orientiert?*

In Neuronen wird in erster Linie MB-COMT exprimiert, und wahrscheinlich ist diese Isoform auch *in vivo* für den Großteil der COMT-abhängigen Metabolisierung von Dopamin [und Noradrenalin] im ZNS verantwortlich. (Reenilä & Männistö, 2001). MB-COMT findet sich in hoher Konzentration an synaptischen Membranen, was für eine postsynaptische Dopamin-Inaktivierung spricht (Karhunen et al., 1995). Aufgrund dieser Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass es entweder einen alternativen, postsynaptischen, Dopamin-Aufnahmemechanismus gibt oder, dass COMT zumindest teilweise extrazellulär aktiv ist. Für nicht-neuronale Zellen wurde zwar bereits eine intrazelluläre Orientierung der MB-COMT gezeigt (Ulmanen et al., 1997), dagegen war die Orientierung neuronaler MB-COMT bisher unklar (Abb. 1.10).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden COMT-GFP-Fusionskonstrukte generiert und transfizierte Kortex-Neurone vor und nach Permeabilisierung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern immunocytochemisch untersucht. Bei einer extrazellulären Orientierung müsste sich bereits ohne Permeabilisierung eine Überlagerung von GFP-Autofluoreszenz und Antikörper-Fluoreszenz zeigen, bei intrazellulärer Orientierung erst nach Permeabilisierung. Um eine ausschließliche Expression von MB-COMT zu erhalten, musste das Startcodon der S-COMT mutiert werden, da es bei der Translation der MB-COMT-mRNA ebenfalls als Startcodon

funktionieren kann, was zu einer Ko-Expression von MB-COMT und S-COMT führt (Ulfmanen et al., 1997)



**Abb. 1.10: Lösliche und membranständige COMT.** Während die lösliche COMT eindeutig intrazellulär lokalisiert ist (links), ist bisher nicht geklärt, ob die aktive Domäne der membranständigen COMT in Neuronen intrazellulär (Mitte) oder extrazellulär (rechts) orientiert ist.

## **2. Methoden**

Alle Untersuchungen an menschlichen Probanden (fMRI-Untersuchungen, Genotypisierungen) oder an menschlichem *post-mortem*-Gewebe (Immunhistochemie, Western Blots) wurden entsprechend den Genehmigungen der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg durchgeführt.

### **2.1. MRT-Untersuchungen**

#### **2.1.1. fMRI-Experiment 1: Genetische Variabilität im Dopamin-System und episodische Gedächtnisbildung beim Menschen**

Im ersten fMRI-Experiment wurde die Auswirkung von genetischen Polymorphismen im dopaminergen System auf die funktionell-anatomischen Korrelate erfolgreicher episodischer Enkodierung von Wörtern untersucht. Dabei wurde ein DM-Effekt-Paradigma mit freiem Abruf verwendet.

##### *2.1.1.1. Probanden*

51 junge Erwachsene (Alter 18 – 31 Jahre, 35 Frauen; siehe auch Tab. 3.1) wurden als Studienteilnehmer rekrutiert. Alle Teilnehmer waren nach eigenen Angaben Rechtshänder und hatten Deutsch als Muttersprache. Nach Ausschluss von MRT-Kontraindikationen erfolgte eine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme. Neurologische oder psychiatrische Erkrankungen sowie die Einnahme zentralnervös wirksamer Medikamente stellte ein Ausschlusskriterium für die Teilnahme dar. Alle Probanden hatten unauffällige T1-gewichtete MRT-Aufnahmen.

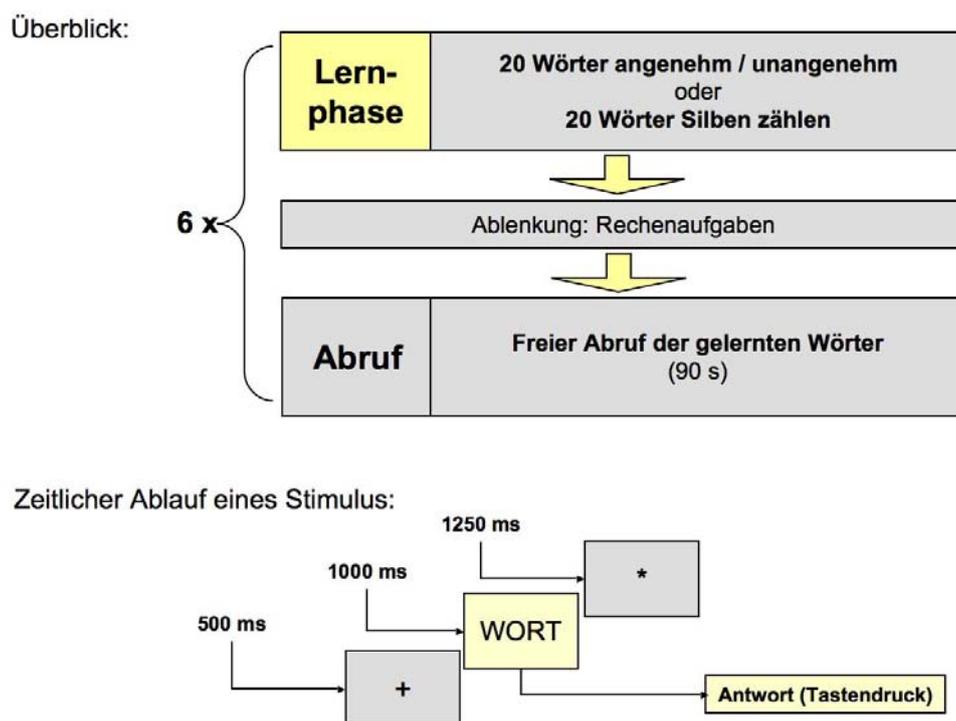
##### *2.1.1.2. Paradigma*

Um die neuronalen Korrelate erfolgreicher episodischer Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurden Hirnaktivitätsmuster bei der Enkodierung visuell präsentierter Wörter in Abhängigkeit von späterem Erinnern versus Vergessen verglichen (Paller et al., 1987; Wagner et al., 1998; Otten et al., 2002; Schott et al., 2002, 2004; siehe auch Anhang 6.1.2.).

Den Teilnehmern wurden Wörter präsentiert, die sie mit unterschiedlicher Verarbeitungstiefe (LOP; Richardson-Klavehn & Gardiner, 1996, 1998) prozessieren sollten. Das Experiment bestand aus drei Durchgängen, von denen jeder drei Lernphasen mit einer tiefen Verarbeitungsaufgabe und drei Lernphasen mit einer oberflächlichen Verarbeitungsaufgabe enthielt. In der tiefen Verarbeitungsaufgabe wurden die Probanden instruiert, zu entscheiden, ob ihnen ein Wort in seiner Bedeutung eher angenehm oder eher unangenehm war. Bei neutralen Wörtern sollten sie persönliche Assoziationen mit diesem Wort bei ihrer Entscheidung verwenden. In der oberflächlichen Verarbeitungsaufgabe wurden die Teilnehmer instruiert, zu entscheiden, ob ein Wort genau zwei Silben oder eine andere Anzahl von Silben hat. In beiden Aufgaben erfolgte die Antwort per Tastendruck mit dem

linken und rechten Zeigefinger, wobei die Zuordnung der Tasten zu den Antworten (angenehm vs. unangenehm und zweisilbig vs. andere Anzahl Silben) über die Probanden gewechselt wurde.

In jeder Lernliste wurden 20 deutsche Wörter präsentiert. Nach Präsentation eines Fixationskreuzes für 500 ms folgte das Studienwort für 1000 ms, gefolgt von einer weiteren, durch einen Stern (\*) gekennzeichneten Fixationsphase. Nach jeder Lernliste folgte eine kurze Ablenkungsaufgabe, bestehend aus vier Rechenaufgaben (Additionen zwei- und dreistelliger Zahlen), bei denen die Probanden durch Tastendruck angeben sollten, ob das Ergebnis stimmte oder nicht. Nach der Ablenkungsaufgabe wurden die Probanden durch die Aufforderung „Bitte sprechen“ angewiesen, frei alle Wörter laut zu sagen, die sie noch erinnern konnten. Dazu hatten sie 90 Sekunden Zeit. Die Antworten wurden durch ein Mikrophon, das am unteren Ende der Kopfspule befestigt war, aufgezeichnet und anschließend off-line ausgewertet. Abbildung 2.1. zeigt den Aufbau des gesamten Experiments sowie eines einzelnen Lerndurchgangs.



**Abb. 2.1: Übersicht über den Ablauf von Experiment 1.** Oben: Jede der drei Sitzungen bestand aus sechs Durchgängen mit je 20 Wörtern. Nach der Lernaufgabe folgte eine Ablenkungsaufgabe (arithmetische Operationen), gefolgt von 90 s freiem Abruf. Unten: Übersicht über die zeitliche Abfolge der Präsentation einzelner Wörter. *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006, supplementary online material.*

### 2.1.1.3. Bildakquisition

Alle MRT-Bilder in Experiment 1 wurden mit einem GE 1.5 T Signa Magnetresonanztomographen (General Electric Medical Systems) unter Verwendung einer Standard-Kopfspule aufgenommen. In drei Durchgängen wurden jeweils 544 echo-planare

T2\*-gewichtete Ganzkopf-MRT-Bilder (T2\*-EPIs) mit einer Repetitionszeit (TR) von 2.0 s und einer Echozeit (TE) von 35 ms aufgenommen. Jedes Bild bestand aus 23 axialen Schichten [64 x 64 Voxel, Voxelgröße = 3.13 x 3.13 x 6 mm (5 mm Schichtdicke + 1 mm Abstand zwischen den Schichten)] und wurde in Zweierschritten (zunächst Schicht 1 – 23, anschließend Schicht 2 – 22, von kaudal nach kranial) akquiriert. Die ersten vier Bilder jedes Durchlaufs wurden verworfen, um Artefakte durch den Aufbau der Magnetisierung am Beginn der Messung zu vermeiden.

#### 2.1.1.4. Bildvorverarbeitung und Datenanalyse

Bildvorverarbeitung und Datenanalyse wurde mittels *Statistical Parametric Mapping* (SPM2, Wellcome Department of Imaging Neuroscience, London, England) durchgeführt. Zunächst wurde über alle T2\*-EPIs eine Korrektur für die Aufnahmezeiten der einzelnen Schichten innerhalb der Volumen durchgeführt (*slice timing*). Anschließend wurden die so korrigierten Bilder mittels einer affinen Rigid-Body-Transformation Bewegungskorrigiert und durch eine Kombination linearer und nicht-linearer Abbildungen in ein gemeinsames Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute, MNI) normalisiert (Voxelgröße: 3 x 3 x 3 mm). Die normalisierten Bilder wurden mit einem dreidimensionalen Gauss-Filter [Halbwertsbreite / *full width half maximum* (FWHM) = 8 mm] geglättet. Schließlich wurden die so vorverarbeiteten Daten mit einem Hochpass-Filter von 128 s zeitlich gefiltert, um die Daten für mögliche langsame, unsystematische Veränderungen der Signalintensität zu korrigieren.

In SPM wird der Vergleich des theoretisch vorhergesagten Zeitverlaufs mit dem tatsächlichen Zeitverlauf auf der Grundlage des Allgemeinen Linearen Modells (*general linear model*, GLM; siehe Anhang 6.3.1) durchgeführt. Dieses beruht auf der Annahme, dass sich ein beobachteter Wert  $Y$  durch eine Linearkombination von gewichteten erklärenden Variablen  $\beta x$  beschreiben lässt, wobei  $x$  die erklärende Variable und  $\beta$  der Wichtungsfaktor ist. Eine das lineare Gleichungssystem eines experimentellen Designs beschreibende Matrix wird als Designmatrix bezeichnet. Die Spalten einer Designmatrix enthalten dabei die Regressoren des Experiments (z. B. Versuchsbedingungen, Kovariaten), und die Zeilen enthalten den zeitlichen Verlauf des Signals. Da sich der gemessene Wert  $Y_i$  in der Praxis nie vollständig durch die in der Matrix definierte Linearkombination erklären lässt, wird das GLM um einen Fehlerterm  $\varepsilon$  ergänzt. Durch die Methode der kleinsten Quadrate können Schätzwerte der Parameter  $\beta$  so bestimmt werden, dass  $\varepsilon$  minimiert wird. Die erhaltenen Parameter-Schätzwerte sind normalverteilt, womit eine statistische Überprüfung der Modellanpassung durch Kontraste (typischerweise t- oder F-Kontraste) möglich wird. Die so erhaltenen Kontraste der Einzelprobanden können dann einer Analyse der zweiten Ordnung zugeführt werden. Bei der „klassischen“ SPM-Statistik wird dabei eine Zufallseffekt-Analyse (*random effects*) angewandt, in die die Zwischensubjekt-Varianz als Zufallseffekt in den Fehlerterm eingeht (Holmes & Friston, 1998).

Die statistische Analyse der Daten in diesem Experiment wurde in einem solchen zweistufigen *Mixed-Effects*-Modell durchgeführt. In der ersten Stufe wurde für jeden einzelnen Probanden die neuronale Aktivität als eine Funktion am Beginn jedes Stimulus modelliert ( $\delta$ -Funktionen [siehe Anhang 6.3.1.] für Einzelereignisse, Konstanten für zeitlich ausgedehnte Ereignisse). Die Blutoxygenierungs-abhängige (*blood oxygen level-dependent*, BOLD) Antwort auf einen Stimulus wurde aus einer Konvolution dieser Funktionen mit einer kanonischen hämodynamischen Antwortfunktion (*hemodynamic response function*, HRF) erhalten. Die so erhaltenen Zeitverläufe dienten als Regressoren für ein Allgemeines Lineares Modell. Im einzelnen bestand das Modell aus Regressoren für die kritischen Bedingungen (*deep hits*, *deep misses*, *shallow hits*, *shallow misses*), sowie aus Kovariaten für die Sprachereignisse (gesprochene Antwort während des freien Abrufs), für die Ablenkungsaufgabe (20-Sekunden-Epoche) und für die sechs [aus der Bewegungskorrektur erhaltenen] Rigid-Body-Bewegungsparameter sowie einer einzelnen Konstante für den Mittelwert über die Messungen.

Die zweite Stufe des Modells bestand aus *Random-Effects*-Analysen über die Kontraste der Einzelprobanden. Um den Gesamteffekt der Verarbeitungstiefe (LOP, tiefe vs. oberflächliche Verarbeitung) sowie der erfolgreichen Enkodierung zu ermitteln, wurden die Kontrastbilder der Einzelprobanden [LOP-Kontrast: (*deep hits* + *deep misses*) – (*shallow hits* + *shallow misses*); DM-Kontrast: (*deep hits* + *shallow hits*) – (*deep misses* + *shallow misses*)] Voxelweise mittels t-Tests gegen 0 getestet. Das Signifikanz-Niveau für die Gesamtgruppen-Analysen wurde auf .05 (*Family-wise-error*-korrigiert für das gesamte Hirnvolumen; Shaffer, 1995) festgelegt, mit einer minimalen Clustergröße  $k$  von 10 benachbarten Voxeln.

Um Unterschiede der Enkodierungs-spezifischen Hirnaktivität als Funktion des DAT1-VNTR-Polymorphismus zu untersuchen, wurden die DM-Kontraste der in der Studienpopulation identifizierten Träger des 9-Repeat-Allels ( $n = 17$ ; 7 9/9-Homozygote, 10 9/10-Heterozygote) mit denen einer Gruppe von 20 10-Repeat-Homozygoten verglichen, die von der Alters- und Geschlechterverteilung her angepasst worden war (siehe Tab. 1, linke Spalte für detaillierte demographische Daten). Zur Untersuchung der vom COMT-Val108/158Met-Polymorphismus beeinflussten Enkodierungs-spezifischen Effekte wurden die DM-Kontraste der Val-Homozygoten ( $n = 17$ ) mit denen der Met-Homozygoten ( $n = 15$ ; siehe Tab. 1, rechte Spalte) verglichen. Aufgrund der *a priori*-Hypothese, dass genetische Variationen in DAT1 und COMT die Enkodierungs-bezogene Aktivität des dopaminergen Mittelhirns beeinflussen würden, wurden separate *Region-of-Interest*-(ROI-) Analysen für das linke und rechte Mittelhirn durchgeführt. Dazu wurde die Substantia nigra auf beiden Seiten aus dem normalisierten und gemittelten Magnetisierungs-Transfer-Bild (siehe unten) unter Verwendung der MRICRO-Software (<http://www.sph.sc.edu/comd/rorden/mricro.html>) segmentiert (Siehe Abb. 3.3A). Mit Hilfe der Marsbar-ROI-Analyse-Software für SPM (Brett

et al., 2002), wurden t-Tests für unabhängige Stichproben (DAT1: 9-Repeat-Träger vs. 10-Homozygote; COMT: Val/Val vs. Met/Met; DRD2: A1-Träger vs. A2/A2) über die mittleren DM-Kontraste im Bereich des Mittelhirns durchgeführt. Das Signifikanz-Niveau dafür wurde auf  $p = .05$  (korrigiert für das Volumen der ROI) festgelegt. Analog wurden ROI-Analysen für die LOP-Kontraste in der Amygdala durchgeführt (siehe auch Fenker et al., 2005). Die Segmentierung der Amygdala erfolgte aus einer normalisierten T1-gewichteten MRT-Aufnahme (3D-SPGR; siehe unten) einer Studienteilnehmerin.

Um Enkodierungs-spezifische Effekte des DAT1-Genotyps auf Hirnaktivierungen außerhalb des Mittelhirns zu untersuchen, wurden Voxel-weise t-Tests für unabhängige Stichproben über die DM-Kontraste durchgeführt, wobei, wie bei der ROI-Analyse, 9-Repeat-Träger mit 10-Repeat-Homozygoten verglichen wurden. Entsprechend wurden auch Voxel-weise t-Tests für unabhängige Stichproben verwendet, um die DM-Kontraste der COMT 108/158 Val-Homozygoten und Met-Homozygoten statistisch zu vergleichen. Das Signifikanz-Niveau für die Voxel-weisen Zwischengruppen-t-Tests wurde auf .005 (unkorrigiert) festgelegt, mit einer minimalen Clustergröße  $k$  von 10 benachbarten Voxeln. Wegen eines vermuteten Gen-Dosis-Effektes des COMT Val108/158Met-Polymorphismus auf Gedächtnis-bezogene Hirnaktivität wurde eine Regressions-Analyse der DM-Kontraste durchgeführt, wobei die Anzahl der Met-Allele (0, 1 oder 2) als unabhängige Variable diente.

Neben dem Genotyp von Interesse kann eine Reihe konfundierender Variablen ebenfalls zu Zwischengruppen-Unterschieden der fMRI-Aktivierungsmuster führen. Um die Reliabilität der Zwischengruppen-Effekte des DAT1 VNTR, des COMT Val108/158Met-Polymorphismus und des DRD2-TaqIA-Polymorphismus zu überprüfen wurden deshalb die Parameter-Schätzwerte (SPM-Betas) der lokalen Aktivierungsmaxima einer Bootstrap-Analyse zugeführt (Efron & Tibshirani, 1993). Dazu wurden mittels Bootstrap-Resampling die 95%-Konfidenz-Intervalle der SPM-Betas für beide Gruppen (DAT1 10/10 vs. 9-Repeat-Träger, und COMT Val/Val vs. Met/Met) unter Verwendung der T-Perzentilen-Methode abgeschätzt (10000 Iterationen für die Intervall-Schätzung; 200 Iterationen für die Varianz-Schätzung). Lokale Aktivierungsmaxima, deren 95%-Konfidenz-Intervalle in mindestens einer Lernbedingung (tiefe oder oberflächliche Verarbeitung) nicht überlappten, wurden als reliabel angesehen.

#### *2.1.1.5. Analyse der funktionellen Konnektivität*

Um die Auswirkungen des DAT1-VNTR und des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus auf die funktionelle Kopplung zwischen dem Hippocampus und dem präfrontalen Kortex zu untersuchen, wurde eine modifizierte Version der Psychophysiologischen Interaktions-Methode (PPI) verwendet (Friston et al., 1997; Gitelman et al., 2003; Das et al., 2005; für eine vergleichbare Anwendung des PPI-Verfahrens bei der Untersuchung von Auswirkungen genetischer Polymorphismen siehe Heinz et al., 2005).

Durch PPI-Analyse lässt sich die funktionelle Interaktion zwischen unterschiedlichen Hirnregionen in Abhängigkeit von einer psychologischen Variablen ermitteln, wobei hier die erfolgreiche vs. erfolglose Enkodierung von Wörtern als psychologische Variable gewählt wurde. Die Rolle des präfrontalen Kortex bei der erfolgreichen Enkodierung verbaler Stimuli in das episodische Gedächtnis (Otten et al., 2001, 2002; Tulving et al., 2002; Wagner et al., 1998) ist gut dokumentiert, und die t-Test-basierten Vergleiche der Genotyp-Gruppen bestätigten, dass eine Modulation der Aktivität in Regionen des präfrontalen Kortex zu erwarten sein würde (Abb. 3.5 – 3.7). Daher wurde die PPI-Analyse auf die Untersuchung der funktionellen Interaktion zwischen dem Hippocampus und Hirnregionen im Bereich der Frontallappen begrenzt.

Für jeden Probanden diente eine Kugel mit dem Mittelpunkt im individuellen lokalen Maximum innerhalb des linken anterioren Hippocampus und einem Radius von 6 mm als Zielvolumen (*volume of interest*, VOI; siehe Abb. 3.8A). Die erste Eigenvariante der zeitlichen Signaländerung in dieses VOI wurde extrahiert und mit der kanonischen HRF dekonvolviert, wobei der in SPM2 implementierte Bayes'sche Dekonvolutionsalgorithmus eingesetzt wurde (Gitelman et al., 2003). Der daraus resultierende Zeitverlauf wurde mit einer psychologischen Funktion  $P$  der Zeit  $t$  [in Scans] konvolviert, wobei  $P$  den Wert +1 für alle Zeitpunkte der Präsentation später erinnelter Wörter, den Wert -1 für alle Zeitpunkte später vergessener Wörter und den Wert 0 für alle übrigen Zeitpunkte annahm. Durch Rekonvolution der resultierenden Funktion mit der HRF wurde eine Interaktionsfunktion  $X$  erhalten, die die erste Spalte der Design-Matrix eines neuen Allgemeinen Linearen Modells bildete.  $P$  selbst wurde ebenfalls mit der HRF konvolviert und bildete einen zweiten Regressor. Der dritte Regressor war die ursprüngliche (nicht dekonvolvierte) BOLD-Eigenvariante. Die sechs *Rigid-Body*-Bewegungsparameter, die aus der Bewegungskorrektur erhalten worden waren, und eine Konstante, die den Mittelwert der Scans repräsentierte, wurden als weitere Kovariaten in die Design-Matrix des Modells übernommen. Die Modell-Schätzung erfolgte wie bei der Ermittlung der BOLD-Kontraste (s. o.). Voxel-weise t-Test-Kontraste (im Folgenden als PPI-Kontraste bezeichnet), die die Interaktionsvariable  $X$  gegen 0 testeten, wurden für alle Einzelprobanden berechnet, und die daraus resultierenden Kontrast-Bilder wurden, wie oben beschrieben, *Random-Effects-Analysen* zugeführt, unter Verwendung der gleichen Signifikanzniveaus. Im Einzelnen wurde die funktionelle Kopplung des Hippocampus mit anderen Hirnregionen durch einen Voxel-weisen t-Test für eine Stichprobe über die PPI-Kontraste ermittelt, und Zwischengruppen-Effekte wurden durch t-Tests für unverbundene Stichproben über die PPI-Kontraste untersucht.

### **2.1.2. fMRI-Experiment 2: Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson**

Ziel des zweiten fMRI-Experimentes war es, zu untersuchen, wie sich physiologische Veränderungen des Dopamin-Systems im Alter und pathologische Prozesse bei der Parkinsonschen Erkrankung auf Dopamin-abhängige Lernprozesse auswirken. Dazu wurde ein Stimulus-Belohnungs-Assoziationsparadigma verwendet, das es ermöglicht, Effekte von Belohnungserwartung und der eigentlichen Belohnung zu unterscheiden (Wittmann et al., 2005).

#### **2.1.2.1. Probanden**

Insgesamt nahmen 48 Versuchspersonen am zweiten fMRI-Experiment teil, davon 18 gesunde junge Erwachsene, 19 gesunde ältere Erwachsene, und 11 Patienten mit idiopathischer Parkinson-Erkrankung. Weitere demographische Daten finden sich in Tabelle 3.5. Die Diagnose eines idiopathischen M. Parkinson stützte sich auf ausführliche klinische Untersuchungen, asymmetrische Dopamin-Transporter-Reduktion in der [<sup>123</sup>I]-FP-CIT-SPECT und klinisch relevantes Ansprechen auf L-DOPA. Asymmetrische Hyperechogenität der Substantia nigra in der Hirnparenchym-Sonographie wurde zur zusätzlichen Unterstützung der Diagnose herangezogen (Becker et al., 1995; Walter et al., 2003). Zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten alle Patienten eine milde, lateralisierte Symptomatik ohne signifikante Behinderung (Hoehn und Yahr Stadium I) und antworteten mit der nicht betroffenen Seite (siehe unten). Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung für mindestens 48 Stunden ohne Medikation [drei Patienten hatten zuvor L-DOPA oder einen Dopamin-Agonisten für maximal drei Monate eingenommen; alle anderen hatten noch keine Medikation erhalten].

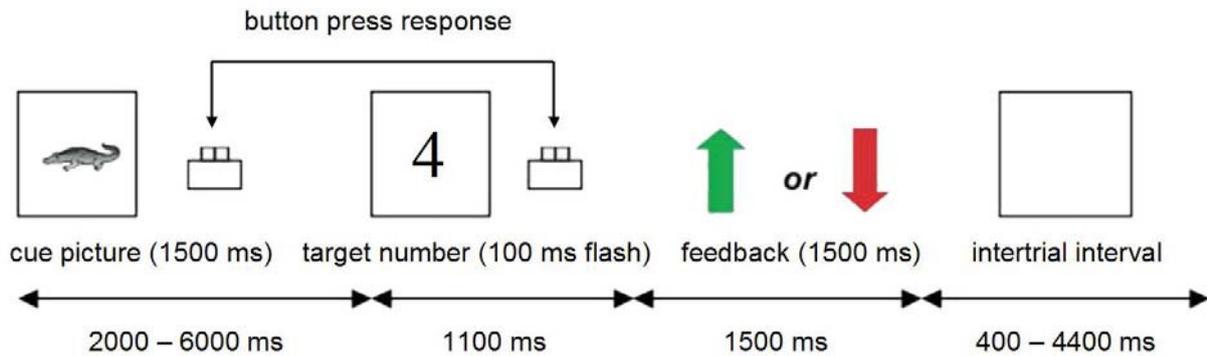
#### **2.1.2.2. Paradigma**

Als Paradigma wurde eine durch ein früheres Experiment etablierte Stimulus-Belohnungs-Assoziationsaufgabe verwendet (Wittmann et al., 2005), mit der es möglich war, die neuronalen Korrelate von Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback zu trennen. Diese Dissoziation wurde dadurch erreicht, dass den Probanden zunächst ein Hinweisbild (*Cue*) präsentiert wurde, das die Chance auf eine Belohnung (oder die Abwesenheit einer Belohnung) in einer folgenden einfachen arithmetischen Aufgabe ankündigte, wobei aber die Belohnung selbst von der Reaktion in dieser Aufgabe und nicht von der Reaktion auf den Hinweis selbst, abhing (Kirsch et al., 2003, Wittmann 2005). Vor Beginn des eigentlichen fMRI-Experimentes wurden die Probanden schriftlich instruiert (siehe Anhang 6.2.), und die Aufgabe wurde am Computer demonstriert. Danach führten die Probanden eine 3.5 min dauernde Übungsaufgabe durch, die bereits belohnt war. Dadurch sollte eine zeitliche Verschiebung der Belohnungsantwort vom Zeitpunkt der Belohnung zum Zeitpunkt der Belohnungserwartung erreicht werden (Knutson et al., 2001; Wittmann 2005). Nachdem die Probanden im MR-Tomographen positioniert worden waren, wurden zunächst T1-gewichtete

MR-Aufnahmen zur Ausrichtung der Schichtführung durchgeführt. Es folgten zwei funktionelle Serien von je 8 min, während denen die Belohnungsaufgabe durchgeführt wurde.

Während der beiden funktionellen MRT-Messungen wurden jeweils 60 Durchgänge von 4.6 – 8.6 s Dauer ausgeführt (Abb. 2.2). Die Aufgaben bestanden je zur Hälfte aus belohnten und unbelohnten Durchgängen. Im ersten Teil eines Durchgangs sahen die Probanden Hinweisbilder (S/W-Zeichnungen lebender und unbelebter Objekte; Rossion & Pourtois, 2004) für 1500 ms und antworteten per Tastendruck (Zeigefinger oder Mittelfinger), ob sie eine Belohnung erwarteten oder nicht. Bei der Hälfte der Probanden dienten Lebewesen oder Teile davon als Belohnungshinweis (Tiere, Pflanzen, Früchte, Gemüse oder Körperteile), bei der anderen Hälfte folgte die Belohnung auf unbelebte Objekte. Nach einem variablen Zeitintervall (500 – 4500 ms) erschien eine einstellige Zahl auf dem Bildschirm (*Target*, Präsentationsdauer 100 ms), und die Probanden antworteten per Tastendruck, ob die Zahl größer oder kleiner als 5 war. 1000 ms nach der Präsentation der Zahl folgte ein visuelles Feedback für 1500 ms. In „belohnten“ Durchgängen erhielten die Probanden ein positives Feedback (grüner Pfeil nach oben), wenn sie schnell genug und richtig geantwortet hatten und ein negatives Feedback (roter Pfeil nach unten), wenn die Antwort falsch war oder zu langsam erfolgte. In belohnten Durchgängen erhielten die Probanden €0.50 für korrekte, rechtzeitige Antworten, bei falschen oder verspäteten Antworten wurden €0.20 abgezogen. In unbelohnten Durchgängen änderte sich der Kontostand, unabhängig von der Antwort der Probanden, nicht. Die erforderliche Reaktionszeit für die Tastendruck-Antwort war zuvor individuell angepasst worden, basierend auf den Reaktionszeiten in der Trainingsaufgabe außerhalb des MR-Tomographen. Dabei wurde die erforderliche Reaktionszeit so gewählt, dass die Probanden in ca. 80% der belohnten Einzelaufgaben ein positives Feedback erhielten. In den „unbelohnten“ Durchgängen wurde, unabhängig davon, ob die Antwort korrekt und rechtzeitig erfolgte, stets ein neutrales Feedback („?“) gegeben. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen Durchgängen wurde variabel von 500 – 4500 ms gewählt, um so, zusammen mit dem variablen Intervall zwischen Hinweisbild und Zahl, eine zeitliche Dekorrelation von Belohnungserwartung und Belohnung zu erhalten, was eine Dissoziation der hämodynamischen Korrelate beider Prozesse erlaubte (Knutson et al., 2001; Wittmann et al., 2005).

Um die Auswirkungen der motorischen Beeinträchtigung bei M. Parkinson auf die Durchführung der Aufgabe und auf die fMRI-Aktivierungsmuster zu minimieren, antworteten alle Patienten mit der nicht betroffenen Hand (entsprechend der klinischen Untersuchung und der SPECT-Diagnostik), und gesunde (junge und ältere Probanden) antworteten so mit der linken bzw. rechten Hand, dass jeweils die Hälfte der Versuchsteilnehmer mit der dominanten bzw. nicht-dominanten Hand antwortete.



**Abb. 2.2: Übersicht einen belohnten Durchgang bei Experiment 2.** Bei unbelohnten Durchgängen erfolgte anstelle des positiven oder negativen Feedbacks (grüner bzw. roter Pfeil) ein Fragezeichen („?“) als neutrales Feedback. *Bild übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*

### 2.1.2.3. Bildakquisition

Alle MRT-Bilder in Experiment 2 wurden mit dem gleichen GE 1.5 T Signa Magnetresonanztomographen wie in Experiment 1, unter Verwendung der gleichen Standard-Kopfspule aufgenommen. In zwei Durchgängen wurden jeweils 246 Ganzkopf- T2\*-EPs aufgenommen (TR = 2.0 s, TE = 35 ms, 23 axiale Schichten, 64 x 64 Voxel, Voxelgröße = 3.13 x 3.13 x 6 mm [5 mm Schichtdicke + 1 mm Abstand zwischen den Schichten], Akquisition in Zweierschritten wie in Experiment 1). Die ersten sechs Bilder jedes Durchlaufs wurden verworfen, um eine stabile Magnetisierung über die Dauer der Messung zu erhalten.

### 2.1.2.4. Bildvorverarbeitung und Datenanalyse

Bildvorverarbeitung und Datenanalyse erfolgten mit SPM2 und wurden grundsätzlich analog zu Experiment 1 durchgeführt. Slice timing, Bewegungskorrektur, Normalisierung, Glättung und Hochpass-Filterung erfolgten mit den gleichen Parametern wie in Experiment 1.

Die statistische Analyse der Daten wurde, wie in Experiment 1, mit einem zweistufigen *Mixed-Effects-Modell* durchgeführt. Kovariaten für die erste Stufe des Modells (Einzelprobanden-Statistik) bildeten die kritischen Bedingungen (Belohnungs-prädizierende Hinweisbilder, neutrale Hinweisbilder, Feedback zu korrekten versus inkorrekten Antworten auf Belohnungs-prädizierende und neutrale Hinweisbilder) sowie die sechs [aus der Bewegungskorrektur erhaltenen] *Rigid-Body-Bewegungsparameter* und eine einzelne Konstante für den Mittelwert über die Messungen. Die Parameter für die einzelnen Kovariaten wurden wie in Experiment 1 durch die Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Die zweite Stufe des Modells bestand, wie in Experiment 1, aus *Random-Effects-Analysen* über die Kontraste der Einzelprobanden. Um die Gesamteffekte von Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback in den einzelnen Probandengruppen zu untersuchen, wurden T-Tests für Einzelstichproben über die Kontrastbilder der *a priori* geplanten Vergleiche (Belohnungserwartung: Belohnungshinweis vs. neutraler Hinweis; Feedback: positives Feedback vs. neutrales Feedback auf eine korrekte Antwort in der unbelohnten Bedingung) berechnet. Zur Untersuchung der Zwischengruppen-Unterschiede [junge vs. gesunde ältere

Probanden; gesunde ältere Probanden vs. Patienten; junge Probanden vs. Patienten] wurden zunächst einfache ANOVAs über die Kontrastbilder für Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback für die drei Probandengruppen durchgeführt, gefolgt von T-Tests für unabhängige Stichproben [mit dem Kontrastbild der ANOVAs bei  $p < .05$ , unkorrigiert, maskiert]. Das *a priori* gewählte statistische Signifikanzniveau lag bei  $p = .001$  (unkorrigiert) für alle Voxel-basierten Vergleiche, mit mindestens fünf gemeinsam aktivierten benachbarten Voxeln. Für die anatomische Lokalisierung wurden alle Koordinaten in den Talairach-Raum konvertiert (Talairach and Tournoux, 1988). Da die Erkennungsrate für die Cues bei gesunden älteren Probanden und bei Patienten im Vergleich zu den jüngeren Probanden geringfügig niedriger war, wurden außerdem ANCOVA-Kontraste mit den Cue-Erkennungsraten für Belohnungs-Cues und neutrale Cues als Kovariaten berechnet, um auszuschließen, dass mögliche Aktivierungsunterschiede auf eine schlechtere Cue-Erkennung zurückzuführen sein könnten.

Um eine mögliche Beziehung zwischen der neuronalen Antwort im Nucleus accumbens bei Belohnungserwartung versus Belohnungs-Feedback und dem Belohnungs-abhängigen Reaktionszeitvorteil zu testen, wurden Korrelationen (Pearson's Korrelationskoeffizient) zwischen der Differenz der hämodynamischen Antworten im Nucl. accumbens bei Belohnungserwartung und -Feedback und den relativen Reaktionszeitvorteilen (Cue) und für die Zahlenvergleichs-Aufgabe (Target) berechnet. Aufgrund der Annahme, dass die hämodynamische Antwort im NAcc bei Belohnungserwartung positiv mit dem Belohnungs-abhängigen Reaktionszeitvorteil korrelieren würde, wurde für alle Korrelationen ein einseitiges Signifikanzniveau von  $p < .05$  gewählt.

#### 2.1.2.5. Analyse der funktionellen Konnektivität

Um die Auswirkungen von altersabhängigen Veränderungen im Dopamin-System und von M. Parkinson auf die neuralen Regelkreise zwischen dem Mittelhirn, dem ventralen Striatum und dem anterioren Gyrus cinguli zu charakterisieren, wurde eine funktionelle Konnektivitätsanalyse durchgeführt. Aufgrund der Tendenz zu einer rechtseitigen Lateralisierung der Belohnungsantworten wurden der rechte NAcc, eine Region im rechten medialen Mittelhirn [VTA und rechte mediale SN] und der rostrale Gyrus cinguli anterior rechts als VOIs ausgewählt. Jeweils ein kugelförmiges VOI [Radius = 6 mm; bis zu 33 aktivierte Voxel] mit dem lokalen Maximum innerhalb des rechten NAcc und des rechten rostral-anterioren Gyrus cinguli wurden für jeden Probanden einzeln gewählt; eine weitere kugelförmige VOI [Radius = 5 mm; bis zu 19 aktivierte Voxel] wurde mit dem der Koordinate  $[x\ y\ z] = [6\ -18\ -15]$  am nächsten liegenden Voxel als Mittelpunkt gewählt [ $z \geq -24$ ]. Die VOIs gehörten bei allen Probanden zu unterschiedlichen Aktivierungs-Clustern. Repräsentative Beispiel-VOIs finden sich in Abb. 3.13A. Die ersten Eigenvariante der Signaländerung über die Zeit in den drei ROIs wurden wie in Experiment 1 extrahiert und für die *Effects of Interest*

angepasst (Subtraktion der in den Fehler-Term eingehenden Varianz; Menon and Levitin, 2005). Für alle Einzelprobanden wurden Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den aus der Dekonvolution resultierenden Zeitverläufen in beiden ROIs berechnet. Für weitere statistische Analysen wurden die Korrelationskoeffizienten durch die Fisher-Z-Transformation, eine hyperbolische Arcus-Tangens-Transformation (siehe Anhang 6.3.1.) auf eine näherungsweise Normalverteilung gebracht (Fisher, 1921). Die so erhaltenen Konnektivitätswerte wurden dann zunächst über die gesamte Kohorte in einem T-Test für eine Stichprobe auf Signifikanz überprüft. Immer dann, wenn die Korrelation zwischen den Signalverläufen in zwei Regionen über die gesamte Gruppe signifikant von 0 verschieden war, wurden Zwischengruppen-Vergleiche durchgeführt, indem zunächst einfache ANOVAs berechnet wurden und, wenn diese signifikante Zwischengruppen-Effekte zeigten, *post hoc* T-Tests durchgeführt wurden. Die Korrelation zwischen den so erhaltenen Maßen funktioneller Konnektivität und den Reaktionszeitvorteilen für Cues und Zahlenaufgaben wurde, wie in 2.1.2.4. beschrieben, durchgeführt

### **2.1.3. Akquisition und Bildverarbeitung anatomischer MRT-Bilder**

#### *2.1.3.1. Magnetisierungs-Transfer-Bildgebung*

Magnetisierungs-Transfer (MT)-Bilder wurden von fünf jungen, gesunden männlichen Probanden (Alter 18 – 27 Jahre) aufgenommen. Dazu wurden Protonendichte-gewichtete MRT-Aufnahmen mit 48 axialen Schichten [256 x 256 Voxel; Schichtdicke 3 mm; TR = 2600 ms; TE = 20 ms] akquiriert. Ein Magnetisierungs-Transfer-Sättigungs-Puls (Off-Resonanz-Frequenz = 1600 Hz) wurde für 16 ms appliziert. Die Bilder wurden auf das SPM2-Protonendichte-Template normalisiert (Voxelgröße = 1 x 1 x 1 mm), und zu einem Gruppenbild gemittelt, welches dann mit einem Gauss-Filter [FWHM = 2.5 mm] geglättet wurde.

#### *2.1.3.2. T1-gewichtete Bildgebung und Voxel-basierte Morphometrie (VBM)*

T1-gewichtete Ganzkopf-MR-Bilder wurden mit einer 3D-SPGR-Sequenz [spoiled gradient echo; TR = 24 ms, TE = 8 ms, Flip-Winkel = 24°; 124 sagittale Schichten à 256x 256-Voxel; Voxelgröße = 1.5 x 1 x 1 mm] am selben GE Signa 1.5T-Tomographen wie die funktionellen Bilder aufgenommen, unter Verwendung derselben Standard-Quadrature-Kopfspule. 3D-SPGR-Aufnahmen wurden von allen 19 älteren Probanden und von 13 jüngeren Probanden akquiriert [fünf jüngere Probanden standen nicht für weitere MRT-Messungen zur Verfügung].

Die Voxel-basierte Morphometrie erfolgte unter Verwendung des von Gaser beschriebenen optimierten Protokolls (C. Gaser; <http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm>, in Anlehnung an Good et al., 2001, 2002). Zunächst wurden Gruppen-spezifische Templates zur Optimierung der Normalisierung und Segmentierung der Probanden-MRTs generiert (Ashburner & Friston, 2000), wozu die 3D-SPGR-Aufnahmen aller alten und jungen Probanden verwendet wurden.

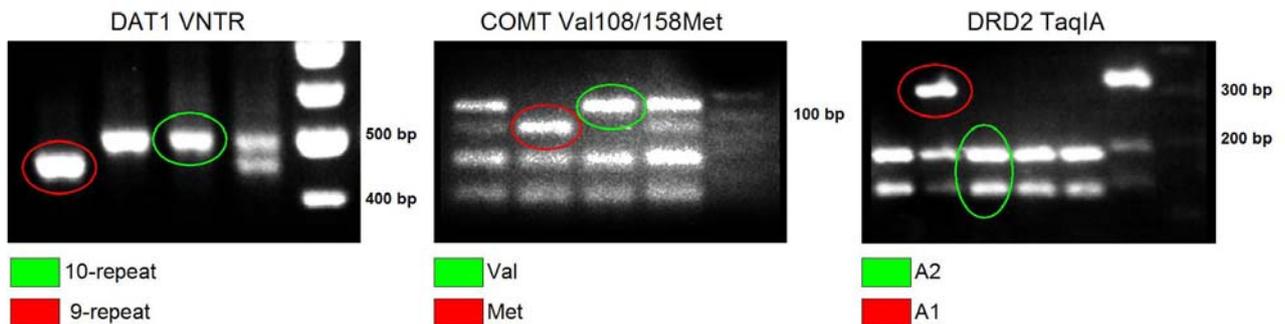
Zur Generierung des Templates wurden die 3D-SPGRs aller Probanden auf das SPM-T1-Template (MNI-Koordinatensystem, Montreal Neurological Institute) normalisiert [Voxelgröße = 1 x 1 x 1 mm], und die normalisierten Bilder wurden in graue Substanz (GM), weiße Substanz (WM) und Liquorräume (CSF) segmentiert. Die so erhaltenen Bilder wurden über die Gruppe gemittelt und mit einem Gauss-Filter [FWHM = 8 mm] geglättet.

Nach der Erstellung der Gruppen-spezifischen Templates wurde des optimierte VBM-Protokoll (Good et al., 2001, 2002; Burton et al., 2004) auf die Original-3D-SPGRs angewendet. Dazu wurden die MRTs zunächst in ihrem ursprünglichen Koordinatensystem unter Verwendung der in SPM implementierten automatisierten Prozedur segmentiert, und alle Voxel außerhalb des Gehirns (Schädel, Skalp etc.) wurden entfernt [Verwendung der *Brain-Extract*-Prozedur von SPM, die durch wiederholte Ausdehnungen und Schrumpfungen des segmentierten Gehirns außerhalb liegende Voxel aus den Segmentierungen ausschließt]. Die extrahierten GM-Bilder wurden dann auf das zuvor generierte Gruppen-spezifische GM-Template normalisiert [12-Parameter affine Transformation, 16 nicht-lineare Iterationen; Ashburner & Friston, 1999]. Die so erhaltenen Normalisierungsparameter wurden anschließend auf die Original-3D-SPGRs angewandt, um diese ebenfalls in das MNI-Koordinatensystem zu normalisieren [Voxelgröße 1 x 1 x 1 mm]. Die normalisierten 3D-SPGRs wurden dann unter Verwendung der Gruppen-spezifischen Verteilungs-Templates (siehe oben) automatisch in GM, WM und CSF segmentiert. Ein Hidden-Markov-Random-Field-Algorithmus wurde im Segmentierungsprozess integriert, um für Inhomogenitäten der Verteilung von GM, WM und CSF zu korrigieren (Good et al., 2001, 2002). Schließlich wurden verbleibende, außerhalb des Gehirns liegende Voxel durch erneute Anwendung der *Brain-Extract*-Prozedur entfernt. Durch die Normalisierung kann es zu lokalen relativen Volumenänderungen kommen. Um diese auszugleichen, wurde eine Jacobi-Modulation auf die normalisierten GM-Bilder angewandt (Ashburner & Friston, 2000). Die Jacobi-modulierten GM-Bilder wurden mit einem Gauss-Filter [FWHM = 6 x 6 x 6 mm] geglättet.

Die statistische Auswertung der so erhaltenen GM-Verteilungsbilder erfolgte analog zum zweiten Schritt der oben beschriebenen *Random-Effects*-Analyse der funktionellen MR-Daten. Aufgrund der *a priori*-Hypothese, dass es im Alter zu einer Abnahme der grauen Substanz kommen würde, wurde ein Voxel-weiser einseitiger T-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf 0.00001 (unkorrigiert) festgelegt, und die minimale Clustergröße auf 250 benachbarte Voxel [lokale Volumenreduktion von 0.25 cm<sup>3</sup>].

## 2.2. Untersuchung genetischer Polymorphismen

49 Studienteilnehmern von fMRI-Experiment 1 wurden nach Aufklärung und schriftlichem Einverständnis 5 ml venöses Blut unter Verwendung von EDTA als Antikoagulanz entnommen. Mit dem GenElute-DNA-Extraktions-Kit (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) wurde genomische DNA aus Leukozyten der entnommenen Blutproben extrahiert [eine detaillierte Beschreibung findet sich im Protokoll des Herstellers]. Die Genotypisierung der relevanten DNA-Fragmente erfolgte mittels PCR und, gegebenenfalls, anschließendem Restriktionsverdau. Für alle PCR-Reaktionen wurden Taq-Polymerase-Kits von Qiagen (Chatsworth, CA) und Oligonucleotid-Primer von Invitrogen (Carlsbad, CA) verwendet.



**Abb. 2.3: Genotypisierungen (Übersicht).** Links: DAT1-VNTR-Polymorphismus. Die 480 bp-Bande (grün) entspricht dem 10-Repeat-Allel, die 440 bp-Bande (rot) dem 9-Repeat-Allel. Mitte: COMT-Val108/158Met-Polymorphismus. 114 bp (grün): Val-Allel; 96 bp: Met-Allel. Rechts: DRD2-Taq1A-Polymorphismus. 180 + 130 bp (grün): A2-Allel; 310 bp: A1-Allel.

### 2.2.1. DAT1-VNTR-Polymorphismus

Zur Typisierung des DAT1-VNTR-Polymorphismus (Locus SLC6A3, Chromosom 5p15) wurden die Primer DATVNTR-f (5'-TGTGGTGTAGGAAACGGCCTGAG-3') und DATVNTR-r (5'-CTTCCTGGAGGTCACGGCTCAAAGG-3') verwendet (Vandenberg et al., 1992). Ein 25 µl-PCR-Ansatz enthielt 2 µl genomische DNA (ca. 20 ng/µl), 0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 5 µl Q-Solution (eingetragenes Warenzeichen d. Fa. Qiagen), 2,5 µl 10x PCR-Puffer, je 2,5 µl der beiden Primer, 1 µl dNTP (10 mM) und 9 µl H<sub>2</sub>O. Nach 5 min initialer Denaturierung bei 95°C folgten 38 Zyklen bestehend aus 30 s Denaturierung (94°C), 30 s Annealing (54°C) und 60 s Synthese (72°C). Um eine vollständige Synthese der begonnenen Amplifikate zu erhalten, wurde die Reaktion mit einer finalen Elongation von 10 min (wieder bei 72°C) abgeschlossen. Die so erhaltenen DNA-Fragmente (440 bp für das 9-Repeat-Allel, 480 bp für das 10-Repeat-Allel) wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel (2,5% Agarose) aufgetrennt (siehe Anhang 6.3.4.1.), unter UV-Licht sichtbar gemacht und zur Klassifizierung fotografiert (Abb. 2.3 links).

### **2.2.2. COMT-Val108/158Met-Polymorphismus**

Zur Amplifikation des den COMT-Val108/158Met-Polymorphismus (Chromosom 22q11; NCBI-Nr. Z26491) enthaltenden DNA-Fragmentes wurden die von DeMille et al. (2002) beschriebenen Primer COMT-f (5'-GCCCCGCCTGCTGTCACC-3') und COMT-r (5'-CTGAGGGGCCTGGTGATAGTG-3') eingesetzt. Ein 25µl-PCR-Ansatz enthielt 5 µl genomische DNA (ca. 20 ng/µl), 0.5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 5 µl Q-Solution, 2.5 µl 10 x Taq-PCR-Puffer, je 2.5 µl der beiden Primer, 0.5 µl 10 dNTPs (10 mM) und 6.5 µl H<sub>2</sub>O. Nach 1 min initialer Denaturierung bei 94°C folgten 42 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung (94°C), 30 s Annealing (60°C) und 30 s Elongation (72°C), gefolgt von einer finalen Elongation (10 min, 72°C). Zur Bestimmung des COMT-Val108/158-Polymorphismus wurden die PCR-Produkte mit dem die DNA-Sequenz CATG schneidenden Restriktionsenzym NlaIII (New England Biolabs, Ipswich, MA) nach dem Protokoll des Herstellers bei 37°C für drei Stunden verdaut. Für das Val-Allel erhielt man so drei Banden (114, 70 and 54 bp), für das Met-Allel vier Banden (96, 70, 54 and 18 bp). Die Restriktionsfragmente wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel (4.5%) aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Die Val- und Met-Allele konnten anhand des Vorhandenseins bzw. Fehlens einer 114bp-Bande bzw. einer 96bp-Bande unterschieden werden (die 18bp-Bande für das Met-Allel befand sich im Bereich der Primer-Banden und konnte so nicht zur Unterscheidung der Allele herangezogen werden; Abb. 2.3 Mitte).

### **2.2.3. DRD2-TaqIA-Polymorphismus**

Zur Amplifikation des den DRD2-TaqIA-Polymorphismus (Chr 11q23) enthaltenden DNA-Fragmentes wurden die Primer DRD2-f (5'- CCGTTCGACGGCTGGCCAAGTTGTCTA-3') und DRD2-r (5'-CCGTTCGACCCTTCCTGAGTGTCATCA-3') verwendet. Ein 25µl-PCR-Ansatz enthielt 2 µl genomische DNA (ca. 20 ng/µl), 0.5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl), 5 µl Q-Solution, 2.5 µl 10 x Taq-PCR-Puffer, je 2.5 µl der beiden Primer, 0.5 µl 10 dNTPs (10 mM) und 9.5 µl H<sub>2</sub>O. Nach 1 min initialer Denaturierung bei 94°C folgten 42 Zyklen, bestehend aus 30 s Denaturierung (94°C), 30 s Annealing (50°C) und 60 s Elongation (72°C), gefolgt von einer finalen Elongation (10 min, 72°C). Zur Bestimmung des COMT-Val108/158-Polymorphismus wurden die PCR-Produkte mit dem die DNA-Sequenz TCGA schneidenden Restriktionsenzym TaqI (New England Biolabs, Ipswich, MA) nach dem Protokoll des Herstellers bei 65°C für drei Stunden verdaut. Für das A1-Allel erhielt man so ein ungeschnittenes Fragment (310 bp), für das A2-Allel die geschnittenen Fragmente (180+130 bp; siehe Abb. 2.3 rechts). Die Restriktionsfragmente wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarose-Gel (2.5%) aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

#### **2.2.4. Weitere Genotypisierungen**

Um zufällige Zwischengruppen-Effekte durch Populations-Stratifizierung zu vermeiden, wurden zusätzliche Genotypisierungen für weitere häufige genetische Polymorphismen durchgeführt. Dabei handelte es sich um den D3-Dopamin-Rezeptor (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus (Chr 3q13) bei allen Probanden und um den Monoaminoxidase-A-Promotor-VNTR (Chr Xp11), den Monoaminoxidase-B-Intron-13-Polymorphismus (Chr Xp11), den BDNF-Val66Met-Polymorphismus (Chr 11p13), den Serotonin-Transporter (SLC6A4)-Fragmentlängen-Polymorphismus (Chr 17q11) und den Glu298Asp-Polymorphismus im Gen der endothelialen NO-Synthase (Chr 7q36) bei 45 Probanden. Primersequenzen, Annealing-Temperaturen und Restriktionsenzyme für diese Genotypisierungen sind in Anhang 6.3.3.1. zusammengefasst.

### **2.3. Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen**

Die molekularbiologischen und proteinbiochemischen Untersuchungen waren in Ergänzung zu fMRI-Experiment 1 durchgeführt worden, um die beobachteten Einflüsse der Polymorphismen in DAT1 und COMT auf die Hirnaktivierungsmuster bei episodischer Gedächtnisbildung besser interpretieren zu können. Zusammensetzungen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sowie ausführliche Protokolle (soweit nicht als Herstellerprotokolle verfügbar) finden sich im Anhang.

#### **2.3.1. Immunhistochemie und Western Blots des humanen Hippocampus**

Um die Expression des Dopamin-Transporters DAT1 im humanen Hippocampus zu untersuchen, wurden immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen in humanem *post mortem*-Hirnmaterial durchgeführt.

##### **2.3.1.1. Humanes *post mortem*-Hirnmaterial**

Humanes *post mortem*-Hirnmaterial stammte aus der Hirnbank der Klinik für Psychiatrie der Otto-von-Guericke-Universität. Die Sammlung der Proben war in strenger Übereinstimmung mit dem deutschen Recht und mit den Bestimmungen der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität durchgeführt worden. Die Gehirne von drei Individuen (eine Frau, zwei Männer, Alter zum Zeitpunkt des Todes 52, 54, und 55 Jahre) wurden untersucht. Keiner der Verstorbenen hatte an einer neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung gelitten. Die Zeit bis zur Organentnahme betrug 21, 22, und 24 h nach Eintritt des Todes. Ein Gehirn wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und für proteinbiochemische Untersuchungen verwendet. Die anderen Gehirne wurden für immunhistochemische Untersuchungen vorbereitet.

### *2.3.1.2. Immunhistochemische Verfahren*

Die immunhistochemischen Untersuchungen am humanen Hippocampus wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Hans-Gert Bernstein, Klinik für Psychiatrie der Otto-von-Guericke-Universität durchgeführt.

Die Gehirne waren durch Immersionsfixierung in 8% Phosphat-gepuffertem Formaldehyd für 2 Monate fixiert worden, in Paraplast eingebettet und mit einem Microtom geschnitten worden (Ganzhirnschnitte, Schichtdicke = 20 µm). Jeder 50. Schnitt wurde nach einer Kombination der Methoden von Nissl und Heidenhain-Woelcke histologisch gefärbt. Um DAT1-Immunreaktivität zu lokalisieren, wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen ein C-terminales Fragment des humanen Dopamin-Transporters (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) verwendet. Die Arbeitsverdünnung des primären Antiserums betrug 1:100 in PBS. Zur Visualisierung wurde eine Nickel-verstärkte Avidin-Biotin-Technik eingesetzt (Bernstein et al., 1999). Das Reaktionsprodukt wurde mit Hilfe eines Vectastain-Peroxidase-Kits (Vectorlabs, Burlingam, CA) und 3,30-Diaminobenzidin als Chromogen visualisiert. Die Farbreaktion wurde durch Zusatz von Ammoniumnickelsulfatlösung (0.5%) verstärkt (Hsu & Soban, 1982). Darüber hinaus wurde die Spezifität der Immunreaktion durch eine Negativkontrolle ohne ersten Antikörper (Immunglobulin-freies Kaninchenserum) überprüft.

### *2.3.1.3. Protein-Präparation und Western-Blotting*

Protein-Präparation und Western-Blotting wurden grundsätzlich in Anlehnung an Seidenbecher et al. (2002) durchgeführt, mit geringfügigen Abweichungen.

Humanes Hirngewebe aus dem Hippocampus (mit Anteilen von Gyrus dentatus, CA1 und CA3) und aus dem Striatum wurde in TBS unter Zusatz eines Protease-Inhibitor-Cocktails (Complete; Boehringer Mannheim) homogenisiert. Das Homogenat wurde für 15 min bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert, und der Überstand als zytosolische Fraktion (S1; enthält Mikrosomen) asserviert. Das Pellet (P1) mit den membranständigen Proteinen wurde in TBS mit 1% Triton X-100 rehomogenisiert und für 15 min bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (S2) enthielt die löslichen Membranproteine, im Pellet (P) fanden sich die nicht gelösten Membranproteine (Zytoskelett-Proteine u. a.). Die so erhaltenen Proteinfractionen wurden mit SDS und Mercaptoethanol solubilisiert. Nach kurzem Erhitzen (95°C für 5 min) wurden die solubilisierten Proteine über SDS-PAGE auf 5–20%-Gradientengelen unter vollständig reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und anschließend bei 200 mA für 90 min auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Blots wurden für zwei Stunden mit TBS-M (5 % Milchpulver) blockiert und über Nacht mit dem auch für die Immunhistochemie verwendeten Erstantikörper (Arbeitsverdünnung 1:600) inkubiert. Visualisierung erfolgte mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörper gegen Kaninchen-IgG

und anschließende Chemilumineszenz-Reaktion (ECL; Amersham Biosciences, Arlington Heights, IL).

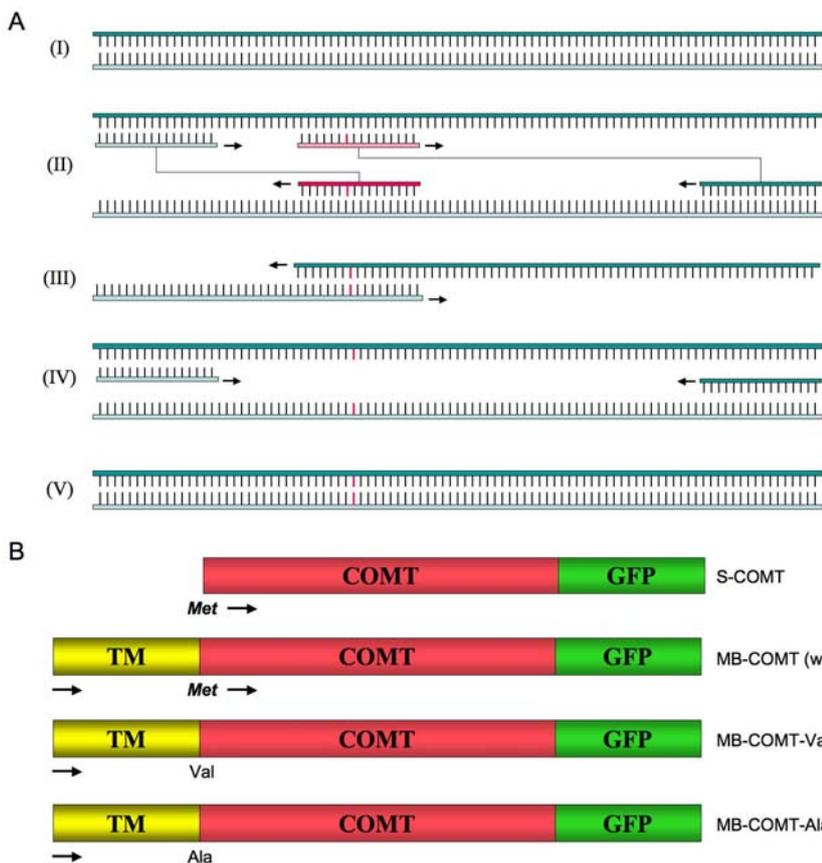
### **2.3.2. Immuncytochemische Untersuchungen von COMT-GFP-Fusionskonstrukten**

Die Orientierung der membranständigen COMT in der Zellmembran ist bis heute unklar. Zur Bearbeitung dieser Fragestellung wurden verschiedene Zellen mit zuvor generierten COMT-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert und immuncytochemische Untersuchungen an den transfizierten Zellen durchgeführt.

#### *2.3.2.1. Generierung von COMT-GFP-Fusionskonstrukten*

Da sich das bei der MB-COMT als Transmembrandomäne fungierende Signalpeptid am N-terminalen Ende befindet, wurde die in den Fusionskonstrukten verwendete GFP-Markierung am C-Terminus angefügt. Dazu wurde zunächst das offene Leseraster des humanen COMT-Gens mittels *nested PCR* unter Verwendung von Pfu-Polymerase (Fermentas) aus einer fetalen humanen cDNA-Bibliothek (Stratagene) amplifiziert (siehe Anhang 6.3.3.2. für Primer-Sequenzen), wobei die inneren Primer Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI enthielten. Ein Problem bei der Expression von MB-COMT ist die Tatsache, dass die Translation der mRNA auch am Met-Codon an Position 51, also am Startcodon der S-COMT beginnen kann, womit immer ein gewisser Anteil S-COMT translatiert wird (Ulmanen et al., 1997). Um eine solche Ko-Expression von S-COMT mit der MB-COMT zu vermeiden, wurde das Startcodon der S-COMT (Met51 der Wildtyp-MB-COMT; MB-COMT-WT) mittels spezifischer Mutagenese zu Valin (MB-COMT-Val) und Alanin (MB-COMT-Ala) mutiert. Dazu wurden zunächst zwei Fragmente der MB-COMT durch PCR amplifiziert, die im Bereich von Codon 51 überlappen. Der *reverse*-Primer für das 5'-Fragment und der *forward*-Primer für das 3'-Fragment enthielten dabei die Basenaustausche, die zu einer Mutation des ATG-Codons an Position 51 zu GTG (Val) bzw. GCG (Ala) führten. Eine Übersicht über die Mutagenese-Schritte ist in Abb. 2.4A dargestellt. Die erhaltenen PCR-Produkte (S-COMT, MB-COMT-WT, MB-COMT-Val, MB-COMT-Ala) wurden mit EcoRI und BamHI (New England Biolabs) bei 37°C für 90 min verdaut und auf einem 1-prozentigen Agarosegel aufgetrennt. Die Fragmente mit dem offenen Leseraster für COMT wurden nach Größe selektiert und die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Gel-Elutions-Kit (Marligen) nach dem Protokoll des Herstellers eluiert und gereinigt. Die erhaltene gereinigte DNA wurde mit T4-DNA-Ligase (Fermentas) bei Raumtemperatur für 20 min in die Multiple Cloning Site (MCS) des mit EcoRI und BamHI linearisierten Plasmidvektors pEGFP-N1 (Clontech) ligiert. Anschließend wurde die DNA-Ligase bei 65°C Hitze-inaktiviert (Inkubationszeit: 10 min). Hitzeschock-kompetente *Escherichia coli* des Stammes *E. coli* DH5 $\alpha$  wurden mit dem Ligationsansatz durch Wasserbad-Hitzeschock (37°C, 30 s) transformiert und nach 60minütigem Wachstum in

SOC-Medium auf Kanamycin-haltigem LB-Agar ausplattiert. Selektion der transformierten Bakterien erfolgte durch die im Vektor enthaltene Aminoglycosid-Resistenz (Neomycin-Phosphotransferase, NPT II). Nach Wachstum über Nacht wurden angewachsene Kolonien gepickt und in 2.5 ml Kanamycin-haltigem Medium über Nacht inkubiert. Zur Überprüfung erfolgte zunächst eine grobe DNA-Präparation (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979; siehe Anhang 6.3.4.5.), gefolgt von einem diagnostischen DNA-Verdau mit EcoRI und BamHI. Die verdaute DNA wurde über ein 1%-Agarose-Gel aufgetrennt, und die Selektion der Klone erfolgte anhand der Insert-Größe. Zur Überprüfung der korrekten Ligation wurden die Inserts und die flankierenden Abschnitte des Vektors sequenziert (Custom-Pyrosequenzierung durch Fa. SeqLab). Klone, die Plasmide mit der korrekten Sequenz enthielten, wurden mit 50 ml LB-Medium über Nacht inkubiert, und die präparative DNA-Isolation erfolgte mit einem Midi-Prep-Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers.



**Abb. 2.4: Mutagenese und COMT-GFP-Fusionskonstrukte.** A: Schritte der Mutagenese. (I) Die vollständige COMT-cDNA war aus einer cDNA-Bank amplifiziert worden. (II) Mit Hilfe von Primern, die die gewünschten Mutationen enthielten wurden überlappende Fragmente der cDNA in zwei Abschnitten amplifiziert. (III) In einer erneuten PCR dienten diese Fragmente im überlappenden Teil wechselseitig als Primer, wodurch Einzelstrang-DNAs der vollen Länge erhalten wurden. (IV) In derselben PCR wurden diese DNA-Abschnitte durch Einsatz der flankierenden Primer wieder amplifiziert. (V) Die so erhaltenen COMT-cDNA enthielt die gewünschte Mutation. B: Übersicht über die COMT-GFP-Fusionskonstrukte. Das Startcodon der S-COMT in der MB-COMT-cDNA war durch Codons für Valin bzw. Alanin ersetzt worden. TM: Signalpeptid, putative Transmembran-Domäne; wt: Wildtyp. Pfeil: Translationsstart.

### 2.3.2.2. Proteinbiochemische Überprüfung der COMT-GFP-Fusionskonstrukte

Um die korrekte Expression der COMT-GFP-Fusionskonstrukte zu überprüfen wurden COS7-Zellen unter Verwendung des PolyFect-Transfektionsreagenz (Qiagen, Chatsworth, CA) nach dem Protokoll des Herstellers mit S-COMT-GFP, MB-COMT-WT-GFP, MB-COMT-Ala-GFP und MB-COMT-Val-GFP sowie einem Insert-freien pEGFP-N1-Plasmid als

Kontrolle transfiziert und für ca. 36 h bei 37°C inkubiert. Nach visueller Überprüfung der grünen Fluoreszenz wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in TBS homogenisiert.

Die Fraktionierung erfolgte wie in 2.3.1.3. beschrieben. Zur Überprüfung der korrekten Größe des exprimierten Fusionsproteins wurden a) Gesamthomogenate und b) fraktionierte Zellen wie in 2.3.1.3. und 6.3.4.3./4. beschrieben durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blot visualisiert. Als Primärantikörper diente ein muriner  $\alpha$ GFP-Antikörper (Abcam), als Sekundärantikörper ein HRP-gekoppelter Antikörper gegen Maus-IgG (Amersham Biosciences).

#### 2.3.2.3. Kultivierung von COS7-Zellen

Als nicht-neuronale Zelllinie wurden Zellen aus der Linie der COS7-Zellen verwendet, CV-1-Fibroblastenzellen aus der Niere des Affen *Cercopithecus aethiops*, die mit dem Simian-Virus SV40 stabil transformiert worden waren (Gluzman, 1981). Die COS7-Zellen in dem Zellkultur-Medium DMEM (+FKS/PS/Gln, siehe 6.3.2.2.) bei 37°C in Heraeus-Inkubatoren (5% CO<sub>2</sub>) gezüchtet und alle 3 – 4 Tage bei Erreichen der Konfluenz durch Trypsinierung (5 min) vollständig vom Boden der Kulturflasche abgelöst, passagiert und 10 ml frischem DMEM im Verhältnis 1:10 in neue Kulturflaschen überführt.

#### 2.3.2.4. Immunocytochemische und biochemische Untersuchungen in COS7-Zellen

Um die Expression der COMT-GFP-Fusionsproteine in nicht-neuronalen Zellen zu untersuchen, wurden COS7-Zellen auf Poly-D-Lysin-behandelten Deckgläschen im Verhältnis 1:15 angezogen und wie in 2.3.2.2. beschrieben mit den COMT-GFP-Plasmiden transfiziert. Nach 24-stündiger Weiterkultivierung (wie in 2.3.2.3. beschrieben) wurden die Zellen mit HBSS+ (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) gewaschen. Anschließend erfolgte für den ersten Teil der Zellen eine Lebendinkubation mit einem Primärantikörper ( $\alpha$ GFP (Abcam) 1:1000 oder  $\alpha$ COMT (Chemicon) 1:300) für 15 min. Die anderen Zellen wurden mit 37°C warmem HBSS+ inkubiert. Nach Fixierung und Permeabilisierung mit Methanol/Aceton (15 min @ -20°C) und anschließender Blockierung (1 h @ Raumtemperatur [RT]) wurde der zweite Teil der Zellen gewaschen (PBS, 5 min @ RT) und danach mit dem Primärantikörper inkubiert (1 h @ RT). Nach erneuter Waschung (PBS, 3\*10 min @ RT) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper ( $\alpha$ Maus, Cy5-gekoppelt bzw.  $\alpha$ Kaninchen, Cy3-gekoppelt, Abcam). Die Deckgläschen wurden unter Verwendung des Fixativs Moviol auf Objektträger aufgebracht, und die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte mit einem Leitz DM-RXE Fluoreszenzmikroskop (Leica) mit den Filtern I3 und N2.1.

#### 2.3.2.5. Neuronale Primärkultur

Um die Orientierung der membranständigen COMT in Neuronen, insbesondere perisynaptisch, zu untersuchen, wurden Kortex-Neurone von Ratten-Embryonen mit COMT-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert. Die Präparation der Kortex-Neurone erfolgte in

Anlehnung an Akaike et al. (1993). Eine trächtige Wistar-Ratte (E16) wurde nach Narkotisierung mit Halothan dekapitiert und die fünf Embryonen entnommen. Die Hirne der Embryonen wurden unter HBSS (+  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) freigelegt. Nach Freipräparation des Kortex (ohne Hippocampus und Bulbus olfactorius) wurden diese kurz in HBSS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) gewaschen und für 5 min bei 37°C mit Trypsin-haltigem HBSS inkubiert. Nach Entfernung der Trypsin-Lösung wurden die Zellen in 10 ml DMEM (10% FCS, 1 mM Na-Pyruvat, 1 mM Gln) aufgenommen und vorsichtig vereinzelt. Nach Zählung wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 1500 Zellen /  $\mu\text{l}$  verdünnt und auf 18mm-Deckgläschen (Poly-D-Lysin-beschichtet) ausgesät. Nach 24 h wurde DMEM durch Neurobasal-Medium (NBM; unter Zusatz von 1 x B27, 1 mM Na-Pyruvat, 1 x Albumax sowie Penicillin und Streptomycin) ersetzt. Außerdem wurde das Cytostatikum AraC (Cytosin-Arabinosid) auf eine Endkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  zugegeben, um exzessives Wachstum von Gliazellen zu unterdrücken.

#### *2.3.2.6. Immunocytochemische Untersuchungen in neuronalen Zellen*

Am Tag 5 nach der Präparation wurden die Zellen mit den COMT-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde Effectene (Qiagen, Chatsworth, CA) nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Für je ein Drittel der transfizierten Zellen wurde nach 1, 2 und 12 Stunden das Medium gewechselt, um cytotoxische Effekte des Transfektionsreagenzes und des überexprimierten Konstruktes zu minimieren.

Die immunhistochemische Aufbereitung der Neurone erfolgte an Tag 8 nach der Transfektion und wurde grundsätzlich analog zu 2.3.2.4., mit geringfügigen Veränderungen durchgeführt. Als Primäntikörper wurde der in 2.3.2.4. eingesetzte  $\alpha\text{GFP}$ -Antikörper eingesetzt, als Sekundäntikörper diente ein Alexafluor-647-gekoppelter  $\alpha\text{Maus}$ -Antikörper (Abcam). Die Fixierung erfolgte mit 4% kaltem PFA (10 min @ RT), die Permeabilisierung wurde parallel zur Blockierung durch Zusatz von 0.1% Triton X-100 zur Blockierungslösung durchgeführt.

Die Deckgläschen mit den fixierten Neuronen wurden analog zu 2.3.2.4. auf Objektträger aufgebracht und mit einem Leitz DM-RXE Fluoreszenzmikroskop (Leica) unter Verwendung der Filter I3 und N2.1 mikroskopiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Verteilung genetischer Polymorphismen

Von 49 der 51 Teilnehmer von fMRI-Experiment 1 waren Blutproben für Genotypisierungen vorhanden. In dieser Gruppe wurden 17 Träger des DAT1-9-Repeat-Allels identifiziert (7 9/9, 10 9/10), was in dem, bei einer kaukasischen Population erwarteten Bereich liegt [Allelfrequenzen 72% 10-Repeat, 27% 9-Repeat, 1% seltene Allele (Doucette-Stamm et al., 1995);  $\chi^2 = 4.23$ ;  $p = 0.121$ ]. Bei einem Probanden fand sich das seltene 11-Repeat-Allel [10/11-heterozygot]. 9-Repeat-Träger wurden mit einer nach Alter, Geschlecht und Ausbildungsjahren angepassten Gruppe von 20 10-Repeat-Homozygoten verglichen. Durch die Genotypisierung für den COMT-Val108/158Met-Polymorphismus wurden 17 Val-homozygote, 15 Met-homozygote und 17 heterozygote Probanden identifiziert. Diese Verteilung lag ebenfalls in dem für eine kaukasische Population zu erwartenden Bereich [Allelfrequenzen etwa gleich verteilt DeMille et al., 2002;  $\chi^2 = 2.404$ ;  $p = 0.301$ ]. Die Genotypisierung für den Dopamin-Rezeptor D2 TaqIA-Polymorphismus ergab einen A1-homozygoten Probanden, 21 Heterozygote und 28 A2-Homozygote, was im zu erwartenden Bereich liegt; [Allelfrequenzen: A1 = 0.175, A2 = 0.825; Finckh et al., 1996;  $\chi^2 = 1.802$ ;  $p = 0.406$ ]. Detaillierte demographische Daten finden sich in Tab. 3.1.

Um weiter für Populations-Stratifizierungseffekte zu kontrollieren, waren außerdem alle Probanden für den D3-Dopamin-Rezeptor (DRD3)-Ser9Gly-Polymorphismus (Chr 3q13) und 45 Probanden<sup>1</sup> für den Monoaminoxidase-A-Promotor-VNTR (Chr Xp11), den Monoaminoxidase-B-Intron-13-Polymorphismus (Chr Xp11), den BDNF-Val66Met-Polymorphismus (Chr 11p13), den Serotonin-Transporter (SLC6A4)-Fragmentlängen-Polymorphismus (Chr 17q11) und den Glu298Asp-Polymorphismus im Gen der endothelialen NO-Synthase (Chr 7q36) typisiert worden. Die Allele dieser Polymorphismen zeigten keine signifikant unterschiedliche Verteilung für den DAT1-VNTR, den COMT-Val108/158Met-Polymorphismus oder den DRD2-TaqIA-Polymorphismus, womit eine genetische Inhomogenität der untersuchten Population unwahrscheinlich ist.

<sup>1</sup> Die zusätzlichen Genotypisierungen (außer DRD3) erforderten entsprechend den Vorgaben der Ethik-Kommission das schriftliche Einverständnis der Probanden. Vier Probanden waren zum Zeitpunkt der zusätzlichen molekulargenetischen Untersuchungen unbekannt verzogen, weshalb von ihnen keine Einwilligung verfügbar war.

## **3.2. fMRI-Experiment 1: Genetische Variabilität im Dopamin-System und episodische Gedächtnisbildung beim Menschen**

### **3.2.1. Verhaltensdaten**

Die durchschnittlichen Anteile erinnerter Wörter in der tiefen und in der oberflächlichen Lernbedingung sind in Tab. 3.1 zusammengefasst. Die Verarbeitungstiefe hatte, unabhängig von den Genotypen für DAT1, COMT und DRD2, einen starken Einfluss auf den Anteil später erinnerter Wörter, ein aus früheren Studien bekanntes Phänomen, im folgenden als LOP-Effekt bezeichnet (Richardson-Klavehn & Gardiner, 1998; Schott et al., 2002, 2004).

Um die Auswirkungen des DAT1-Genotyps auf Gedächtnisleistung und den LOP-Effekt direkt zu testen, wurde eine zweifache Varianzanalyse (ANOVA) für Messwiederholungen [LOP (tiefe vs. oberflächliche Lernaufgabe) x DM (später erinnert vs. später vergessen)] mit DAT1-Genotyp als Zwischensubjektfaktor durchgeführt. Es fand sich kein signifikanter Unterschied in der Gedächtnisleistung [DM x Genotyp:  $F(1,35) = 0.068$ ;  $p = 0.796$ ] oder im LOP-Effekt [LOP x DM x Genotyp:  $F(1,35) = 0.059$ ;  $p = 0.810$ ] zwischen 10-Repeat-Homozygoten und 9-Repeat-Trägern.

Eine zweifache ANOVA für Messwiederholungen mit dem COMT-Genotyp als Zwischensubjektfaktor ergab eine signifikante LOP x DM Interaktion [ $F(1,46) = 83.6$ ;  $p < 0.001$ ], aber keine Interaktion zwischen Gedächtnisleistung und COMT-Genotyp [ $F(1,46) = 0.836$ ;  $p = .440$ ] oder LOP-Effekt und Genotyp [ $F(1,46) = .103$ ;  $p = 0.902$ ]. Der DRD2-Genotyp war in der untersuchten Population nicht mit einem Verhaltensunterschied in der Gedächtnisleistung [DM x Genotyp:  $F(1,47) = 0.001$ ;  $p = 0.974$ ; zweifache ANOVA für Messwiederholungen mit DRD2-Genotyp als Zwischensubjektfaktor] oder im LOP-Effekt [LOP x DM x Genotyp:  $F(1,47) = 2.156$ ;  $p = 0.149$ ] assoziiert.

Reaktionszeiten waren in der oberflächlichen im Vergleich zur tiefen Lernaufgabe signifikant kürzer [ $F(1, 46) = 10.762$ ;  $p = 0.002$ ]; es gab aber keine Reaktionszeitunterschiede in Abhängigkeit von späterem Erinnern oder den untersuchten Genotypen [alle  $p > 0.167$ ] (Tab. 3.1).

**Tab. 3.1:** Demographie und Verhaltensdaten von fMRI-Experiment 1, aufgeschlüsselt nach DAT1 VNTR, COMT Val108/158Met-Polymorphismus und DRD2-TaqIA-Polymorphismus.

	DAT1 VNTR		COMT Val108/158Met			DRD2 TaqIA	
	10/10	9 carrier	Val/Val	Val/Met	Met/Met	A2/A2	A1 carrier
<b>N</b>	20	17	17	17	15	28	21
<b>Age</b>	23.1 (+/- 3.0)	22.1 (+/- 3.0)	23.1 (+/- 3.1)	22.9 (+/- 3.2)	22.3 (+/- 2.7)	22.8 (+/- 2.9)	22.6 (+/- 3.1)
<b>M / F</b>	5 / 15	4 / 13	4 / 13	5 / 14	7 / 8	7 / 21	8 / 13
<b>years of education</b>	15.9 (+/- 2.9)	14.9 (+/- 2.4)	15.8 (+/- 3.0)	15.8 (+/- 2.5)	14.8 (+/- 1.9)	15.6 (+/- 2.3)	15.2 (+/- 2.7)
<b>deep hits</b>	.36 (+/- .104)	.34 (+/- .114)	.36 (+/- .121)	.38 (+/- .101)	.34 (+/- .088)	.36 (+/- .100)	.37 (+/- .111)
RT (deep hits)	1409 (+/- 262)	1500 (+/- 160)	1425 (+/- 221)	1494 (+/- 271)	1423 (+/- 227)	1481 (+/- 223)	1406 (+/- 257)
<b>deep misses</b>	.62 (+/- .102)	.63 (+/- .112)	.61 (+/- .115)	.60 (+/- .099)	.64 (+/- .085)	.63 (+/- .099)	.60 (+/- .104)
RT (deep misses)	1431 (+/- 250)	1504 (+/- 182)	1434 (+/- 230)	1514 (+/- 258)	1437 (+/- 227)	1498 (+/- 234)	1415 (+/- 238)
<b>shallow hits</b>	.27 (+/- .120)	.26 (+/- .118)	.27 (+/- .107)	.29 (+/- .122)	.24 (+/- .097)	.27 (+/- .116)	.27 (+/- .104)
RT (shallow hits)	1386 (+/- 271)	1372 (+/- 176)	1327 (+/- 253)	1434 (+/- 222)	1382 (+/- 245)	1406 (+/- 209)	1347 (+/- 277)
<b>shallow misses</b>	.72 (+/- .129)	.73 (+/- .118)	.73 (+/- .120)	.70 (+/- .124)	.74 (+/- .096)	.72 (+/- .119)	.72 (+/- .107)
RT (shallow misses)	1364 (+/- 269)	1376 (+/- 172)	1322 (+/- 235)	1429 (+/- 240)	1364 (+/- 230)	1409 (+/- 218)	1322 (+/- 251)

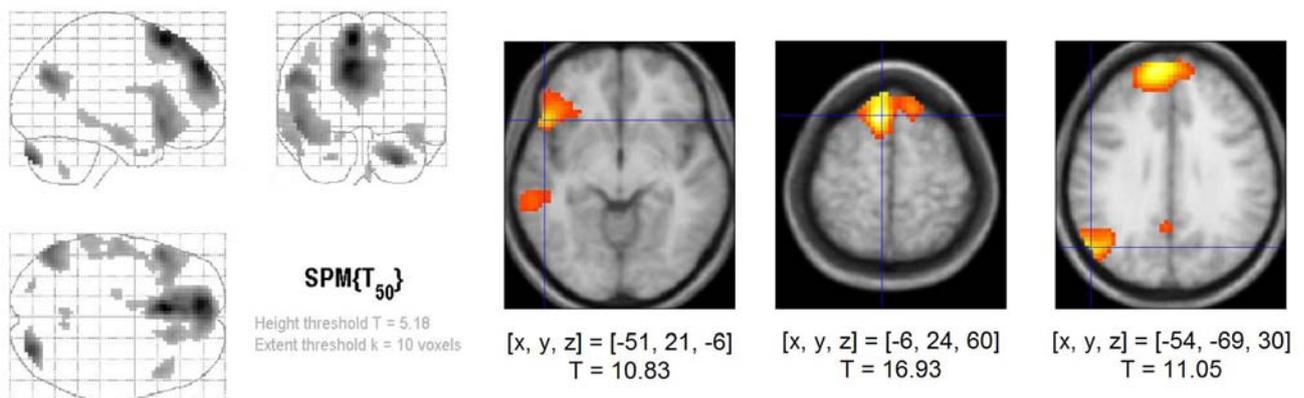
**M / F:** männlich / weiblich; **Age:** Alter; **years of education:** Ausbildungsjahre; **deep hits:** erfolgreich erinnerte Wörter in der tiefen Lernaufgabe; **deep misses:** vergessene Wörter in der tiefen Lernaufgabe; **shallow hits:** erfolgreich erinnerte Wörter in der oberflächlichen Lernaufgabe; **shallow misses:** vergessene Wörter in der oberflächlichen Lernaufgabe; alle Angaben in Proportionen, in 1.0 fehlende resultieren aus nicht klassifizierbaren Ereignissen (z. B. unverständliche Antworten in der Abrufphase). RT: Reaktionszeit in ms. *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006.*

### 3.2.2. fMRI-Daten

In der gesamten Studienpopulation wurden charakteristische Hirnaktivitätsmuster für Verarbeitungstiefe (LOP) und späteres Erinnern der Stimuli (DM) beobachtet. Diese Aktivierungsmuster zeigten spezifische Zwischengruppenunterschiede in Abhängigkeit der untersuchten Polymorphismen (DAT1 VNTR, COMT Val108/158Met, DRD2 TaqIA), welche im Folgenden detailliert beschrieben werden.

#### 3.2.2.1. fMRI-Korrelate der Verarbeitungstiefe (LOP-Effekt)

Unabhängig vom späteren Erinnern der Stimuli zeigten mehrere Hirnareale eine signifikant stärkere Aktivierung in der tiefen im Vergleich zur oberflächlichen Lernbedingung. Dazu gehörten der mediale frontale Kortex beidseits [Brodmann Area (BA) 6], der Gyrus frontalis inferior links [BA 45], die linke Amygdala, der linke Gyrus angularis [BA 39], der linke Gyrus temporalis inferior und medius [BA 21] und der Gyrus temporalis superior [BA 38] beidseits (Abb. 3.1).

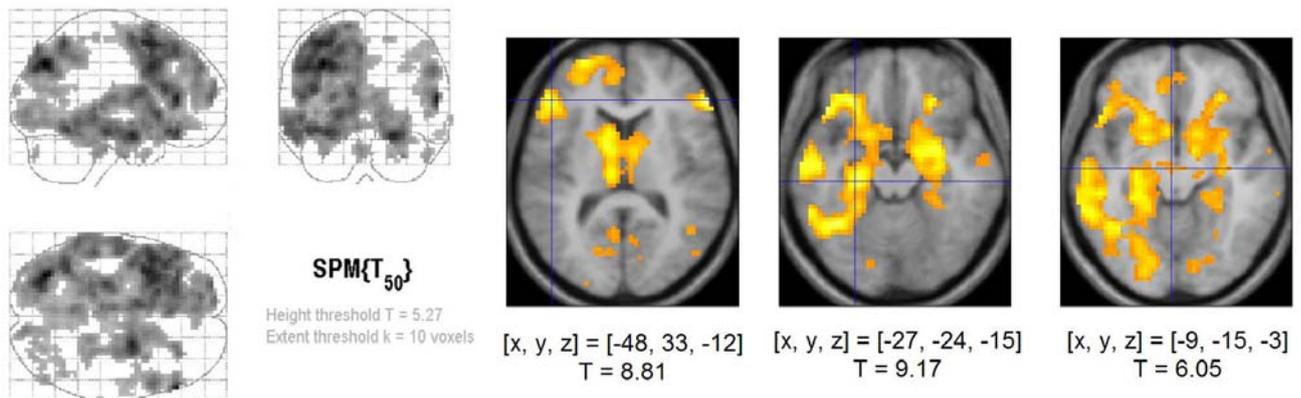


**Abb. 3.1: Neuronale Korrelate der Verarbeitungstiefe (LOP-Effekt).** Links: SPM-Aktivierungskarte (Übersicht). Rechts: LOP (tiefe vs. oberflächliche Verarbeitung) war mit Aktivierungen des linken Gyrus frontalis inferior, des bilateralen medialen präfrontalen Kortex und des rechten Gyrus angularis assoziiert. Statistischer Schwellenwert  $T > 5.18$  ( $p < 0.05$ , FWE-korrigiert für das gesamte Hirnvolumen; mind. 10 gemeinsam aktivierte Voxel).  $[x, y, z]$ : Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute). Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., *J Neurosci*, 2006.

#### 3.2.2.2. fMRI-Korrelate erfolgreicher Enkodierung (DM-Effekt)

In unserer Studienpopulation von 51 gesunden jungen Erwachsenen war erfolgreiche episodische Gedächtnisbildung (später erinnerte vs. später vergessene Wörter) mit Aktivierungen in einem fronto-parieto-occipitalen Netzwerk und in limbischen Hirnstrukturen assoziiert. Unabhängig von der Verarbeitungstiefe zeigten erfolgreich enkodierte Stimuli Aktivierungen im dorsolateralen PFC [BA 45], im Hippocampus und perirhinalen Kortex beidseits, im parieto-occipitalen Kortex, einschließlich primärer und sekundärer visueller Areale [BA 17, 18] sowie im Nucleus caudatus und Nucleus accumbens beidseits (Abb. 3.2). Preliminäre Untersuchungen zu dieser Arbeit hatten gezeigt, dass Hippocampus-abhängige Neuheitsdetektion und erfolgreiche Enkodierung neuer Stimuli in das episodische

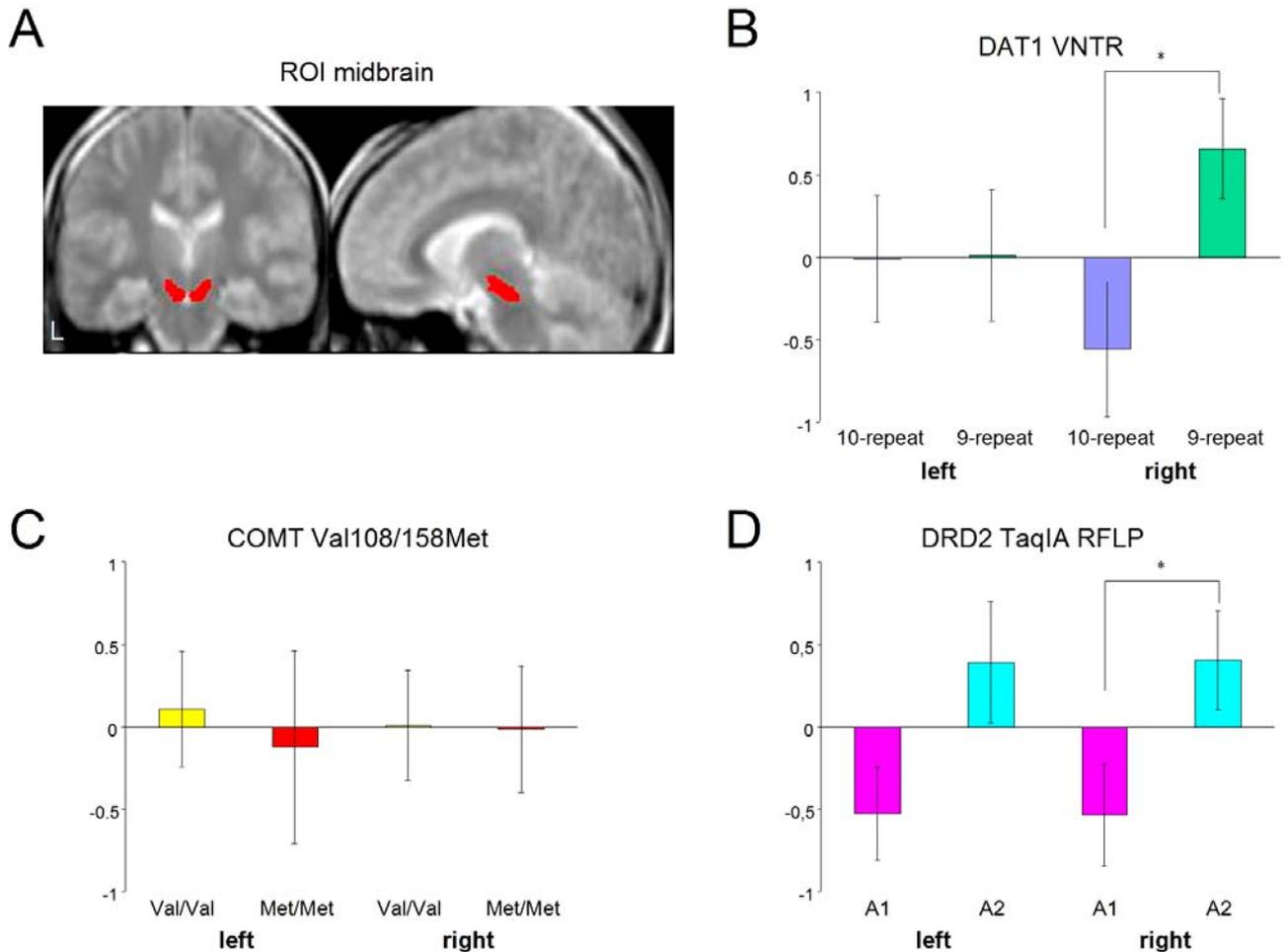
Gedächtnis mit Aktivierungen in dopaminergen Mittelhirnarealen assoziiert sind, die die mediale SN und die VTA umfassen (Schott et al., 2004; siehe Anhang 6.1.2.). Um eine mögliche Aktivierung dieser Region in der vorliegenden Studienpopulation gezielt zu überprüfen, wurde eine ROI-Analyse in der segmentierten Substantia nigra durchgeführt. Sie zeigte eine robuste Aktivierung der SN beidseits (links:  $T = 5.26$ ,  $p < 0.0001$ ; rechts:  $T = 4.88$ ;  $p < 0.0001$ ; korrigiert für das Volumen der ROI).



**Abb. 3.2: Neuronale Korrelate erfolgreicher Gedächtnisbildung (DM-Effekt).** Links: SPM-Aktivierungskarte (Übersicht). Rechts: Im Vergleich zu später vergessenen Wörtern waren später erinnerte Wörter mit Aktivierungen des linken dorsolateralen PFC, des linken anterioren Hippocampus und des Mittelhirns assoziiert. Statistischer Schwellenwert  $T > 5.27$  ( $p < 0.05$ , FWE-korrigiert für das gesamte Hirnvolumen; mind. 10 gemeinsam aktivierte Voxel). [x, y, z]: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute). *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006.*

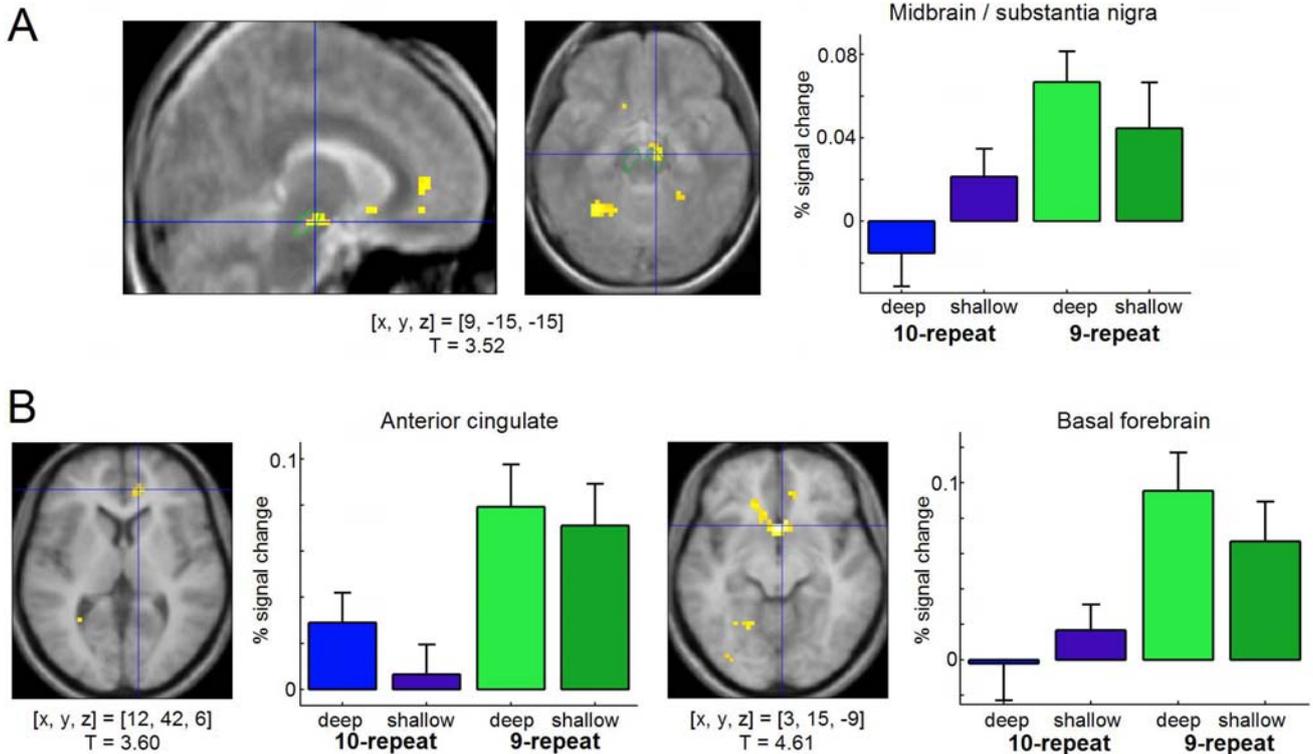
### 3.2.2.3. Auswirkungen des DAT1 VNTR auf DM-Effekt und LOP-Effekt

Um die Beziehung zwischen DAT1-Genotyp und DM-Effekt, also die Genotyp-spezifischen Unterschiede der Hirnaktivitätsmuster bei erfolgreicher Gedächtnisbildung zu untersuchen, wurden die DM-Kontraste von Trägern mindestens eines 9-Repeat-Allels des DAT1 VNTR (7 9/9; 10 9/10) mit denen von 10-Repeat-Homozygoten ( $n=20$ , nach Alter und Geschlecht stratifiziert) verglichen. Dabei zeigten 9-Repeat-Träger im Vergleich zu 10-Repeat-Homozygoten eine stärkere Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns. Eine ROI-Analyse der DM-Kontraste zeigte einen signifikanten Gruppenunterschied in der rechten Substantia nigra [9-Repeat > 10-Repeat;  $T = 2.53$ ;  $p = 0.016$ , korrigiert für das Volumen der ROI; siehe Abb. 3.3B).



**Abb. 3.3: Genetische Auswirkungen auf die fMRI-Antwort im dopaminergen Mittelhirn bei erfolgreicher episodischer Gedächtnisbildung.** A: Zielregion (region of interest, ROI) des Mittelhirns, umfasst die Substantia nigra und die VTA. Die ROIs waren manuell aus dem von fünf Einzelprobanden gemittelten MT-Bild segmentiert worden. B: ROI-Analyse des linken und rechten Mittelhirns für den DAT1 VNTR. C: ROI-Analyse des linken und rechten Mittelhirns für den COMT Val108/158Met-Polymorphismus. D: ROI-Analyse des linken und rechten Mittelhirns für den DRD2 TaqIA-Polymorphismus. y-Achse: HRF in der ROI; \* $p < 0.05$ , korrigiert für das Volumen der ROI. *Bild erstellt nach Schott et al., J Neurosci, 2006.*

Die Voxel-weise T-Test-Statistik zeigte, dass der Aktivierungsunterschied über dem anterioren medialen Mittelhirn rechts am ausgeprägtesten war (Abb. 3.4A). Darüber hinaus zeigten 9-Repeat-Träger stärkere Enkodierungs-spezifische Aktivierung im dorsalen anterioren Gyrus cinguli (Abb. 3.4B) sowie in Teilen des basalen Vorderhirns (ventrales Striatum / Nucleus accumbens, inferior-medialer PFC, basaler Teil des anterioren Gyrus cinguli; siehe Abb. 3.4C). All diese Aktivierungsunterschiede waren nach dem Ergebnis der Bootstrap-Analyse reliabel [nicht-überlappende 95%-Konfidenzintervalle der SPM-Betas in mindestens einer Lernbedingung]. Die Aktivierungs-Cluster mit signifikanten Unterschieden der DM-Kontraste zwischen 10-Repeat-Homozygoten und 9-Repeat-Trägern sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.



**Abb. 3.4: Auswirkungen des DAT1 3' VNTR-Polymorphismus auf Hirnaktivität bei episodischer Gedächtnisbildung.** A: Träger des 9-Repeat-Allels zeigten signifikant stärkere Aktivierungen des dopaminergen Mittelhirns im Vergleich zu 10-Repeat-Homozygoten. Die Substantia nigra wurde aus Gründen der Anschaulichkeit segmentiert (grün). B: 9-Repeat-Allelträger zeigten auch signifikant stärkere Aktivierungen des anterioren Gyrus cinguli (links) und des basalen Vorderhirns (einschl. Nucl. accumbens, rechts). Bar-Plots zeigen Prozent Signaländerung der kanonischen HRF (SPM-Betas für später erinnerte vs. später vergessene Wörter, skaliert auf die HRF) und ihre Standardmessfehler, getrennt für tiefe und oberflächliche Lernaufgabe. [x, y, z]: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem. *Bild übernommen aus Schott et al., J Neurosci 2006.*

Um mögliche Auswirkungen des DAT1 VNTR auf Hirnaktivität bei tiefer versus oberflächlicher Verarbeitung der Stimuli zu untersuchen, wurden die LOP-Kontraste der beiden Gruppen verglichen. Da die tiefe Verarbeitungsbedingung eine emotionale Komponente enthielt (semantische angenehm/unangenehm-Entscheidung) und angesichts der Aktivierung der linken Amygdala im LOP-Kontrast, wurde eine mögliche genetische Variabilität dieser Amygdala-Aktivität untersucht. Eine ROI-Analyse zeigte jedoch keinen signifikanten Aktivierungsunterschied in der linken [ $t = 0.09$ ;  $p = 0.463$ ] oder rechten [ $t = 0.20$ ;  $p = 0.420$ ] Amygdala in Abhängigkeit vom DAT1 VNTR. Die Voxel-basierte T-Test-Statistik ergab ebenfalls keine reliablen Aktivierungsunterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen.

**Tab. 3.2:** Aktivierungsunterschiede (DM-Effekt) in Abhängigkeit vom DAT1 VNTR.

<b>9-Repeat &gt; 10-Repeat</b>				
	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>SPM {T}</b>
<b>Anteriorer Gyrus cinguli re, BA 32</b>	<b>12</b>	<b>42</b>	<b>6</b>	<b>3.60</b>
<b>Basales Vorderhirn re</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>-9</b>	<b>4.61</b>
<b>Anteriorer Gyrus cinguli li, BA 32</b>	<b>-6</b>	<b>27</b>	<b>-6</b>	<b>3.12</b>
	<b>-12</b>	<b>21</b>	<b>24</b>	<b>3.25</b>
<b>Gyrus subcallosus li, BA 11</b>	<b>-12</b>	<b>21</b>	<b>-12</b>	<b>3.24</b>
<b>Mittelhirn / Substantia nigra</b>	<b>9</b>	<b>-15</b>	<b>-15</b>	<b>3.52</b>
<b>Nucl. caudatus li</b>	<b>-18</b>	<b>-27</b>	<b>21</b>	<b>3.45</b>
<b>Insula li, BA 13</b>	<b>-27</b>	<b>-30</b>	<b>27</b>	<b>4.37</b>
Gyrus postcentralis li, BA 2	-36	-33	30	3.02
Gyrus parahippocampalis re, BA 36	18	-42	-18	3.35
Gyrus parahippocampalis li, BA 19	-21	-54	-12	3.32
Gyrus fusiformis li, BA 37	-33	-51	-18	3.63
	-33	-57	-12	3.33
<b>Parietaler Kortex li</b>	<b>-21</b>	<b>-54</b>	<b>18</b>	<b>3.28</b>
	-27	-54	9	3.33
Parietaler Kortex re	30	-54	18	3.48
<b>Cerebellum re</b>	<b>27</b>	<b>-51</b>	<b>-42</b>	<b>3.75</b>
	30	-54	-30	3.13

**10-Repeat > 9-Repeat**

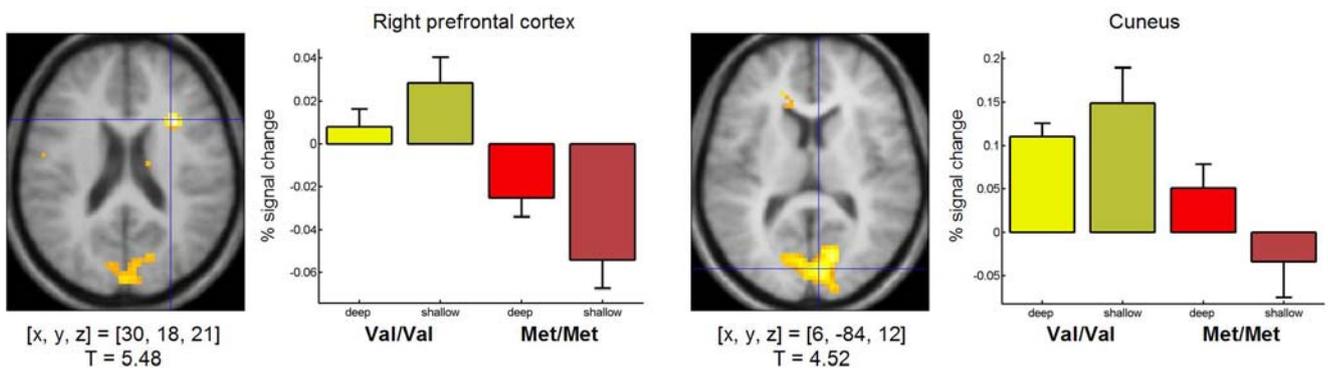
kein Cluster erreicht mind. 10 zusammenhängend aktivierte Voxel

Lokale Maxima im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute). **Fett** gedruckte Regionen zeigen reliable Aktivierungen (nicht-überlappende 95%-Konfidenzintervalle in der Bootstrap-Analyse der SPM-Betas). *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006, supplementary online material.*

**3.2.2.4. Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Genotyps auf DM-Effekt und LOP-Effekt**

Um die Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus auf Enkodierungsspezifische Hirnaktivierungen zu untersuchen, wurden die DM-Kontraste von COMT Val-Homozygoten und Met-Homozygoten statistisch verglichen. Im Gegensatz zum DAT1 VNTR war der COMT-Polymorphismus nicht mit Aktivierungsunterschieden im dopaminergen Mittelhirn assoziiert. Die ROI-Analyse der DM-Kontraste zeigte weder in der linken noch in der rechten Substantia nigra signifikante Aktivierungsunterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 3.3C). Dagegen war der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus mit robusten kortikalen Aktivierungsunterschieden assoziiert (Abb. 3.5). Im Vergleich zu Met-Homozygoten zeigten Val-Homozygote höhere Enkodierungsspezifische Hirnaktivität im rechten präfrontalen Kortex (BA 8, 9; Abb. 3.5 links), ähnlich wie die zuvor in einer Arbeitsgedächtnis-Studie beobachteten Aktivierungsunterschiede (Egan et al., 2001). Verglichen mit Met/Met-Probanden zeigten Val-homozygote Studienteilnehmer im DM-Kontrast auch eine stärkere Aktivierung in occipitalen Hirnregionen, die auch Teile des primären visuellen Kortex umfassten (Cuneus; BA 17, 18; Abb. 3.5 rechts). Sowohl präfrontale als auch medio-occipitale Aktivierungsunterschiede waren nach dem Ergebnis

der Bootstrap-Analyse reliabel, wobei die 95%-Konfidenzintervalle der SPM-Betas im medialen occipitalen Kortex für die tiefe Lernbedingung eine deutliche Überlappung zeigen. Das deutet darauf hin, dass stabile Aktivierungsunterschiede möglicherweise nur in der oberflächlichen Verarbeitungsbedingung beobachtet werden können, wenn perzeptuelle Aspekte der Stimuli von stärkerer Bedeutung für die Enkodierung sind. Alle Aktivierungsunterschiede zwischen Val-Homozygoten und Met-Homozygoten sind in Tab. 3.3 zusammengefasst.



**Abb. 3.5: Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus auf Hirnaktivität bei episodischer Gedächtnisbildung.** Links: Im Vergleich zu Met-Homozygoten zeigten Val-Homozygote eine verstärkte Aktivierung des rechten präfrontalen Kortex bei episodischer Gedächtnisbildung (DM-Effekt). Rechts: Außerdem fand sich bei Val-Homozygoten eine verstärkte Aktivierung des Cuneus, die auch Teile des primären visuellen Kortex umfasste. Bar-Plots zeigen Prozent Signaländerung der kanonischen HRF (SPM-Betas für später erinnerte vs. später vergessene Wörter, skaliert auf die HRF) und ihre Standardmessfehler, getrennt für tiefe und oberflächliche Lernaufgabe. [x, y, z]: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem. *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci 2006.*

Um auszuschließen, dass Aktivierungsunterschiede zwischen Val-Homozygoten und Met-Homozygoten auf die ungleiche Verteilung der Geschlechter in der Studienpopulation zurückzuführen sein könnten (siehe Tab. 3.1), wurden zwei Subgruppen von je 12 Probanden gebildet (8 weiblich, 4 männlich; Durchschnittsalter 22.7 in der Val/Val-Gruppe und 22.4 in der Met/Met-Gruppe) und die DM-Kontraste dieser Subgruppen (hits-misses) in einer Voxel-weisen T-Test-Statistik verglichen ( $p < 0.005$ , unkorrigiert;  $\geq 10$  zusammenhängend aktivierte Voxel). Wie in der gesamten Kohorte, zeigten Val-homozygote Probanden im Vergleich zu Met-Homozygoten stärkere Aktivierungen im rechten präfrontalen Kortex ([x, y, z] = [33, 18, 21]) und medio-occipitalen Hirnregionen ([x, y, z] = [9, -87, 12]).

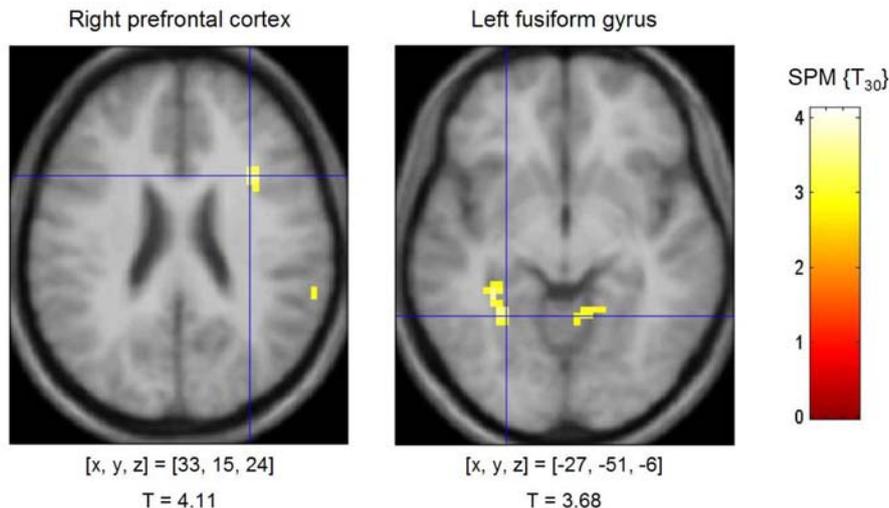
Um einen möglichen Gen-Dosis-Effekt zu überprüfen, wurde eine Voxel-weise Regression mit der Anzahl der Met-Allele als unabhängiger Variable durchgeführt. Dieser vermutete Gen-Dosis-Effekt bestätigte sich, indem Val108/158Met-heterozygote Probanden ( $n = 17$ ) intermediäre Aktivierungsstärken im rechten präfrontalen Kortex ([x, y, z] = [30, 18, 21];  $t = 3.69$ ;  $p < .001$ ) und im medialen occipitalen Kortex ([x, y, z] = [9, -87, 12];  $t = 4.94$ ;  $p < .001$ ) zeigten.

**Tab. 3.3:** Aktivierungsunterschiede (DM-Effekt) zwischen COMT Val- und Met-Homozygoten.

<b>Val/Val &gt; Met/Met</b>				
	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>SPM {T}</b>
<b>Präfrontaler Kortex re, BA 6, 47*</b>	<b>30</b>	<b>18</b>	<b>21</b>	<b>5.48</b>
<b>Gyrus frontalis inferior re, BA 47*</b>	<b>45</b>	<b>30</b>	<b>-15</b>	<b>3.14</b>
Anteriorer Gyrus cinguli li, BA 32	-18	36	12	3.45
Gyrus cinguli li, BA 32	-3	21	30	3.68
Gyrus frontalis superior re, BA 6	9	12	72	3.38
Gyrus frontalis superior li, BA 6	0	6	69	3.75
Linker präfrontaler Kortex	-27	-12	36	3.57
<b>Nucl. caudateus re*</b>	<b>15</b>	<b>-15</b>	<b>27</b>	<b>3.43</b>
<b>Nucl. caudateus li*</b>	<b>-12</b>	<b>27</b>	<b>15</b>	<b>3.61</b>
<b>Gyrus praecentralis li, BA 4, 6*</b>	<b>-42</b>	<b>-18</b>	<b>42</b>	<b>3.57</b>
	-60	-3	27	3.28
	-54	-6	21	2.91
<b>Gyrus fusiformis li*</b>	<b>-30</b>	<b>-66</b>	<b>-27</b>	<b>4.90</b>
Cerebellum re	30	-69	-30	3.41
<b>Cuneus re &amp; li, BA 17, 18*</b>	<b>15</b>	<b>-75</b>	<b>15</b>	<b>4.79</b>
	<b>6</b>	<b>-84</b>	<b>12</b>	<b>4.52</b>
	<b>-3</b>	<b>-90</b>	<b>6</b>	<b>3.78</b>
<b>Met/Met &gt; Val/Val</b>				
kein Cluster erreicht mind. 10 zusammenhängend aktivierte Voxel				

Lokale Maxima im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute). **Fett** gedruckte Regionen zeigen reliable Aktivierungen (nicht-überlappende 95%-Konfidenzintervalle in der Bootstrap-Analyse der SPM-Betas). *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006, supplementary online material.*

Um mögliche Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus auf die Hirnaktivität während der tiefen im Vergleich zur oberflächlichen Lernbedingung zu testen, wurden die LOP-Kontraste der Gruppen verglichen. Wie für den DAT1 VNTR wurde zunächst eine ROI-Analyse für die Amygdala beidseits durchgeführt. Im Gegensatz zu einer kürzlich veröffentlichten Arbeit zur Auswirkung des COMT-Polymorphismus auf die Amygdala-Antwort bei der Verarbeitung emotionaler Bilder (Smolka et al., 2005) wurde in dieser Studie kein Unterschied der Amygdala-Aktivierung in Abhängigkeit vom COMT-Val108/158Met-Genotyp gefunden [alle p-Werte > 0.404]. Möglicherweise beeinflusst der COMT-Polymorphismus die Reaktion der Amygdala auf Stimuli mit emotionalem Inhalt, nicht aber die emotionale Bewertung neutraler Stimuli *per se*. In der Voxel-weisen T-Test-Statistik der LOP-Kontraste fanden sich mehrere Unterschiede in den kortikalen Aktivierungsmustern zwischen den Gruppen (Abb. 3.6). Val-Homozygote zeigten im Vergleich mit Met-Homozygoten eine stärkere Aktivierung im rechten präfrontalen Kortex und im linken Gyrus fusiformis, in Hirnregionen, die auch eine verstärkte Aktivierung im DM-Kontrast, also bei der erfolgreichen Gedächtnisbildung, zeigten. Bei Met-homozygoten Probanden war im Vergleich zu Val-Homozygoten der posteriore Gyrus cinguli verstärkt aktiv.

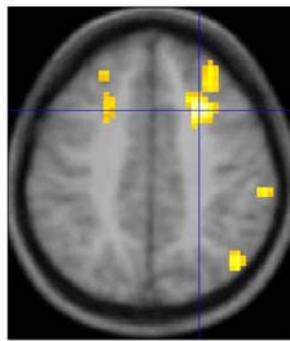


**Abb. 3.6: Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus auf Hirnaktivität in der tiefen vs. oberflächlichen Lernbedingung.** Unabhängig von erfolgreicher Gedächtnisbildung zeigen Val-Homozygote eine verstärkte Aktivierung des rechten präfrontalen Kortex (links) und des linken Gyrus fusiformis (rechts). [x, y, z]: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem. Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., *J Neurosci* 2006, supplemental online information.

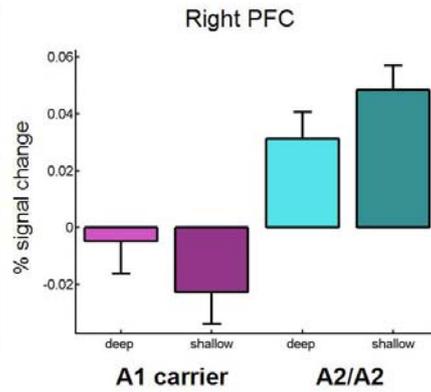
### 3.2.2.5. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf DM-Effekt und LOP-Effekt

Um die Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf Enkodierungs-spezifische Hirnaktivierungen zu untersuchen, wurden die DM-Kontraste von A1-Trägern (N=21) mit denen von A2-Homozygoten statistisch verglichen. Ähnlich wie der DAT1 VNTR war der DRD2-TaqIA-Polymorphismus mit Aktivierungsunterschieden im dopaminergen Mittelhirn bei erfolgreicher Gedächtnisbildung assoziiert, wobei A2-Homozygote im Vergleich zu A1-Allelträgern eine stärkere Aktivierung zeigten (Abb. 3.3.D). Die ROI-Analyse der DM-Kontraste zeigte einen signifikanten Aktivierungsunterschied in der rechten Substantia nigra, und der Aktivierungsunterschied in der linken Substantia nigra näherte sich dem Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  (korrigiert für das ROI-Volumen) an. Darüber hinaus war der DRD2-TaqIA-Polymorphismus mit signifikanten Aktivierungsunterschieden im Bereich des dorsalen präfrontalen Kortex (rechts > links) assoziiert (Abb. 3.7). Auch hier zeigten A2-Homozygote im Vergleich zu A1-Trägern eine stärkere Aktivierung. Diese Aktivierungsunterschiede waren bei der Bootstrap-Analyse reliabel (nicht-überlappende 95%-Konfidenzintervalle in mindestens einer Lernbedingung). Weitere Aktivierungsunterschiede sind in Tab. 3.4 zusammengefasst.

Für den LOP-Effekt (tiefe vs. oberflächliche Lernbedingung) fanden sich keine reliablen Aktivierungsunterschiede in Abhängigkeit vom DRD2-TaqIA-Polymorphismus.



[x, y, z] = [27, 18, 39]  
T = 4.92



**Abb. 3.7: Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf Hirnaktivität bei episodischer Gedächtnisbildung.** Im Vergleich zu A1-Allelträgern zeigten A2-Homozygote eine verstärkte Aktivierung des rechten präfrontalen Kortex bei episodischer Gedächtnisbildung (DM-Effekt). Bar-Plots zeigen Prozent Signaländerung der kanonischen HRF (SPM-Betas für später erinnert vs. später vergessen, auf die kanonische HRF skaliert). [x, y, z]: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem.

**Tab. 3.4:** Aktivierungsunterschiede (DM-Effekt) zwischen DRD2 TaqIA A2-Homozygoten und A1-Allelträgern.

A2 > A1				
	x	y	z	SPM (T)
<b>Gyrus frontalis medius re, BA 8, 10, 46</b>	<b>27</b>	<b>18</b>	<b>39</b>	<b>4.92</b>
	39	33	21	3.40
	45	45	15	3.21
<b>Gyrus frontalis superior re, BA 6</b>	<b>15</b>	<b>18</b>	<b>66</b>	<b>3.99</b>
	24	9	57	3.53
<b>Gyrus frontalis medius li, BA 6, 8, 9</b>	<b>-21</b>	<b>24</b>	<b>45</b>	<b>3.93</b>
	-27	39	42	3.39
	-30	3	69	3.72
<b>Gyrus frontalis superior li, BA 6</b>	<b>-18</b>	<b>12</b>	<b>54</b>	<b>3.30</b>
	-30	-33	-12	4.24
<b>Hippocampus, Gyrus parahippocampalis li</b>	-15	-39	0	3.41
	<b>12</b>	<b>-42</b>	<b>27</b>	<b>3.39</b>
<b>Gyrus cinguli re, BA 24, 31</b>	6	3	45	3.21
	<b>63</b>	<b>-30</b>	<b>45</b>	<b>4.05</b>
	36	-33	33	3.32
Lobulus parietalis superior re, BA 7	39	-60	54	2.77
Lobulus parietalis superior li, BA 42	-60	-27	12	3.42
<b>Lobulus parietalis inferior re, BA 39</b>	<b>48</b>	<b>-66</b>	<b>39</b>	<b>3.61</b>
<b>Gyrus angularis re, BA 39</b>	<b>45</b>	<b>-78</b>	<b>33</b>	<b>2.96</b>
<b>Praecuneus li, BA 7</b>	<b>-15</b>	<b>-78</b>	<b>57</b>	<b>4.05</b>
<b>Gyrus occipitalis medius li, BA 18</b>	<b>-21</b>	<b>-90</b>	<b>9</b>	<b>4.26</b>
<b>Cerebellum re</b>	<b>3</b>	<b>-57</b>	<b>-21</b>	<b>3.85</b>
Hirnstamm re	3	-33	-30	3.00

**A1 > A2**

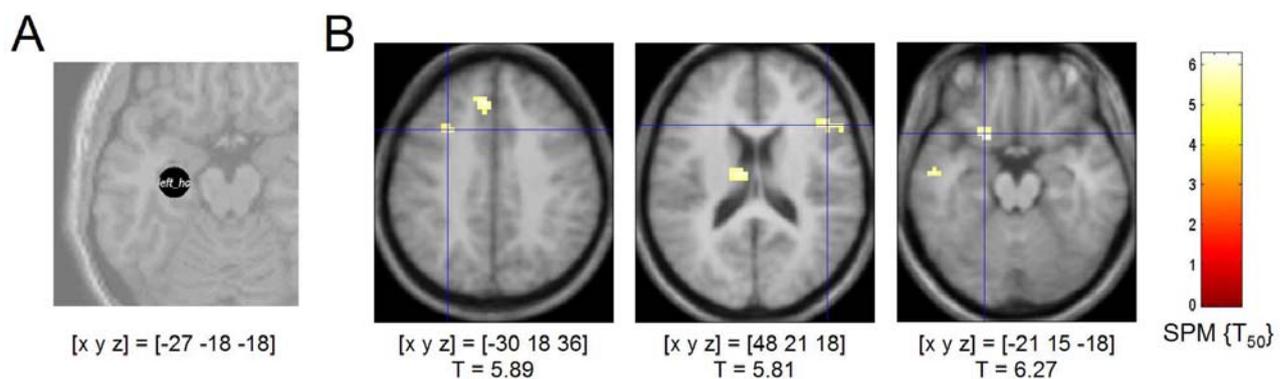
kein Voxel erreicht Aktivierungsschwelle  $p < 0.005$

Lokale Maxima im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Institute). **Fett** gedruckte Regionen zeigen reliable Aktivierungen (nicht-überlappende 95%-Konfidenzintervalle in der Bootstrap-Analyse der SPM-Betas).

### 3.2.2.6. Polymorphismen im Dopamin-System und fronto-hippocampale Konnektivität

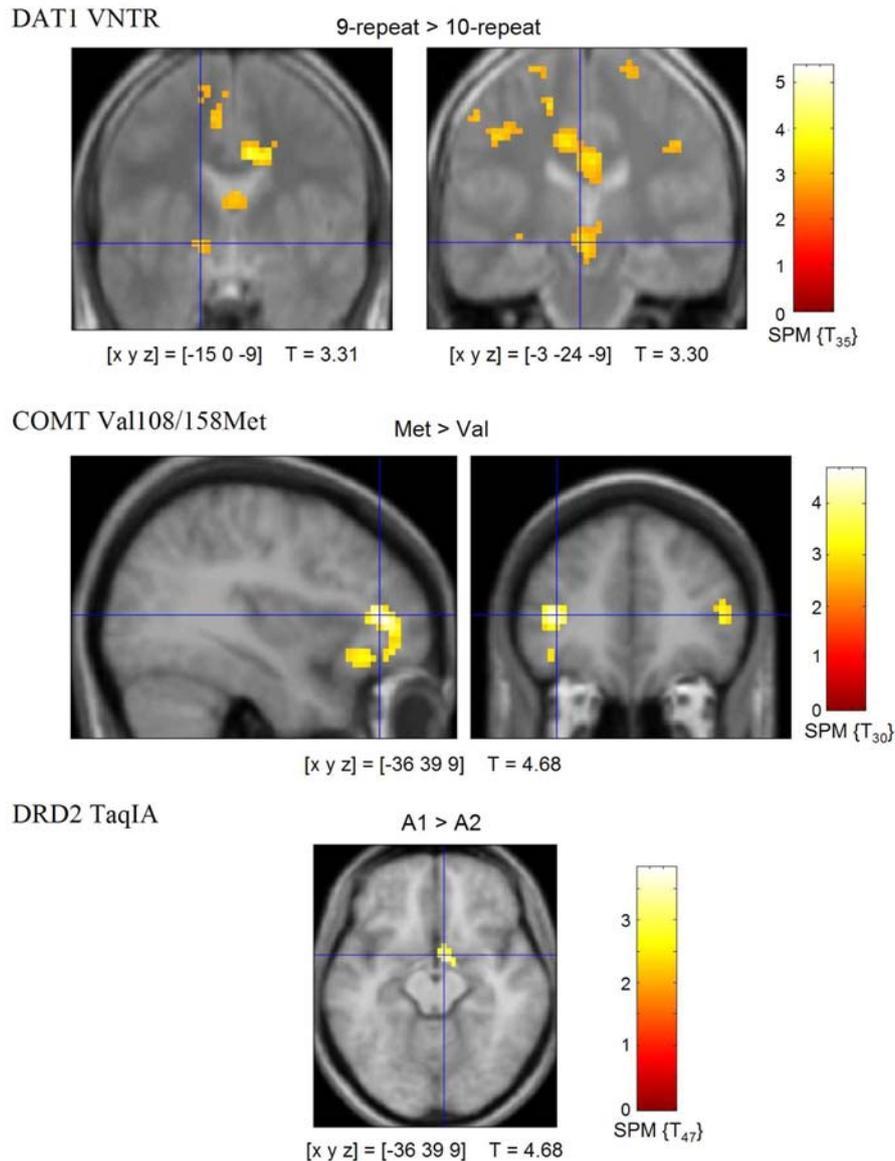
Wie in früheren Studien gezeigt wurde, können genetische Polymorphismen nicht nur die Aktivierung einzelner Hirnregionen beeinflussen, sondern auch die funktionelle Konnektivität

zwischen verschiedenen Hirnregionen (Heinz et al., 2005; Pezawas et al., 2005). In diesem Experiment wurde die Methode der psychophysiologischen Interaktion (PPI; Friston et al., 1997; Gitelman et al., 2003) angewandt, um die funktionelle Kopplung zwischen dem Hippocampus und dem PFC bei erfolgreicher Gedächtnisbildung und einen möglichen Einfluss von Polymorphismen im Dopamin-System auf diese Kopplung zu charakterisieren. Unabhängig vom Genotyp war die erfolgreiche Enkodierung verbaler Stimuli in das episodische Gedächtnis mit verstärkter funktioneller Kopplung des linken Hippocampus mit dem dorsalen PFC beidseits und dem linken orbitofrontalen Kortex (Abb. 3.8) sowie mit der Amygdala und dem Thalamus beidseits assoziiert.



**Abb. 3.8: Funktionelle Konnektivität zwischen dem linken Hippocampus und präfrontalen Regionen.** A: Repräsentative ROI im Bereich des linken anterioren Hippocampus. B: Der linke anteriore Hippocampus zeigte in der gesamten Gruppe eine funktionelle Kopplung mit dem linken (links) und rechten (Mitte) dorsalen PFC und mit dem linken orbitofrontalen Kortex (rechts).

Zwischengruppen-Unterschiede der funktionellen Kopplung des Hippocampus mit entfernten Hirnregionen wurden durch Voxel-weise T-Test-Statistik für unverbundene Stichproben untersucht. Ein Vergleich der PPI-Kontraste von DAT1-9-Repeat-Trägern und 10-Repeat-Homozygoten zeigte, dass der DAT1-VNTR die funktionelle Kopplung zwischen dem Hippocampus und inferior-frontalen Strukturen beeinflusst (basales Vorderhirn, ventrales Striatum, orbitofrontaler Kortex; siehe Abb. 3.9, oben, links). Dabei zeigten 9-Repeat-Träger im Vergleich zu 10-Repeat-Homozygoten eine verstärkte Kopplung des Hippocampus mit diesen Hirnregionen. Daneben fiel eine verstärkte funktionelle Kopplung des Hippocampus mit dem dopaminergen Mittelhirn selbst auf (Abb. 3.9 oben, rechts).



**Abb. 3.9: Genetische Auswirkungen auf die funktionelle Kopplung zwischen dem linken Hippocampus und entfernten Hirnregionen.** Oben: Der DAT1 VNTR beeinflusst die funktionelle Kopplung des Hippocampus mit dem Nucl. accumbens und dem Mittelhirn. Mitte: Der COMT Val108/158Met moduliert die Konnektivität des Hippocampus mit dem präfrontalen Kortex. Unten: Der DRD2 Taq1A-Polymorphismus beeinflusst die Kopplung des Hippocampus mit dem basalen Vorderhirn / Nucl. accumbens. *Bild teilweise übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006.*

Der COMT Val108/158Met-Polymorphismus hatte einen deutlichen Einfluss auf die Enkodierung-spezifische funktionelle Konnektivität zwischen dem linken Hippocampus und dem präfrontalen Kortex beidseits (Abb. 3.9, Mitte). Anders als der DAT1 VNTR beeinflusste der COMT-Polymorphismus aber die Gesamtaktivierung des PFC und die fronto-hippocampale Konnektivität nicht gleichsinnig sondern gegenläufig: Met-Homozygote zeigten im Vergleich zu Val-Homozygoten eine verstärkte funktionelle Kopplung des linken Hippocampus mit dem linken und rechten PFC. Diese Assoziation des Met-Allels mit höherer fronto-hippocampaler Konnektivität zeigte sich auch, wenn nach Geschlecht stratifizierte Subgruppen (siehe oben) verglichen wurden ( $[x, y, z] = [-39, 39, 9]$ ;  $T = 3.85$ ). Durch Regressions-Analyse konnte gezeigt werden, dass der Grad funktioneller fronto-

hippocampaler Konnektivität bei Heterozygoten zwischen den beiden homozygoten Gruppen lag ( $[x, y, z] = [-39, 39, 9]$ ;  $T = 4.67$ ).

Die Auswirkung des DRD2-TaqIA-Polymorphismus auf die funktionelle Konnektivität des Hippocampus mit anderen Hirnstrukturen war gering und beschränkte sich im Wesentlichen auf ein Cluster im Bereich des basalen Vorderhirns / ventralen Striatums, das bei A1-Trägern eine stärkere funktionelle Kopplung mit dem Hippocampus zeigte (Abb. 3.9, unten).

### **3.3. fMRI-Experiment 2: Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson**

#### **3.3.1. Verhaltensdaten**

Demographische Daten und Verhaltensparameter für die drei Probandenpopulationen von Experiment 2 (junge Gesunde, ältere Gesunde, Parkinson-Patienten) sind in Tab. 3.5 zusammengefasst. Alle Studienteilnehmer konnten die Belohnungs-prädizierenden und neutralen Hinweisbilder mit hoher Genauigkeit erkennen, wobei junge Probanden die höchste Antwortgenauigkeit zeigten [Haupteffekt der Probandengruppe:  $F(2,45) = 5.34$ ,  $p = 0.008$ ; einfache ANOVA für Messwiederholungen (% korrekt klassifizierte Belohnungshinweise vs. neutrale Hinweise) mit Probandengruppe als Zwischensubjekt-Faktor]. Jüngere Probanden hatten schnellere Reaktionszeiten (RTs) auf Belohnungshinweise und auf neutrale Hinweise im Vergleich zu älteren Probanden oder Patienten, allerdings waren die RTs für Belohnungs-voraussagende Bilder in der gesamten Population kürzer als für neutrale Bilder [Haupteffekt der Belohnung:  $F(2,45) = 6.61$ ,  $p = 0.014$ ; Haupteffekt der Probandengruppe:  $F(2,45) = 11.23$ ,  $p < 0.001$ ; keine Interaktion ( $p = 0.39$ ); einfache ANOVA für Messwiederholungen ( $RT_{\text{belohnt}}$  vs.  $RT_{\text{unbelohnt}}$ ) mit Probandengruppe als Zwischensubjekt-Faktor].

Der Anteil korrekter Antworten in der Zahlenvergleichsaufgabe war höher in belohnten im Vergleich zu unbelohnten Durchgängen. Zwischen den Gruppen gab es durch die individuell angepassten erforderlichen Reaktionszeiten keinen Unterschied [Haupteffekt der Belohnung:  $F(2,45)=12.89$ ,  $p=0.001$ ; kein Haupteffekt der Probandengruppe, keine Interaktion (alle  $p$ -Werte  $> 0.17$ ); einfache ANOVA für Messwiederholungen (% korrekte Antworten in der Zahlenvergleichsaufgabe bei belohnten vs. unbelohnten Durchgängen) mit Probandengruppe als Zwischensubjekt-Faktor]. Reaktionszeiten in der Zahlenvergleichsaufgabe waren signifikant schneller für belohnte im Vergleich zu unbelohnten Durchgängen, wobei junge Probanden den größten Reaktionszeitvorteil in belohnten Durchgängen zeigten [Haupteffekt der Belohnung:  $F(2,45) = 17.17$ ,  $p < 0.001$ ; Interaktion Belohnung x Probandengruppe:  $F(2,45) = 5.46$ ,  $p = 0.008$ ; der Haupteffekt der Probandengruppe verfehlte knapp Signifikanzniveau ( $F(2,45) = 2.94$ ,  $p = 0.063$ ); einfache

ANOVA für Messwiederholungen ( $RT_{\text{belohnt}}$  vs.  $RT_{\text{unbelohnt}}$ ) mit Probandengruppe als Zwischensubjekt-Faktor].

**Tab. 3.5:** Demographische Informationen und Verhaltensdaten von jungen Probanden, gesunden Älteren und Parkinson-Patienten (Experiment 2).

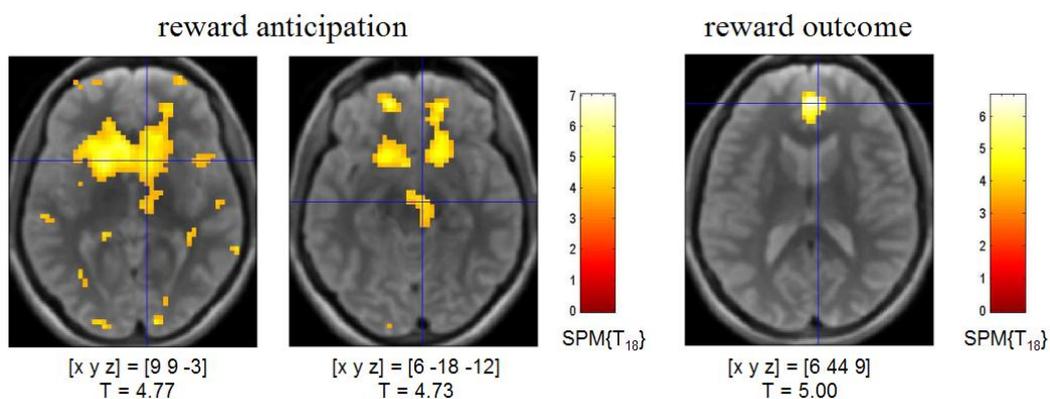
	junge Probanden	ältere Probanden	Patienten
<b>N</b>	18	19	11
<b>Alter</b>	23.3 (+/- 2.5)	69.0 (+/- 4.0)	66.4 (+/- 3.5)
<b>M / F</b>	9 / 9	10 / 9	8 / 3
<b>Belohnungshinweise korrekt</b>	.98 (+/- .026)	.94 (+/- .108)	.86 (+/- .203)
<b>RT (Belohnungshinweise)</b>	662 (+/- 106.7)	854 (+/- 100.4)	886 (+/- 237.3)
<b>neutrale Hinweise korrekt</b>	.97 (+/- .032)	.91 (+/- .094)	.92 (+/- .104)
<b>RT (neutrale Hinweise)</b>	736 (+/- 97.0)	889 (+/- 122.4)	907 (+/- 208.2)
<b>belohnte Targets korrekt</b>	.86 (+/- .089)	.82 (+/- .112)	.78 (+/- .154)
<b>RT (belohnte Targets)</b>	503 (+/- 84.9)	581 (+/- 77.4)	585 (+/- 118.5)
<b>neutrale Targets korrekt</b>	.77 (+/- .167)	.80 (+/- .105)	.73 (+/- .165)
<b>RT (neutral Targets)</b>	546 (+/- 80.5)	585 (+/- 72.0)	603 (+/- 115.3)

*M/F:* männlich / weiblich. Angaben in Proportionen, an 1.0 fehlende resultieren aus nicht klassifizierbaren Antworten. *RT:* Reaktionszeit in ms; *Target:* Zahl in der Zahlenvergleichsaufgabe. *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*

### 3.3.2. fMRI-Daten

#### 3.3.2.1. Neuronale Korrelate der Belohnungsverarbeitung bei jungen Probanden

Der fMRI-Kontrast zwischen Hinweisbildern für belohnte vs. unbelohnte Durchgänge (im folgenden Belohnungserwartungs-Kontrast) zeigte signifikante Aktivierungen ( $p < 0.001$ ,  $k=5$  Voxel) mehrerer Hirnregionen, von denen eine Bedeutung für die Belohnungsprädiktion bekannt ist. Darunter waren große Teile des dorsalen und ventralen Striatums (Putamen beidseits, Nucl. caudatus rechts, Nucl. accumbens beidseits), eine die VTA und rechte SN umfassende Mittelhirnregion (Abb. 3.10 links), der insuläre Kortex beidseits, der mediale präfrontale Kortex, der anteriore Gyrus cinguli und der Thalamus.



**Abb. 3.10: Neuronale Korrelate der Belohnungsverarbeitung bei jungen Probanden.** Links: Bei der Präsentation Belohnungs-prädizierender Bilder zeigen junge Probanden eine Aktivierung des ventralen Striatums und des Mittelhirns beidseits. Rechts: Positives Belohnungs-Feedback ist mit Aktivierungen des medialen PFC assoziiert.  $p < 0.001$ , unkorrigiert; mind. 5 gemeinsam aktivierte benachbarte Voxel. *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*

Im Gegensatz zu diesem Belohnungserwartungs-Kontrast war die Belohnung selbst [positives vs. neutrales Feedback, im folgenden Feedback-Kontrast] bei jungen Probanden nicht mit Aktivierungen des Striatums oder des Mittelhirns assoziiert. Stattdessen zeigten die jungen Probanden bei positivem Feedback lediglich eine Aktivierung des medialen PFC, die bis in den anterioren Gyrus cinguli reichte (Abb. 3.10 rechts).

### *3.3.2.2. Belohnungserwartung und Feedback bei älteren Probanden und Parkinson-Patienten*

Die Aktivierung des Mittelhirns und des ventralen Striatums während der Präsentation von Belohnungs-prädizierenden Hinweisbildern, die bei jungen Probanden beobachtet worden war, fand sich bei älteren Probanden und auch bei Patienten nicht. Der Belohnungserwartungs-Kontrast für ältere Probanden zeigte stattdessen bei  $p < 0.001$  nur ein Aktivierungs-Cluster im Thalamus und ein kleineres im rechten Cerebellum [bei  $p < 0.005$  wurden außerdem Aktivierungs-Cluster im rechten PFC, im rechten Präcuneus, in der linken Amygdala und beidseits im dorsalen, aber nicht im ventralen Striatum beobachtet]. Dagegen zeigten ältere Probanden und Patienten, anders als jüngere Studienteilnehmer, eine robuste Aktivierung des ventralen Striatums, des Mittelhirns und der Insula beim Auftreten der Belohnung selbst [positives vs. neutrales Feedback].

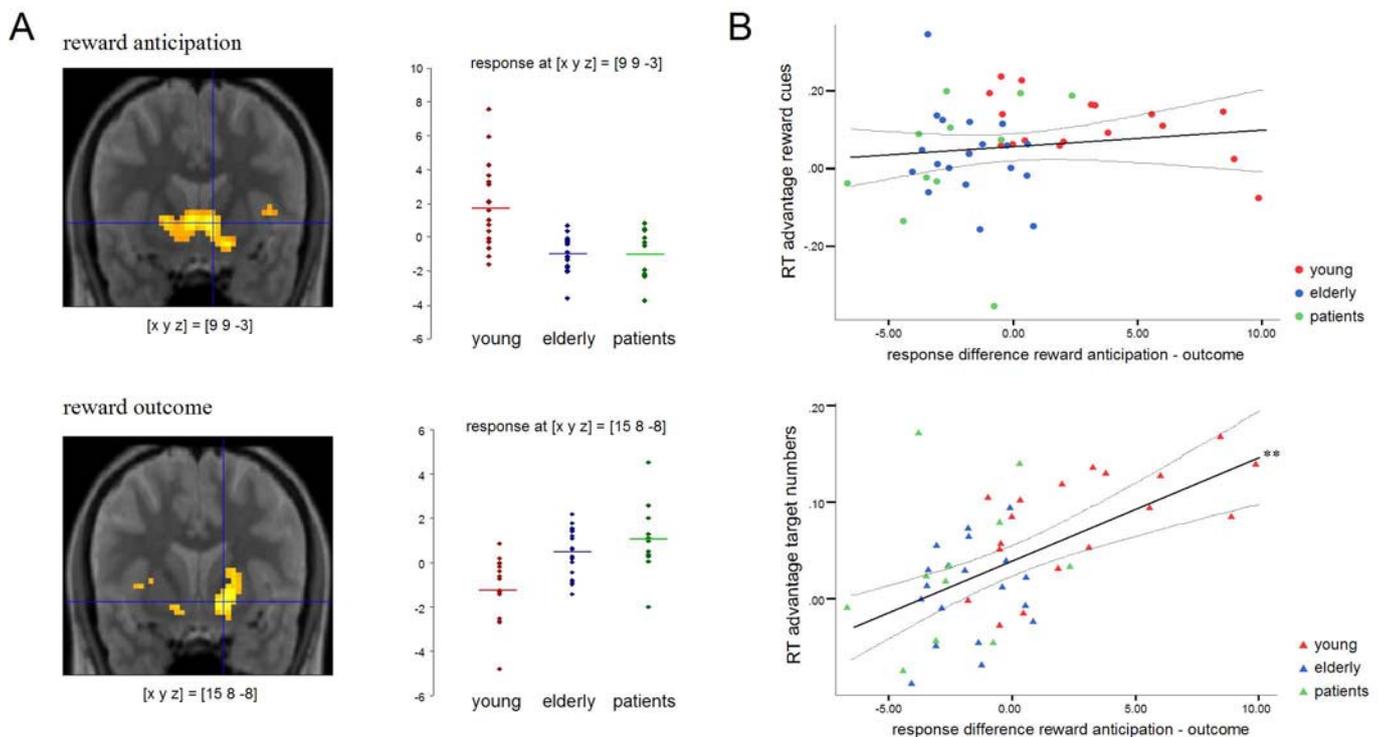
Die ANOVA-Kontraste zur Detektion signifikanter Zwischengruppen-Effekte ergaben sowohl für Belohnungserwartung als auch für Belohnungs-Feedback signifikante Aktivierungsunterschiede im ventralen Striatum, im Mittelhirn und in der Insula. Ein T-Test-basierter Zwischengruppen-Vergleich der Belohnungserwartungs-Kontraste zeigte signifikant stärkere Aktivierungen ( $p < .001$ ,  $k=5$  voxels) im ventralen und dorsalen Striatum sowie im Mittelhirn und der Insula bei jungen Versuchsteilnehmern im Vergleich zu gesunden älteren Probanden und Patienten (Abb. 3.11A, oben, Tab. 3.6). Im Zwischengruppen-Vergleich der Feedback-Kontraste fand sich bei älteren Probanden und Patienten eine signifikant stärkere Aktivierung im ventralen Striatum und in der Insula (Abb. 3.11A, unten, Tab. 3.7) im Vergleich zu den jüngeren Probanden.

Bei einem direkten statistischen Vergleich der Belohnungserwartungs-Kontraste von älteren Probanden und Patienten fanden sich keine signifikanten Aktivierungsunterschiede [um die unterschiedliche Geschlechterverteilung bei älteren Probanden und Patienten zu berücksichtigen, wurde zusätzlich die fMRI-Kontraste der Patienten mit denen einer nach Alter und Geschlecht angepassten Subgruppe gesunder älterer Probanden verglichen ( $N=15$ , 5 weiblich, Altersdurchschnitt = 68.3 Jahre); dabei fanden sich ebenfalls keine Aktivierungsunterschiede].

Bei direktem Vergleich der Feedback-Kontraste von Patienten und gesunden älteren Probanden fand sich bei den Patienten eine verstärkte Aktivierung des medialen PFC und anterioren Gyrus cinguli sowie im Bereich der rechten Substantia nigra (Abb. 3.12, Tab. 3.8)

[diese Aktivierungsunterschiede blieben auch beim Vergleich der Patienten-Kohorte mit den nach Alter und Geschlecht angepassten Kontrollprobanden signifikant].

Da die Erkennungsrate der Belohnungs-prädizierenden Cues bei älteren Probanden und Patienten geringfügig, aber signifikant niedriger war als bei jungen Probanden, wurden Kovarianz-Analysen (ANCOVAs) mit den Erkennungsraten für Belohnungs-prädizierende und neutrale Cues als Kovariaten berechnet. Der Einschluss dieser Kovariaten in das statistische Modell hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die beobachteten Zwischengruppen-Unterschiede bei Belohnungserwartung oder Belohnungs-Feedback; insbesondere zeigten ältere Probanden und Patienten bei Einschluss dieser Kovariaten auch weiterhin keine Verschiebung der Belohnungs-Antwort im ventralen Striatum auf den Zeitpunkt der Cue-Präsentation.



**Abb. 3.11: fMRI-Korrelate von Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback bei älteren Probanden und Patienten mit M. Parkinson.** A: Oben: Aktivierung des ventralen Striatums bei Belohnungserwartung (Belohnungshinweise vs. neutrale Hinweise) war bei jungen Probanden signifikant höher als bei älteren Probanden und bei Parkinson-Patienten. Unten: Ein umgekehrtes Aktivierungsmuster wurde im Feedback-Kontrast (positives vs. neutrales Feedback) beobachtet.  $p < 0.001$ , unkorrigiert; mind. 5 gemeinsam aktivierte benachbarte Voxel; Y-Achse links oben und unten: hämodynamische Antwort an den angegebenen lokalen Maxima. B: Die hämodynamische Antwort-Differenz im ventralen Striatum (Belohnungserwartung – Feedback) war positiv, aber nicht signifikant mit dem relativen Reaktionszeitvorteil für Belohnungshinweise korreliert (oben). Die Korrelation der Antwortdifferenz mit dem relativen Reaktionszeitvorteil bei der Zahlenvergleichsaufgabe war positiv und hoch signifikant (unten). X-Achse: hämodynamische Antwort-Differenz Belohnungserwartung vs. Feedback; Y-Achse: relativer Reaktionszeitvorteil. \*\*:  $p < .001$ . Bild übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.

**Tab. 3.6:** Hirnregionen, die während Belohnungs-Erwartung bei jüngeren im Vergleich zu älteren Probanden eine stärkere Aktivierung zeigten.

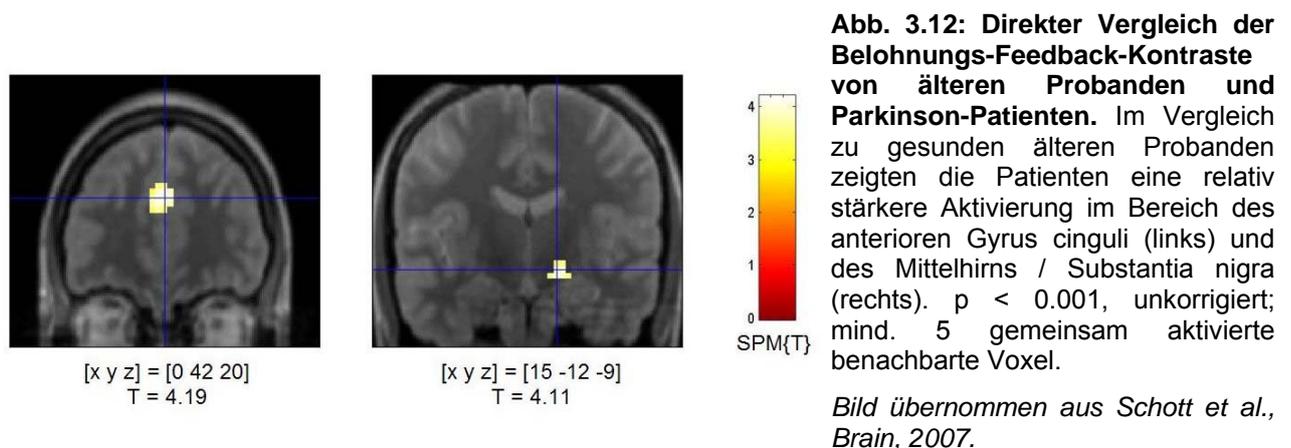
	x	y	z	SPM {T}
Nucl. caudatus li	-3	15	-1	5.31
Nucl. caudatus / Nucl. accumbens re	9	6	-3	4.77
Mittelhirn / VTA li	-6	-24	-11	3.72
Mittelhirn / VTA re	3	-27	-14	3.61
Gyrus frontalis inferior li, BA 46	-42	35	7	3.39
Gyrus frontalis medius li, BA 6, 10	-36	55	-3	3.56
Gyrus praecentralis li, BA 6	-24	-17	64	3.82
Gyrus frontalis inferior re, BA 47	18	11	-13	4.75
Gyrus frontalis medialis re, BA 6	3	-3	61	4.07
Gyrus cinguli anterior, BA 24, 32	6	44	1	4.06
	6	16	24	3.58
	18	44	1	3.56
Insula li, BA 13	-53	-34	21	3.87
	-36	-9	3	3.98
Insula re, BA 13	36	-28	24	4.23
Gyrus temporalis transversus li, BA 41	-53	-23	12	4.53
Gyrus temporalis superior li, BA 22	-36	-49	16	3.62
Gyrus temporalis superior re, BA 42	65	-20	12	4.15
	56	-18	-2	3.55
Gyrus temporalis medius re, BA 22, 39	65	-46	5	4.21
	39	-72	15	3.75
Gyrus temporalis transversus re, BA 41	50	-23	12	3.55
Lobulus parietalis inferior li, BA 40	-50	-36	43	3.93
Lobulus parietalis superior li, BA 7	-27	-55	58	3.82
Gyrus angularis re, BA 39	30	-57	33	3.90
Parietaler Kortex re, BA 2, 3, 40	36	-45	35	3.53
	48	-19	29	3.44
	59	-25	18	3.83
	21	-29	65	3.55
Cuneus re, BA 17, 18	18	-89	18	4.28
	21	-81	21	4.03
	15	-93	2	3.82
	9	-77	29	3.41
Thalamus li	-3	-23	15	4.28
	-21	-26	12	3.72
Thalamus re	18	-23	12	4.17
	15	-11	12	3.90
Cerebellum li	-3	-54	-23	4.12
	-45	-60	-25	3.46
Cerebellum re	30	-48	25	4.89
	3	-63	-32	4.05
	30	-57	-32	3.53

Lokale Maxima im Talairach-Koordinatensystem (Talairach & Tournoux 1988).  $p < 0.001$ , unkorrigiert; mindestens 5 zusammenhängende Voxel. *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*

**Tab. 3.7:** Hirnregionen, die während des Belohnungs-Feedbacks bei älteren im Vergleich zu jüngeren Probanden eine stärkere Aktivierung zeigten.

	x	y	z	SPM {T}
Ventrales Putamen li	-27	-17	4	4.01
	-15	3	3	3.99
Ventrales Putamen / Nucl. accumbens re	18	8	-5	3.94
	21	9	2	3.75
Inusula li	-33	9	0	3.95
Insula re	39	-14	6	4.72
	36	-3	6	3.55
	33	-3	-2	3.41
Gyrus frontalis medialis li, BA 6	-3	-26	59	4.11
Gyrus frontalis medius li, BA 8	-24	25	40	4.00
Gyrus praecentralis li, BA 6	-48	-13	26	3.71
Lobulus paracentralis li, BA 3, 5	-18	-35	54	4.08
	-9	-41	57	3.43
Gyrus praecentralis re, BA 4	33	-29	59	3.65
Gyrus temporalis superior li, BA 22, 41	-50	-14	9	3.93
	-48	-26	4	3.91
Gyrus temporalis medius li, BA 21	-53	-29	-1	4.08
	-48	1	-30	3.76
Gyrus temporalis superior re, BA 21, 22	53	-29	7	3.92
	65	-15	-2	3.77
Gyrus temporalis medius re, BA 21, 39	56	-66	12	4.06
	56	-1	-20	3.65
Gyrus parahippocampalis li	-30	-7	-15	4.59
	-33	-13	-22	4.51
Gyrus fusiformis re, BA 20	27	-42	-23	3.62
Cuneus re, BA 18	18	-87	18	3.48

Lokale Maxima im Talairach-Koordinatensystem (Talairach & Tournoux 1988).  $p < 0.001$ , unkorrigiert; mindestens 5 zusammenhängende Voxel. *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*



**Tab. 3.8:** Hirnregionen, die während des Belohnungs-Feedbacks bei Patienten im Vergleich zu gesunden älteren Probanden eine stärkere Aktivierung zeigten.

	x	y	z	SPM (T)
Medialer präfrontaler Kortex / Gyrus cinguli anterior, BA 9	0	42	20	4.19
Mittelhirn re	15	-12	-9	4.11
Gyrus frontalis superior li, BA 10	-15	64	8	3.86
Gyrus frontalis medius re, BA 10	42	52	-5	3.97
Gyrus frontalis inferior re, BA 44	59	15	16	3.76
Gyrus temporalis medius li, BA 21	-59	-21	-14	4.06
Lobulus parietalis inferior re, BA 40	50	-56	39	3.73

Lokale Maxima im Talairach-Koordinatensystem (Talairach & Tournoux 1988).  $p < 0.001$ , unkorrigiert; mindestens 5 zusammenhängende Voxel. *Tabelle mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., Brain, 2007.*

Über die gesamte Studienpopulation war die hämodynamische Antwort im ventralen Striatum bei der Belohnungs-Prädiktion mit der beim Belohnungs-Feedback negativ korreliert [Pearson's  $r = -0.649$ ,  $p < 0.0001$ ], was darauf hindeutet, dass Probanden ventral-striatale Aktivierung entweder bei der Belohnungserwartung oder beim Belohnungs-Feedback zeigten, aber keine tonische Aktivierung über einen gesamten belohnten Durchgang.

Die negative Korrelation der hämodynamischen Antwort im NAcc zwischen Belohnungserwartung und Feedback ist mit der Hypothese kompatibel, dass das mesolimbische System einen Prädiktionsfehler für die Belohnung berechnet, der dann am größten ist, wenn die Belohnung nicht erwartet wurde. Damit wäre zu erwarten, dass eine Reduktion der Belohnungs-Prädiktions-Antwort mit einem reduzierten Reaktionszeitvorteil für die belohnte Bedingung assoziiert ist. Um diese Vermutung statistisch zu validieren, wurden die relativen Reaktionszeitvorteile für Belohnungserwartung (Reaktion auf die Cues) und Belohnungs-Feedback (Reaktion in der Zahlenaufgabe) berechnet und Pearson-Korrelationen für diese Reaktionszeitmaße und die hämodynamischen Antwortdifferenzen [*fitted response* für Belohnungserwartung – Belohnungs-Feedback, an den entsprechenden lokalen Maxima] durchgeführt. Dabei fand sich eine positive, aber nicht signifikante Korrelation [ $r = .123$ ,  $p = .202$ ] zwischen der ventral-striatalen Antwortdifferenz und RT-Vorteil für Belohnungs-Cues (Abb. 3.11B, oben). Der Belohnungs-abhängige Reaktionszeitvorteil bei der Antwort in der Zahlenaufgabe zeigte dagegen eine stark positive, signifikante, Korrelation mit der Antwortdifferenz im Nucl. accumbens [ $r = .572$ ,  $p < .001$ , einseitig], was darauf hindeuten könnte, dass sich die mesolimbische Antwortverschiebung vor allem auf die motorische Antwort in der tatsächlich Belohnungs-relevanten Aufgabe auswirkt (Abb. 3.11B, unten).

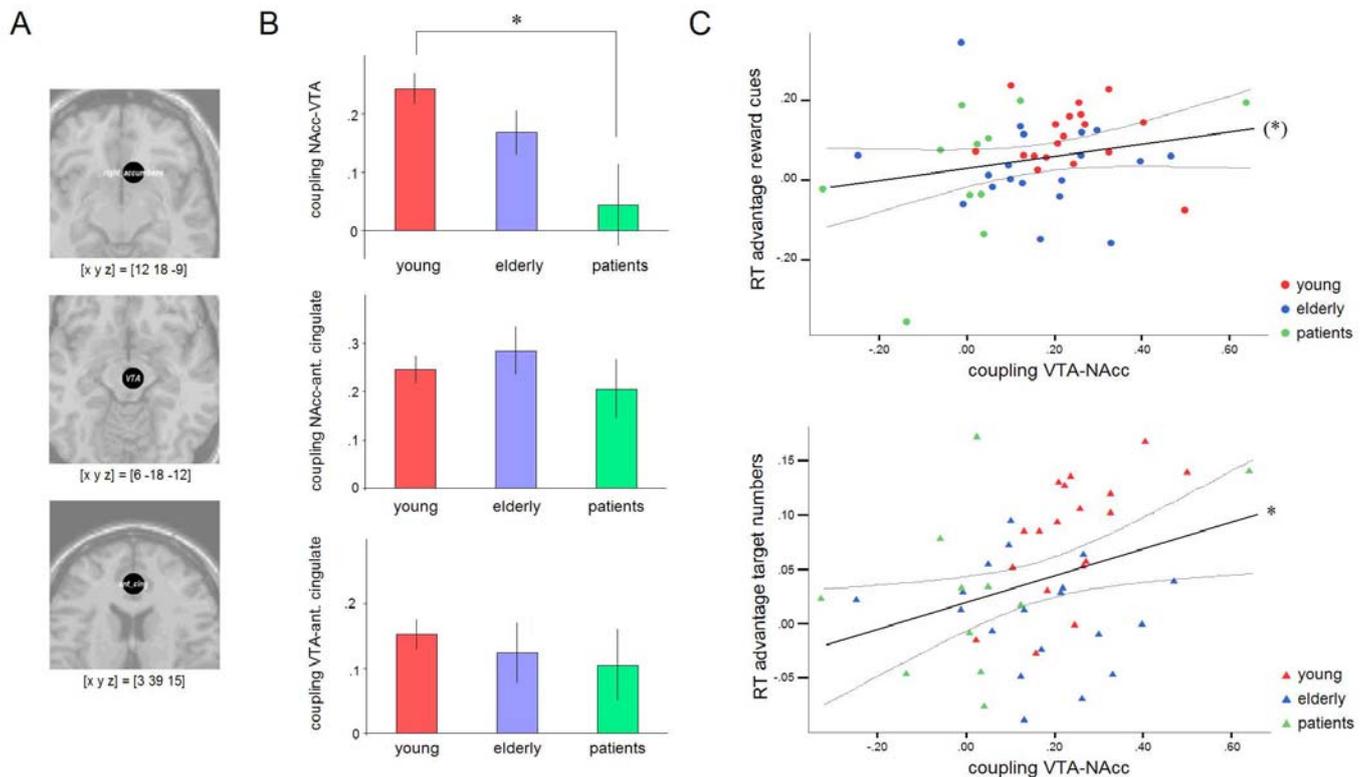
### 3.3.2.3. Mesolimbische funktionelle Konnektivität im Alter und bei M. Parkinson

Die Stärke der funktionellen Konnektivität zwischen dem Nucl. accumbens und der VTA (oben), dem Nucl. accumbens und dem anterioren Gyrus cinguli (Mitte) und der VTA und dem anterioren Gyrus cinguli (unten) ist in Abb. 3.13B für junge Probanden, gesunde ältere

Probanden und Parkinson-Patienten dargestellt [Fisher-z-transformierte Pearson-Korrelationskoeffizienten des Signalverlaufs in den VOIs, siehe Abb. 3.13A]. Über die gesamte Kohorte war die funktionelle Konnektivität zwischen dem ventralen Striatum und dem Mittelhirn signifikant positiv [ $t(47)=6.48$ ,  $p<.001$ ]. Eine einfache ANOVA über die Konnektivitätswerte der drei Gruppen erbrachte einen signifikanten Zwischengruppeneffekt [ $F(2,45)=4.91$ ,  $p=.012$ ], und *post hoc* T-Tests zeigten eine Reduktion der funktionellen Konnektivität zwischen Mittelhirn und ventralem Striatum bei den Patienten im Vergleich zu den jungen, gesunden Probanden [ $t(27)=3.12$ ,  $p=.004$ ], aber keine weiteren signifikanten Zwischengruppen-Unterschiede [alle  $p>.098$ ] (Abb. 3.13B, oben).

Um zu testen, ob sich diese scheinbare Reduktion der funktionellen Konnektivität zwischen Mittelhirn und ventralem Striatum bei Parkinson-Patienten in den Verhaltensdaten widerspiegelt, wurden Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den Fisher-z-transformierten Korrelationskoeffizienten der Signalverläufe in Mittelhirn und ventralem Striatum und den relativen Reaktionszeitvorteilen (siehe oben) berechnet. Die Korrelation zwischen der funktionellen Kopplung von VTA und NAcc mit dem Reaktionszeitvorteil für Belohnungs-Cues war positiv und näherte sich dem Signifikanzniveau von  $p<.05$  an [ $r=.228$ ,  $p=.059$ ] (Abb. 3.13C, oben). Der Reaktionszeitvorteil in der Zahlenvergleichsaufgabe korrelierte ebenfalls positiv mit der funktionellen Konnektivität von VTA und NAcc [ $r=.337$ ,  $p=.010$ ] (Abb. 3.13C, unten). In einer partiellen Korrelationsanalyse, die für die mesolimbische Antwortdifferenz [Belohnungserwartung vs. Feedback, s. o.] kontrollierte, blieb die Korrelation positiv, war aber nicht mehr bei  $p<.05$  signifikant [ $r=.167$ ,  $p=.267$ ].

Die funktionelle Konnektivität zwischen dem NAcc und dem anterioren Gyrus cinguli war in der Gesamtgruppe signifikant positiv [ $t(47)=9.61$ ,  $p<.001$ ], es fanden sich jedoch keine signifikanten Zwischengruppen-Unterschiede [ $F(2,45)=.608$ ,  $p=.512$ ] (Abb. 3.13B, Mitte) und keine signifikante Korrelation der Konnektivität dieser Hirnregionen mit den Reaktionszeitvorteilen für Belohnungserwartung oder die Zahlenaufgabe [alle  $p>.274$ ]. Darüber hinaus fand sich eine schwache [ $r=.13$ ], aber signifikante [ $T(47)=5.49$ ,  $p<.001$ ] funktionelle Konnektivität zwischen dem Mittelhirn / VTA und dem anterioren Gyrus cinguli (Abb. 3.13B, unten), die ebenfalls keine Zwischengruppen-Unterschiede aufwies [ $F(2,45)=.301$ ,  $p=.742$ ], aber signifikant mit den Reaktionszeitvorteilen für Belohnungs-Cues [ $r=.293$ ,  $p=.022$ ] und für die Zahlenaufgabe [ $r=.352$ ,  $p=.007$ ] korrelierte.

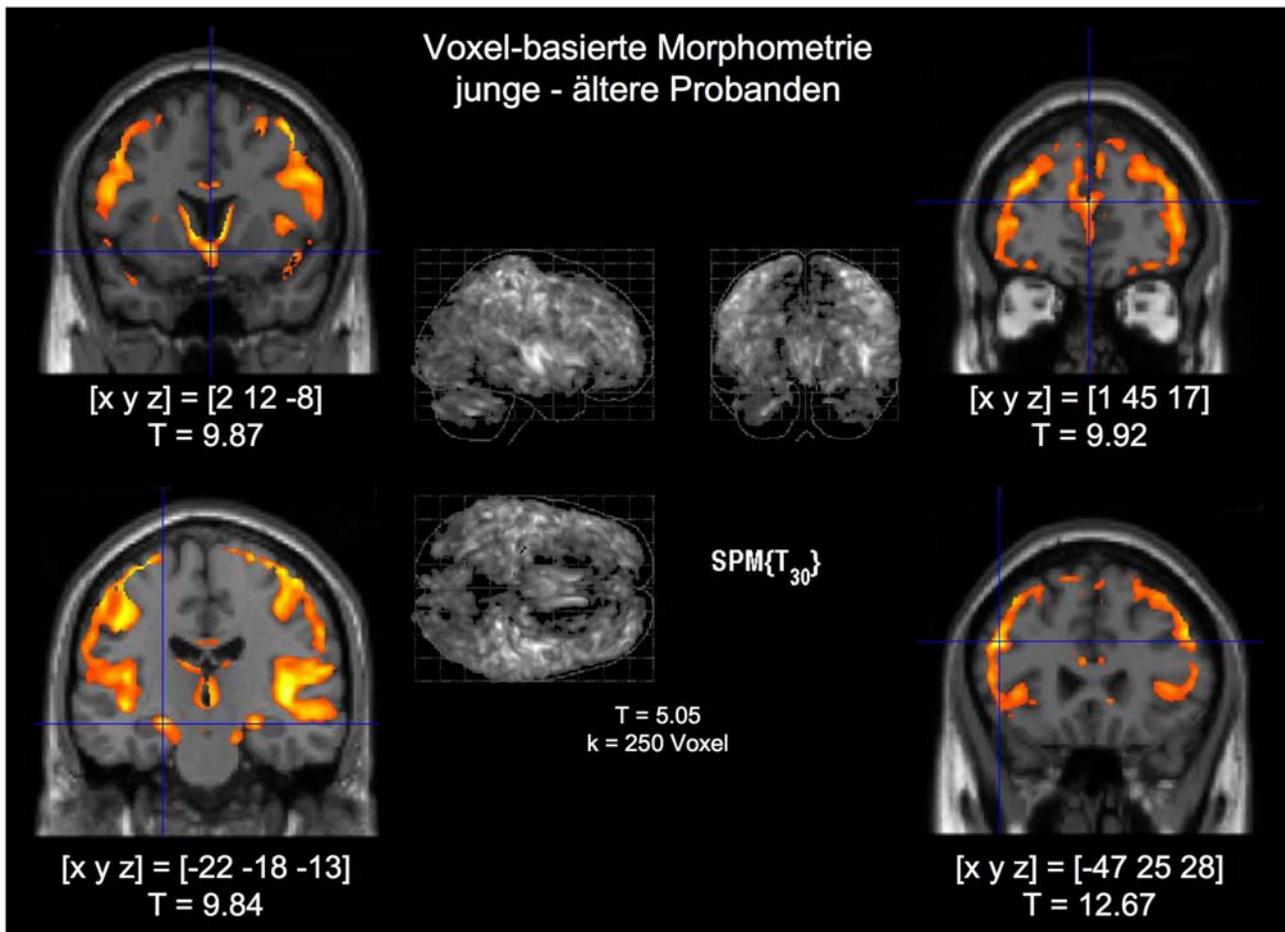


**Abb. 3.13: Funktionelle Konnektivität des Mittelhirns mit dem ventralen Striatum bei jungen Probanden, älteren Probanden und Parkinson-Patienten.** A: Repräsentative ROIs im rechten Nucl. accumbens (oben), im rechten medialen Mittelhirn (Mitte) und im anterioren Gyrus cinguli (unten). B: Funktionelle Kopplung des Mittelhirns mit dem ventralen Striatum (oben), des ventralen Striatums mit dem anterioren Gyrus cinguli (Mitte) und des Mittelhirns mit dem anterioren Gyrus cinguli (unten) bei jungen Probanden, gesunden älteren Probanden und Patienten [Fisher-z-transformierte Korrelationskoeffizienten; Mittelwert +/- Standardmessfehler]. Der Unterschied zwischen dem Grad der funktionellen Konnektivität zwischen Mittelhirn und ventralem Striatum war beim Vergleich von jungen Probanden und Patienten signifikant ( $p < .01$ ). C: Korrelation zwischen der funktionellen Konnektivität von Mittelhirn und ventralem Striatum für Belohnungs-Cues (oben) und Belohnungs-Feedback (unten). X-Achse: Fisher-z-transformierte Korrelationskoeffizienten des fMRI-Zeitverlaufs in den ROIs; Y-Achse: relativer Reaktionszeitvorteil. \*:  $p < .05$ , (\*):  $p < .1$ . Bild übernommen aus Schott et al., *Brain*, 2007.

### 3.3.3. Altersbedingte neuromorphologische Veränderungen

Voxel-basierte Morphometrie (VBM) wurde verwendet, um altersbedingte Volumenabnahme der grauen Substanz bei den älteren Probanden im Vergleich zu den jüngeren zu quantifizieren. Dafür wurden die hochauflösenden T1-gewichteten MR-Aufnahmen von allen 19 älteren Probanden und von 13 jüngeren Probanden verwendet [fünf jüngere Probanden standen nicht für weitere MRT-Messungen zur Verfügung]. Die Ergebnisse der VBM-Analyse sind in Abb. 3.13 dargestellt. In Übereinstimmung mit früheren Studien zu altersabhängigen neuroanatomischen Veränderungen (Good et al., 2001) zeigten die älteren Probanden im Vergleich zur jüngeren Population eine weit verteilte kortikale und subkortikale Abnahme der grauen Substanz (siehe SPM-Übersicht, Abb. 3.14 Mitte), insbesondere im Bereich des limbischen Systems (Hippocampus, anteriorer Gyrus cinguli) und des PFC. Ausgeprägte Reduktion der grauen Substanz war auch in Hirnregionen zu beobachten, die bei der

Verarbeitung von Erwartungswerten von Bedeutung sind (Knutson et al., 2005), insbesondere im Bereich der Basalganglien (Nucl. caudatus bds, Nucl. accumbens rechts) und des medialen präfrontalen Kortex.



**Abb. 3.14: Neuromorphologische Veränderungen bei älteren im Vergleich zu jüngeren Probanden (Population von Experiment 2).** Mitte: Übersicht über signifikante Unterschiede in der Dichte der grauen Substanz (jung > alt). Oben: Signifikante Volumenunterschiede der grauen Substanz (ältere < jüngere Probanden) fanden sich unter anderem im Nucl. accumbens beidseits (links) und im medialen PFC (rechts). Unten: Ähnlich wie in früheren VBM-Studien fand sich bei älteren Probanden auch eine Reduktion der grauen Substanz im Hippocampus beidseits (links) und im dorsolateralen PFC (rechts.  $p < 0.00001$ , unkorrigiert; Clustergröße mind. 250 zusammenhängende Voxel.

### **3.4. Molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen**

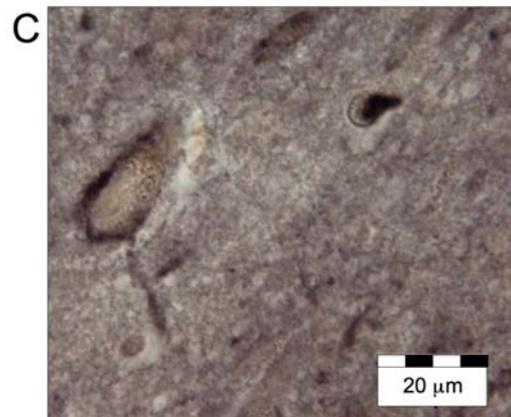
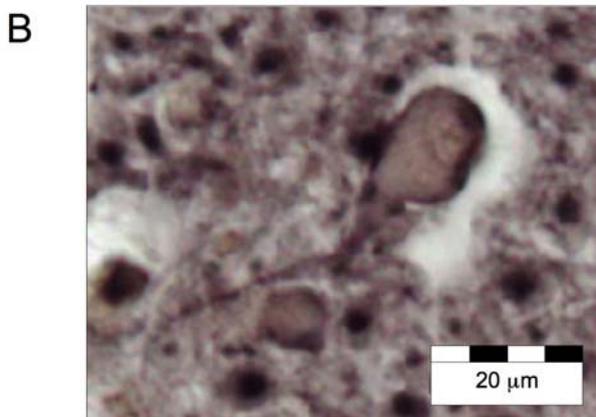
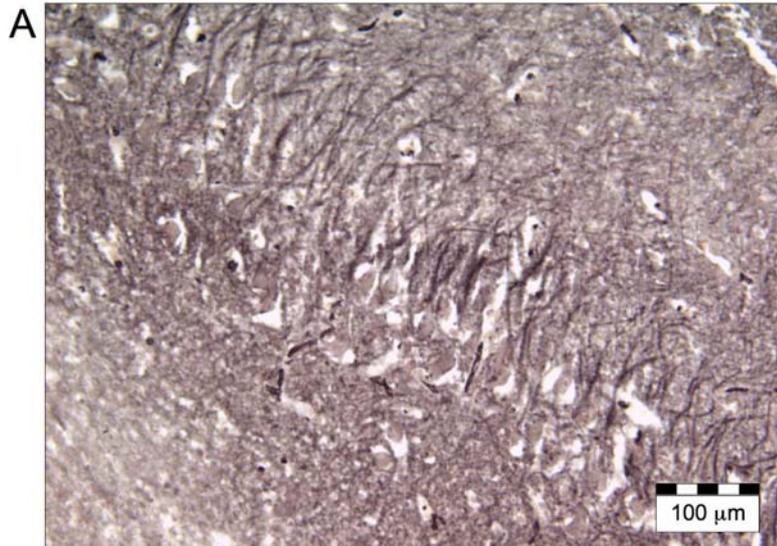
Obwohl einige molekulare und zelluläre Auswirkungen der Polymorphismen in DAT1 und COMT bekannt sind, sind ihre genauen Konsequenzen für den Dopamin-Metabolismus in Striatum, Kortex und Hippocampus noch nicht vollständig geklärt. Daher wurden in Ergänzung zu fMRI-Experiment 1 molekularbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen zur anatomischen (DAT1) und subzellulären (COMT) Lokalisierung durchgeführt.

#### ***3.4.1. Dopamin-Transporter-Expression im humanen Hippocampus***

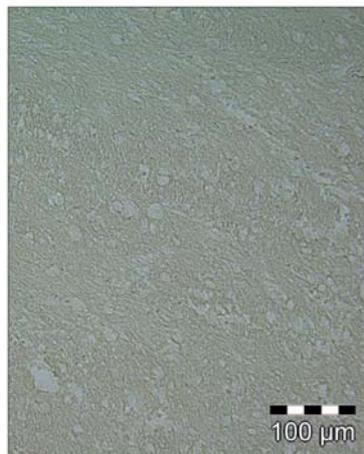
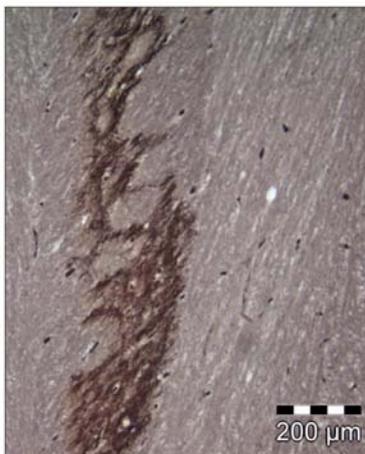
Frühere Untersuchungen der Dopamin-Transporter-Verteilung im menschlichen Gehirn hatten eine hohe Expressionsdichte im Striatum und eine geringe Expression im präfrontalen Kortex gezeigt (Ciliax et al., 1999), aber keine Information über DAT1-Expression im Hippocampus geliefert. Um die spezifischen funktionell-anatomischen Unterschiede der Hirnaktivierungen bei DAT1-9-Repeat-Trägern und 10-Repeat-Homozygoten in Experiment 1 besser im Kontext der von Lisman und Grace (2005) postulierten Hippocampus-VTA-Schleife (Abb. 1.9) interpretieren zu können, wurden immunhistochemische und proteinbiochemische Untersuchungen durchgeführt, die übereinstimmend auf eine DAT1-Expression im humanen Hippocampus hinweisen.

##### ***3.4.1.1. Immunhistochemie***

Die immunhistochemischen Untersuchungen ergaben, in Übereinstimmung mit früheren Studien, dass DAT1 im menschlichen Gehirn weit verbreitet, aber ungleichmäßig exprimiert wird (Ciliax et al., 1999). Im Hippocampus fand sich ein feines Netzwerk DAT1-immunreaktiver Fasern in den Regionen CA3 und CA4 des Ammonshorns (Abb. 3.15A). Dagegen war die Dopamin-Transporter-Immunreaktivität im Gyrus dentatus eher im Bereich der Perikaryen einzelner Neurone verteilt (Abb. 3.15B). Im Subiculum fanden sich ebenfalls einzelne Neurone, deren Perikaryen von DAT1-immunreaktivem Material umgeben waren (Abb. 3.15C). In der CA1-Region des Ammonshorns konnte dagegen keine eindeutige DAT1-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde, wie erwartet, eine starke DAT1-Immunreaktivität im Striatum (Abb. 3.16, links), und auch in der Substantia nigra selbst beobachtet. Kontrollschnitte, die mit Ig-freiem Kaninchenserum anstelle des Primärantikörpers inkubiert worden waren, zeigten keinerlei Immunreaktivität (Abb. 3.16, rechts).



**Abb. 3.15: Dopamin-Transporter-Expression im humanen Hippocampus.** A: DAT1-immunreaktives Fasernetzwerk in der CA3-Region. B: Im Gyrus dentatus fanden sich einzelne Perikaryen, die von DAT1-immunreaktivem Material umgeben waren. C: Von DAT1-immunreaktivem Material umgebene Zellkörper waren außerdem im Subiculum zu beobachten. *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006.*

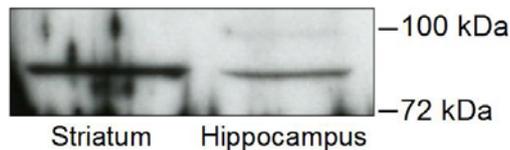


**Abb. 3.16: Kontrollen für die Immunhistochemie.** Links: In Übereinstimmung mit früheren Studien fand sich ein dichtes DAT1-immunreaktives Netzwerk im Striatum. Rechts: Kontrolle ohne Primärantikörper. *Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., J Neurosci, 2006, supplementary online material.*

#### 3.4.1.2. Western Blot

Die Western-Blot-Untersuchung des humanen *post mortem*-Hirnmaterials wurde mit dem selben Primärantikörper durchgeführt wie die immunhistochemischen Untersuchungen. In

den Membranfraktionen (S2) von humanem Hippocampus und Striatum HH konnte die Expression eines DAT1-immunreaktiven Proteins von ~85 kDa nachgewiesen werden, das, wie erwartet im Striatum stärker exprimiert wurde, als im Hippocampus (Abb. 3.17). Die apparente Größe des Proteins stimmte mit den Ergebnissen früherer Studien überein (Kadota et al., 1996).



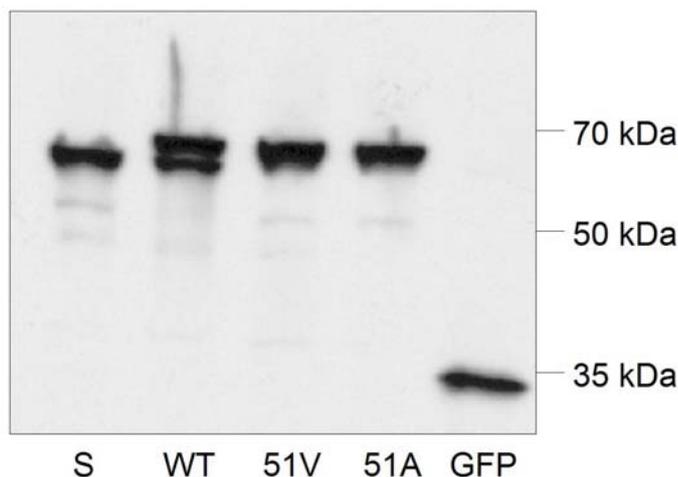
**Abb. 3.17: DAT1-Nachweis im Western Blot.** Bei Verwendung des gleichen Antikörpers wie in der Immunhistochemie fand sich eine DAT1-reaktive Bande bei ca. 85 kDa sowohl im Striatum als auch im Hippocampus (Membranfraktion). Bild mit Anpassungen übernommen aus Schott et al., *J Neurosci*, 2006.

### 3.4.2. Zelluläre Verteilung und Membranorientierung membranständiger COMT

Zur Untersuchung der zellulären Verteilung und Orientierung (intra- vs. extrazellulär) der membranständigen COMT waren COMT-GFP-Fusionskonstrukte verwendet worden.

#### 3.4.2.1. Expression der COMT-GFP-Fusionskonstrukte

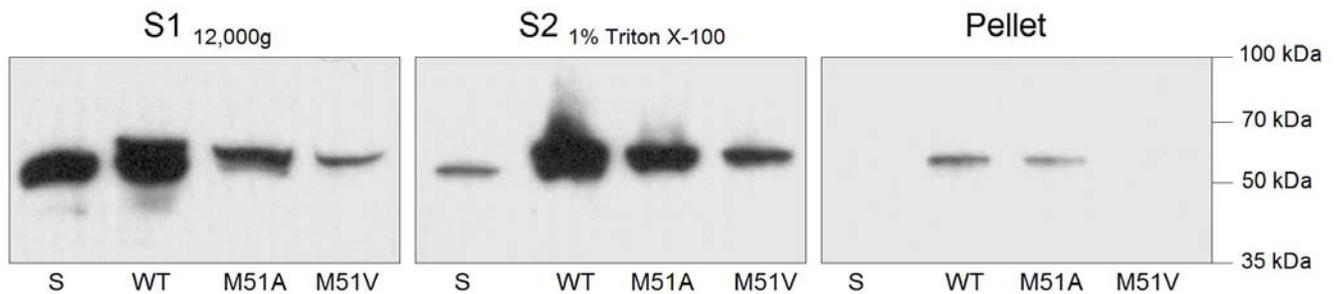
Die korrekte Expression der GFP-Fusionsproteine für die verschiedenen COMT-Isoformen (S-COMT, MB-COMT-WT, MB-COMT-Ala, MB-COMT-Val) waren zunächst COS7-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden (sowie mit dem Vektor pEGFP-N1 ohne Insert als Kontrolle) transfiziert worden. Die Überprüfung im Western Blot mit einem murinen  $\alpha$ GFP-Antikörper als Primärantikörper zeigte eine Co-Expression von MB-COMT-GFP und S-COMT-GFP für den Wildtyp, nicht aber für die mutierten Varianten (Abb. 3.18).



**Abb. 3.18: COMT-GFP-Fusionsproteine.** Während bei der Wildtyp-Variante der MB-COMT (WT) eine Co-Expression eines Proteins in der Größe des S-COMT-GFP-Fusionsproteins (S) beobachtet wird, findet sich diese bei den mutierten Varianten (51V, 51A) nicht. GFP: grünes fluoreszierendes Protein (Zellen wurden mit pEGFP-N1 ohne Insert als Kontrolle transfiziert).

Zur Überprüfung der korrekten Lokalisierung der COMT-GFP-Fusionsproteine wurden transfizierte COS7-Zellen in lösliche Proteine (inkl. Mikrosomen), membranständige Proteine (löslich in 1% Triton-X100) und Zytoskelett-verankerte Proteine (unlöslich in 1% Triton-X100) fraktioniert und nach Auftrennung über SDS-PAGE im Western-Blot visualisiert (Maus- $\alpha$ GFP, Abcam, als Primärantikörper). Während sich S-COMT zum ganz überwiegenden Teil

in der löslichen Fraktion fand, waren sowohl der Wildtyp als auch die mutierten Varianten der membranständigen Form überwiegend in der Membranfraktion lokalisiert (Abb. 3.19).

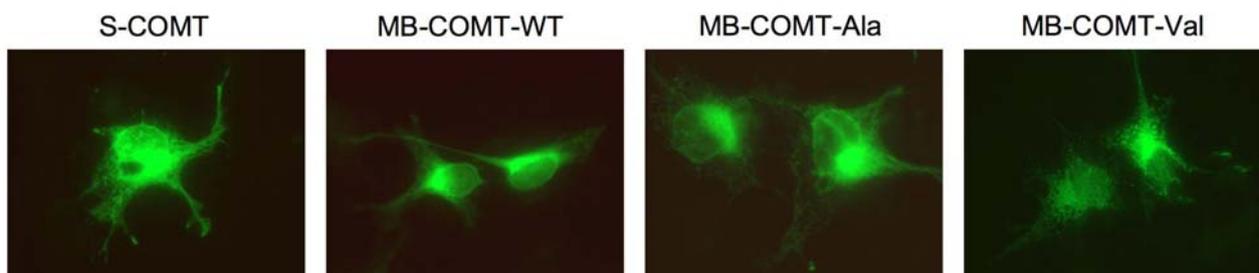


**Abb. 3.19: Zelluläre Verteilung von COMT-GFP-Fusionsproteinen.** S1: In der löslichen Fraktion war vor allem die S-COMT (S, untere Bande bei WT) lokalisiert. S2: In der Membranfraktion (solubilisiert mit Triton-X100) fand sich der größte Teil der MB-COMT. Pellet: Geringe Anteile der MB-COMT konnten in der Triton-unlöslichen Fraktion detektiert werden.

Damit konnte davon ausgegangen werden, dass sich COMT-GFP-Fusionskonstrukte in ihrer zellulären Lokalisierung weitgehend wie native COMT verhalten (Ulmanen et al., 1997).

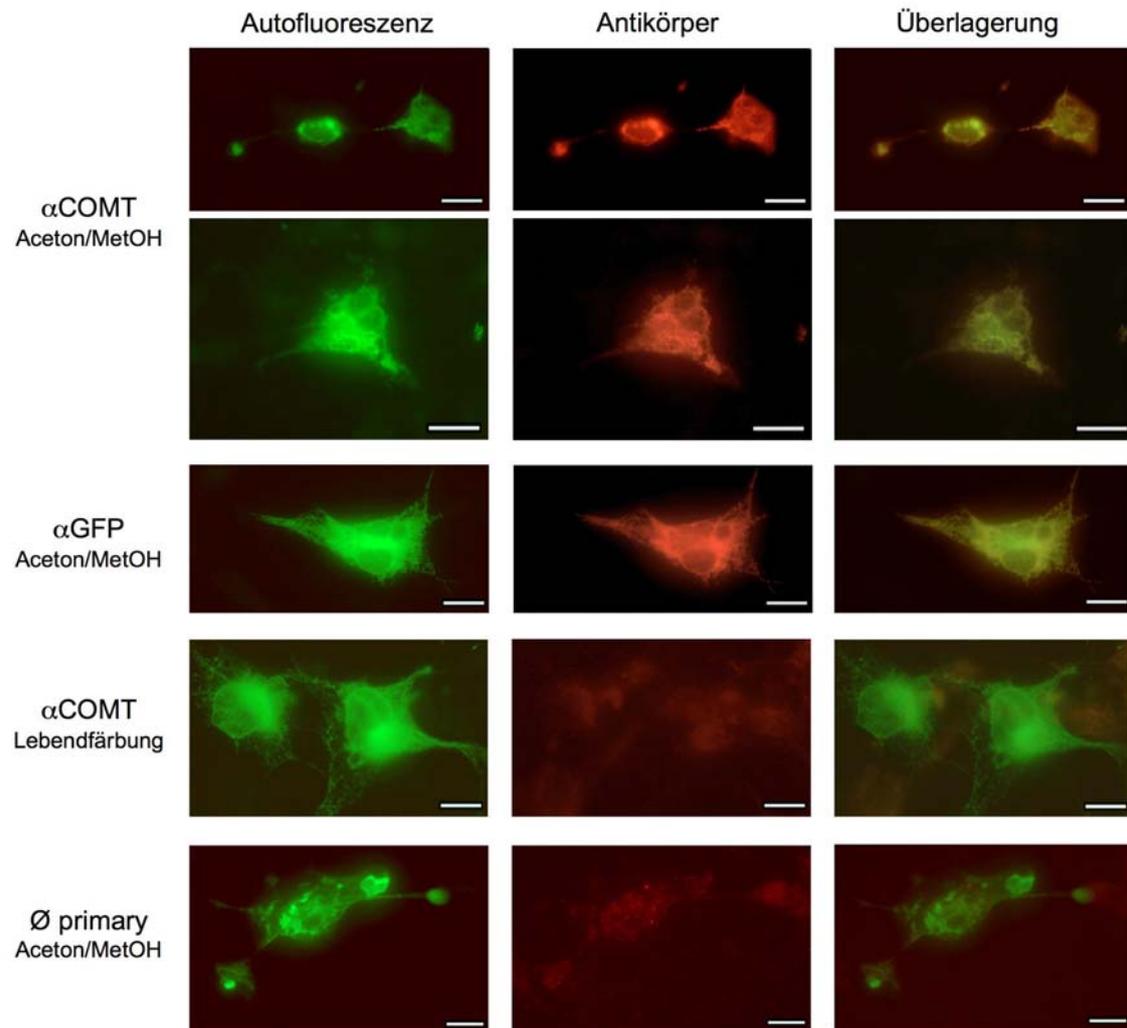
#### 3.4.2.2. Immuncytochemie in COS7-Zellen

Um die zelluläre Lokalisierung und Membranorientierung der MB-COMT weiter zu charakterisieren, wurden COS7-Zellen mit den COMT-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert (Abb. 3.20). Dabei fanden sich keine relevanten Unterschiede in der GFP-Autofluoreszenzverteilung der Fusionskonstrukte für die beiden mutierten MB-COMT-Varianten (Ala vs. Val).



**Abb. 3.20: Expression von COMT-GFP-Fusionsproteinen in COS7-Zellen.** Für alle Konstrukte ist die Autofluoreszenz des GFP-Tags dargestellt. S-COMT zeigt eine cytosolische Lokalisierung. Bei der Transfektion mit nativer MB-COMT überlagert die Co-Expression von cytosolischer S-COMT das Verteilungsbild. Mutierte Konstrukte (MB-COMT-Ala und MB-COMT-Val) zeigen eine Verteilung in membranösen Organellen, wahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum und im Golgi-Apparat.

Um eine mögliche extrazelluläre Membranorientierung der MB-COMT in COS7-Zellen zu untersuchen, wurden mit dem MB-COMT-Ala-GFP-Konstrukt transfizierte Zellen mit Antikörpern gegen COMT und gegen GFP gefärbt. Mit Methanol/Aceton permeabilisierte Zellen zeigten eine ausgeprägte Überlappung der Antikörperfluoreszenz mit der GFP-Autofluoreszenz des Konstruktes. Nach Lebendfärbung unpermeabilisierter Zellen war keine relevante Kollokalisierung der Antikörperfluoreszenz mit der GFP-Autofluoreszenz zu beobachten, was auf eine intrazelluläre Orientierung der MB-COMT hindeutet (Abb. 3.21).

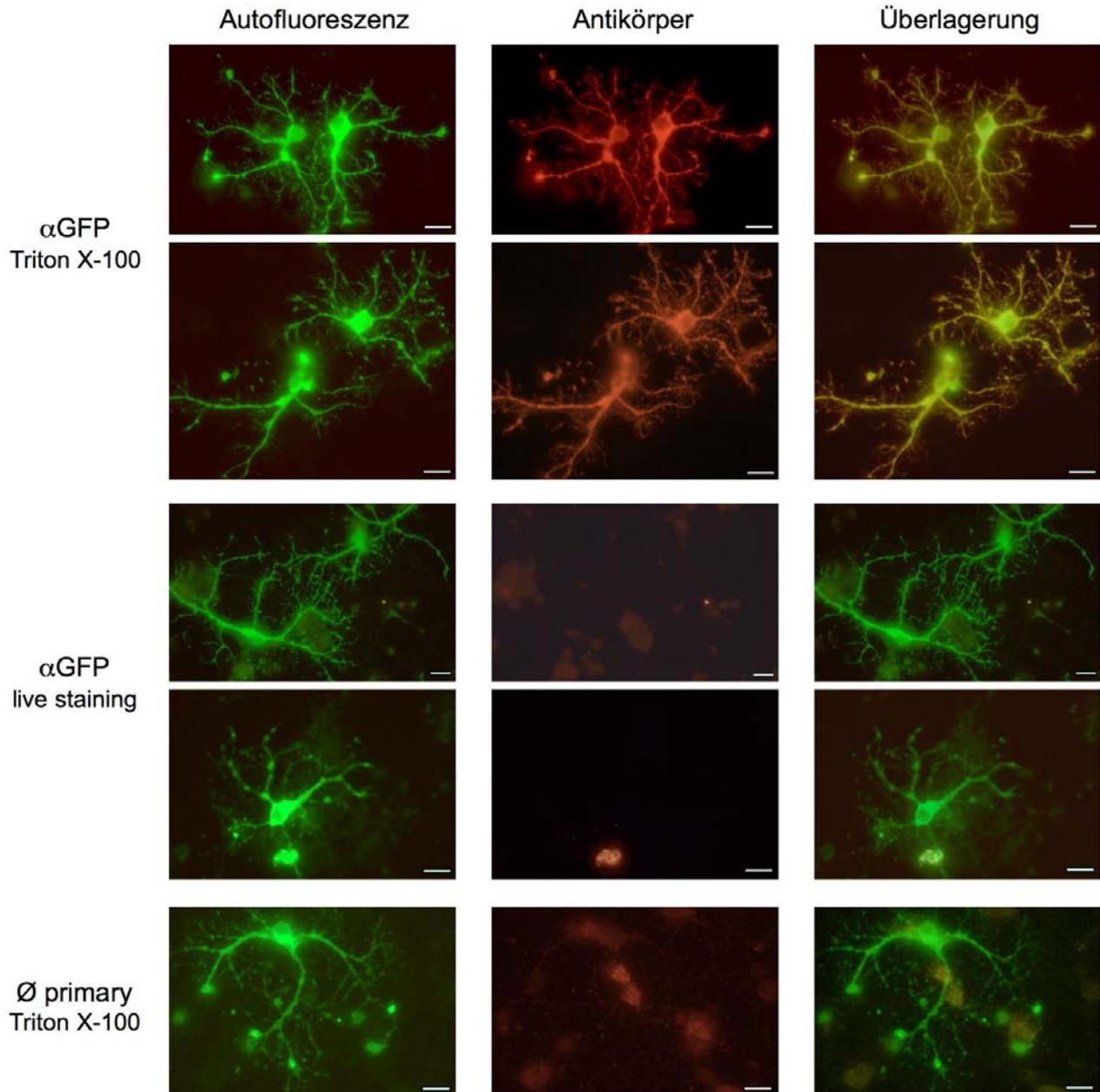


**Abb. 3.21: Immuncytochemie von COMT-GFP-Fusionsproteinen in COS7-Zellen.** Alle Bilder zeigen mit MB-COMT-Ala-GFP transfizierte Zellen. Reihe 1 – 3: Nach Permeabilisierung mit Methanol/Aceton wurde eine weitgehende Überlappung von GFP-Autofluoreszenz und Antikörperfluoreszenz beobachtet. Reihe 4: Nach Lebendfärbung unpermeabilisierter Zellen fand sich keine relevante Überlappung. Reihe 5: Kontrolle ohne Primärantikörper. Balken entsprechen 15  $\mu$ m.

#### 3.4.2.2. Immuncytochemie in neuronalen Zellen

Um zu testen, ob sich die zelluläre Lokalisierung und Membranorientierung der MB-COMT zwischen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen unterscheidet, insbesondere, ob es möglicherweise eine Neuronen-spezifische extrazelluläre Orientierung der COMT gibt, wurden embryonale Kortexneurone von Ratten mit den COMT-GFP-Fusionskonstrukten transfiziert und analog zu den COS7-Zellen immuncytochemisch untersucht.

Wie bei den COS7-Zellen war eine Überlagerung der GFP-Autofluoreszenz mit der Antikörper-Fluoreszenz nur nach Permeabilisierung der Zellen zu beobachten, was darauf hindeutet, dass neuronale MB-COMT ebenfalls intrazellulär orientiert ist (Abb. 3.22).



**Abb. 3.22: Immuncytochemie von COMT-GFP-Fusionsproteinen in Kortex-Neuronen (*Rattus norvegicus*, E17, DIV 12).** Alle Bilder zeigen mit MB-COMT-Ala-GFP transfizierte Zellen. Reihe 1, 2: Nach Permeabilisierung mit Triton X-100 wurde eine weitgehende Überlappung von GFP-Autofluoreszenz und Antikörperfluoreszenz beobachtet. Reihe 3, 4: Nach Lebendfärbung unpermeabilisierter Zellen fand sich keine relevante Überlappung. Reihe 5: Kontrolle ohne Primärantikörper. Balken entsprechen 15  $\mu\text{m}$ .

## **4. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels fMRI in Kombination mit molekulargenetischen und biochemischen Ansätzen die Rolle dopaminerger Neuromodulation bei unterschiedlichen Lernprozessen untersucht, wobei die Auswirkungen physiologischer (Genetik, Alter) und pathologischer (M. Parkinson) interindividueller Variabilität im Mittelpunkt standen. Die Ergebnisse der zellbiologischen Untersuchungen werden aufgrund des engen inhaltlichen Zusammenhangs im Rahmen von fMRI-Experiment 1 diskutiert.

### **4.1. Dopaminerge Einflüsse auf Hippocampus-abhängige Gedächtnisprozesse**

Während fMRI-Aktivierungen im Bereich der Substantia nigra / VTA bei Belohnungsverarbeitung bereits zuvor beobachtet worden waren, war eine Aktivierung dieser Hirnregionen bei Hippocampus-abhängigen Gedächtnisprozessen bisher nicht beschrieben worden. Eine vermutete Bedeutung dopaminerger Neuromodulation für Hippocampus-abhängige Gedächtnisprozesse wurde außerdem durch die Beobachtung untermauert, dass genetische Polymorphismen in Dopamin-Inaktivierungswegen (DAT1, COMT) und im Dopamin-D2-Rezeptor-Gen die Hirnaktivität bei episodischer Gedächtnisbildung regional spezifisch modulieren. Die Beobachtung, dass der DAT1 VNTR die Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns selbst sowie die Aktivität im ventralen Striatum beeinflusst, während der COMT Val108/158Met-Polymorphismus kortikale Aktivierungsmuster und fronto-hippocampale Konnektivität beeinflusst, passt zu früheren Resultaten, die besagen, dass das Dopamin-Signal im Mittelhirn und Striatum in erster Linie durch DAT1-abhängige Wiederaufnahme terminiert wird, während COMT eine wichtige Rolle bei der präfrontalen Dopamin-Inaktivierung spielt.

Im Folgenden soll die mögliche Bedeutung dieser Resultate für Modelle Hippocampus-abhängigen Lernens beim Menschen und der Bezug zu bekannten molekularen und tierphysiologischen Befunden diskutiert werden.

#### **4.1.1. Die Rolle des dopaminergen Mittelhirns bei episodischer Enkodierung**

##### *4.1.1.1. Co-Aktivierung von Mittelhirn und Hippocampus*

Die Ergebnisse aus fMRI-Experiment 1 zeigen, dass Mittelhirnregionen, die mesolimbische dopaminerge Zellpopulationen enthalten, bei der erfolgreichen Enkodierung neuer Stimuli in das Hippocampus-abhängige explizite Gedächtnis aktiviert werden. In der Vorstudie (siehe Anhang 6.1.1.) konnte gezeigt werden, dass sich eine Aktivierung dieser Hirnregionen auch bei assoziativer Neuheitsdetektion beobachten lässt. In beiden Fällen wurde die Mittelhirn-Aktivierung in Kontrasten beobachtet, in denen auch eine Aktivierung des Hippocampus beobachtet wurde. Das Stimulusmaterial und die Aufgabe der Probanden unterschieden sich stark zwischen der Neuheitsdetektions-Aufgabe aus der Vorstudie (explizite Alt/Neu-Entscheidung bei Gesicht-Werkzeug- oder Gesicht-Positions-Assoziationen) und fMRI-

Experiment 1 (inzidentelle explizite Enkodierung von Wörtern). Eine wichtige Gemeinsamkeit beider Experimente war jedoch die „episodische“ Qualität der Stimuli. Im ersten Experiment der Vorstudie bestand die „Neuheit“ der Stimuli nicht in der Neuheit einzelner Elemente – die einzelnen Gesichter und Werkzeuge waren bekannt – sondern in der neuen Anordnung der zuvor gelernten Stimulus-Konfigurationen (Wan et al., 1999; Düzel et al., 2003a). Eine solche assoziative, episodische Neuheit ist wahrscheinlich stärker Hippocampus-abhängig als die Neuheit einzelner diskreter Stimuli – bei letzterer zeigen auch andere MTL-Strukturen, wie etwa der perirhinale Kortex das typische Muster einer Abnahme der neuronalen Antwort bei wiederholter Präsentation von Stimuli (Brown & Aggleton, 2001; Henson et al., 2003). In fMRI-Experiment 1 waren die Wörter den Probanden zwar bekannt, erschienen aber im Rahmen des fMRI-Experimentes in einem neuen Kontext. Die Wörter mussten zusammen mit diesem Kontext enkodiert werden, um später in einer freien Abrufaufgabe wiedergegeben zu werden. Freier Abruf ist also von einem intakten episodischen Gedächtnis abhängig (Vargha-Khadem et al., 1997). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Mittelhirnaktivierung in erster Linie unter Bedingungen fand, die auch mit einer hippocampalen Verarbeitung neuer Stimuli einhergingen und eher episodische Gedächtnisprozesse widerspiegeln, als Gedächtnisphänomene, die auf Bekanntheit basieren. Letztere können auch allein über parahippocampale Regionen des MTL vermittelt werden (Brown & Aggleton, 2001; Düzel et al., 2001).

Eine mögliche Erklärung für diese Ergebnisse wäre eine exzitatorische Wirkung hippocampaler Aktivität auf dopaminerge Neurone des Mittelhirns während der Verarbeitung neuer Stimuli. Da der Hippocampus nicht über direkte Projektionen in das dopaminerge Mittelhirn verfügt, müsste eine solche Wirkung indirekt sein. Der Hippocampus sendet starke Projektionen in basale Vorderhirnregionen, insbesondere in den Nucleus accumbens. Dessen GABAerge Neurone inhibieren die ebenfalls GABAergen Neurone des ventralen Pallidums, welche wiederum hemmend auf die VTA und mediale SN wirken. Durch eine hippocampale Stimulation des Nucl. accumbens könnte es also zu einer verringerten Aktivität der hemmenden Afferenzen des dopaminergen Mittelhirns und damit zu einer gesteigerten Mittelhirnaktivität kommen (Lisman & Otmakhova, 2001; Lisman & Grace, 2005). Nach Lisman und Grace kann die so erhöhte Freisetzung von Dopamin in der CA1-Region des Hippocampus eine modulierende Wirkung auf hippocampale synaptische Plastizität ausüben, zum Beispiel durch Fazilitierung von LTP an den Schaffer-Kollateral-Synapsen. Nach dem sogenannten *SOCRATIC Model* hippocampaler Plastizität (Lisman & Otmakhova, 2001), kann eine erhöhte dopaminerge Stimulation hippocampaler Neurone synaptische Plastizität bei der Enkodierung neuer Stimuli modulieren, indem LTP an den CA3-CA1-Synapsen verstärkt wird und gleichzeitig die Interferenz durch Information aus den direkten Verbindungen zwischen dem entorhinalen Kortex und CA1 reduziert wird.

Eine alternative Interpretation für die parallele Aktivierung von Mittelhirn und hippocampalen Strukturen während episodischer Gedächtnisprozesse ist, dass beide Regionen gleichzeitig und möglicherweise sogar unabhängig von einander aktiviert werden. Tatsächlich ist die Aktivität dopaminerger Mittelhirnneurone bisher nicht in erster Linie mit Hippocampus-abhängigen Gedächtnisprozessen in Verbindung gebracht worden, sondern mit der Prädiktion und Prädiktionsfehler-Prozessierung bei der Verarbeitung von Verstärkern (Schultz 1997, 1998), und auch beim Menschen lassen sich fMRI-Aktivierungen des Mittelhirns während der Belohnungs-Prädiktion beobachten (O'Doherty et al., 2006). Außerdem ist aus Tierexperimenten bekannt, dass die Antwort des dopaminergen Mittelhirns auf Belohnungsprädiktion [und auf Neuheit] sehr früh, d. h. innerhalb von 200 ms nach Beginn der Stimulus-Präsentation, messbar ist (Schultz et al., 1997). Ein so frühes Zeitfenster passt nicht zu einer indirekten Stimulation des Mittelhirns durch den Hippocampus. Stattdessen wäre eher möglich, dass Mittelhirn und Hippocampus unabhängig von einander aktiviert werden und erst nach ihrer Aktivierung interagieren. Eine inzidentelle Ko-Aktivierung von Mittelhirn und Hippocampus könnte dann zu einer verbesserten Enkodierung von Stimuli einhergehen, wenn saliente, etwa Belohnungs-prädizierende Stimuli aufgrund der verstärkten Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns zu einer verstärkten dopaminergen Stimulation des Hippocampus führen (Wittmann et al., 2005).

Eine mögliche Erklärung für das frühe Auftreten der dopaminergen Antwort wäre beispielsweise, dass neue Stimuli [und auch Belohnungs-assoziierte Reize] aufgrund ihrer perzeptuellen Eigenschaften zu einer direkten Stimulation des dopaminergen Mittelhirns durch Neurone des Colliculus superior führen könnten (Redgrave & Gurney, 2006). Wenn die Hypothese von Redgrave und Gurney zutrifft, könnte das bedeuten, dass das dopaminerge Mittelhirn bereits vor dem Hippocampus auf neue Stimuli reagiert. Eine daraus folgende dopaminerge Stimulation des Hippocampus könnte dann Plastizitätsprozesse faszilitieren, beispielsweise die LTP-Induktion (Li et al., 2003). Dazu passt, dass beim Menschen die Wahrscheinlichkeit der erfolgreichen Enkodierung neuer Stimuli erhöht ist, wenn zuvor Hinweise auf folgende Belohnungen gegeben wurden. Die erfolgreiche Enkodierung korreliert dann bereits mit der Mittelhirnaktivierung *vor* der Präsentation des zu lernenden Stimulus (Adcock et al., 2006).

Auch bei der Unterscheidung alter und neuer Stimuli sind bereits sehr frühe elektrophysiologische Effekte (um 250 ms) beim Menschen beobachtet worden (Düzel et al., 2003b, 2004). In fMRI-Experiment 1 unterschieden sich die einzelnen Stimuli aber nicht in ihrer Neuheit / Bekanntheit, vielmehr wurden die Aktivierungen des Mittelhirns in Abhängigkeit von späterem Erinnern und Vergessen der Wörter beobachtet. Die meisten EEG/MEG-Effekte, die während der Enkodierung später erinnerte und später vergessene

Items unterscheiden, treten sogar erst spät, um 600 – 800 ms auf (Fernández et al., 1998; Schott et al., 2002). Allerdings konnten wir kürzlich in einer MEG-Studie, in der das Paradigma von fMRI-Experiment 1 verwendet wurde, beobachten, dass sich die Theta-Oszillations-Amplitude etwa 200 ms vor der Präsentation des Stimulus bereits für später erinnerte und vergessene Wörter unterscheidet (Guderian et al., in Revision). Da die fMRI-Methode aufgrund der geringen zeitlichen Auflösung nicht geeignet ist, die zeitliche Dynamik von hippocampaler und mesolimbischer Aktivität aufzulösen, und da Oberflächen-Elektrophysiologie die Aktivität tiefer Strukturen [wie Mittelhirn und Nucl. accumbens] nur unzureichend detektiert, ist die genauere Charakterisierung des Zeitverlaufs der Co-Aktivierung von Hippocampus und mesolimbischem System beim Menschen weiter schwierig. Neue Erkenntnisse zur Beantwortung dieser Fragestellung könnten intrakranielle Ableitungen aus dem Nucl. accumbens bei Patienten der stereotaktischen Neurochirurgie bringen (Sturm et al., 2003).

#### 4.1.1.2. Auswirkungen des DAT1-VNTR auf die Mittelhirnaktivierung

Die Beobachtung, dass die Mittelhirnaktivierung durch eine Variation im Dopamin-Transporter-Gen beeinflusst wurde, stützt die Hypothese, dass die Aktivierung dieser Hirnregion im fMRI ein Korrelat der Aktivität dopaminergener Neurone ist. Da der untersuchte VNTR-Polymorphismus außerhalb der codierenden Region (im 3'-Bereich) des DAT1-Gens liegt, ist davon auszugehen, dass dieser Effekt über regulatorische Mechanismen, welche die Genexpression beeinflussen, vermittelt wird.

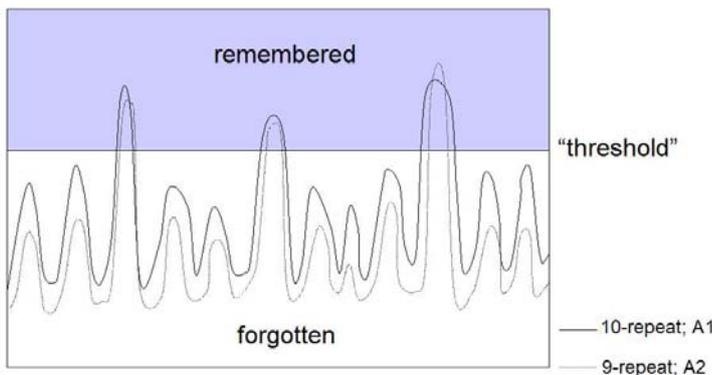
Der DAT1-VNTR ist mit Unterschieden in der Dopamin-Transporter-Expression in Verbindung gebracht worden. Dabei zeigen *in vitro*-Untersuchungen (Fuke et al., 2001; Mill et al., 2002; van Ness, 2005) und Studien an humanem *post mortem* Hirnmaterial (Brookes et al., 2007) übereinstimmend, dass das 9-Repeat-Allel mit reduzierter DAT1-Expression assoziiert ist. Bisherige *in vivo*-Untersuchungen beim Menschen zeigen kein so eindeutiges Ergebnis. Zwar konnten zwei Gruppen (Heinz et al., 2000; Cheon et al., 2001) zeigen, dass 10-Repeat-Homozygote im Vergleich zu 9-Repeat-Trägern eine höhere striatale Dopamin-Transporter-Bindungskapazität haben, allerdings beobachteten Jacobsen und Kollegen (2000) ein umgekehrtes Muster. Zwei weitere Studien fanden überhaupt keinen Unterschied in der DAT1-Expression in Abhängigkeit vom DAT1-VNTR (Martinez et al., 2001; Krause et al., 2006). In all diesen Studien wurde die DAT1-Verfügbarkeit durch FP-CIT-SPECT bestimmt. Die Auflösung dieser Technik ist sehr gering, und die Ergebnisse sind nur bedingt quantifizierbar. Außerdem wird die DAT1-Bindungskapazität durch eine Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst, vor allem durch die Gesamtverfügbarkeit dopaminergener Terminals [so zeigen etwa Parkinson-Patienten eine massiv reduzierte DAT1-Bindungskapazität; Gerlach, Reichmann & Riederer, 2003]. Aufgrund der übereinstimmenden Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen kann jedoch

davon ausgegangen werden, dass zumindest die lokale, perisynaptische DAT1-Expression im Striatum bei 9-Repeat-Trägern reduziert ist.

In der vorliegenden Arbeit war das 9-Repeat-Allel mit einem relativen Anstieg der Mittelhirn-Antwort bei episodischer Enkodierung assoziiert. Dieses Ergebnis erscheint etwas kontraintuitiv, wenn man davon ausgeht, dass 9-Repeat-Träger eine geringere perisynaptische Dopamin-Transporter-Dichte haben, womit zu erwarten wäre, dass die extrazelluläre Dopamin-Konzentration bei ihnen höher ist. Allerdings zeigen Untersuchungen an Dopamin-Transporter-defizienten Mäusen, dass der Mangel an Dopamin-Transportern zu ausgeprägten Veränderungen im dopaminergen System führt. Bei diesen Mäusen ist die Tyrosinhydroxylase-Expression vermindert, während autoinhibitorische präsynaptische D2-Rezeptoren verstärkt exprimiert werden und die stimulierte Dopamin-Freisetzung reduziert ist (Jones et al., 1998). Möglicherweise könnte beim Menschen eine genetisch bedingte reduzierte DAT1-Expression zu vergleichbaren, wenn auch weniger drastischen, adaptiven Veränderungen führen.

Die relativ stärkere Mittelhirnaktivierung bei DAT1-9-Repeat-Trägern im Vergleich zu 10-Repeat-Homozygoten war spezifisch für die erfolgreiche episodische Enkodierung von Stimuli. Diese Enkodierung stellt einen schnellen, phasischen Prozess dar. Wenn man davon ausgeht, dass bei 9-Repeat-Trägern, analog zu den bei Dopamin-Transporter-defizienten Mäusen, die Aktivitäts-abhängige Dopamin-Ausschüttung – oder die Fluktuationsamplitude der tonischen Dopamin-Sekretion – im Mittel niedriger ist als bei 10-Repeat-Homozygoten, ist vorstellbar, dass eine erfolgreiche Hippocampus-abhängige Enkodierung neuer Stimuli mit einem – relativ gesehen – stärkeren Anstieg der dopaminergen Mittelhirnaktivität einhergeht. Die Stimulation der dopaminergen Mittelhirnneurone könnte durch eine über den Nucl. accumbens vermittelte Disinhibition zustande kommen (Lisman & Grace, 2005). Dazu passt die Beobachtung, dass 9-Repeat-Träger auch eine verstärkte Aktivierung ausgedehnter basaler Vorderhirnregionen einschließlich des Nucl. accumbens zeigten. Eine solche indirekte Stimulation des Mittelhirns könnte dann intermittierend zu einer phasischen Dopamin-Ausschüttung führen, die vergleichbar mit der von 10-Repeat-Homozygoten ist (Abb. 4.1). Für einen solchen Kompensationsmechanismus spricht auch die bei 9-Repeat-Trägern verstärkte funktionelle Kopplung des Hippocampus mit basalen Vorderhirnregionen und dem dopaminergen Mittelhirn selbst. In einer früheren Studie war eine positive Korrelation zwischen DAT1-Verfügbarkeit und Gedächtnisleistung gefunden worden (Mozley et al., 2001). In dieser Arbeit fand sich dagegen kein Unterschied in der Gedächtnisleistung zwischen DAT1 10-Homozygoten und 9-Repeat-Trägern. Möglicherweise wurden in der hier untersuchten jungen, gesunden Population die bei 9-Repeat-Trägern reduzierte DAT1-Verfügbarkeit auf Ebene des Mittelhirns und seiner indirekt stimulierenden Afferenzen aus dem basalen Vorderhirn kompensiert. Eine solche Interpretation wäre kompatibel mit dem

Fehlen eines Aktivierungsunterschiedes im Hippocampus zwischen den beiden Gruppen. Eine alternative Erklärung wäre, dass in der von Mozley und Kollegen untersuchten Population, die eine große Altersspanne umfasste, die – durch SPECT gemessene – DAT1-Verfügbarkeit in erster Linie die Gesamtzahl dopaminerger Afferezen und weniger eine genetische Variabilität der DAT1-Expression widerspiegelte (siehe oben).



**Abb. 4.1: Modell für die Auswirkung der DAT1-Expression auf Mittelhirn-Aktivität bei episodischer Enkodierung.** Unter der Annahme, dass 9-Repeat-Träger mit geringerer DAT1-Expression im Mittel eine niedrigere Mittelhirnaktivität zeigen (gestrichelte Linie), würden sie im Vergleich zu 10-Repeat-Homozygoten (durchgezogene Linie) einen relativ stärkeren Anstieg der Mittelhirnaktivität benötigen, um die für die erfolgreiche Enkodierung notwendige Schwelle („threshold“) zu erreichen.

#### 4.1.1.3. Dopamin-Transporter-Expression im humanen Hippocampus

Die immunhistochemische Untersuchung ergab, dass der Dopamin-Transporter im Hippocampus selbst exprimiert wird, wenn auch – erwartungsgemäß – mit deutlich geringerer Dichte als im Striatum. Überraschend war dabei die geringe, nicht sicher detektierbare, DAT1-Expression in der CA1-Region, insbesondere da die Bedeutung von Dopamin bisher vor allem für die LTP an der CA3-CA1-Synapse beschrieben worden war (Frey et al., 1990; Huang & Kandel, 1995). Grundsätzlich kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die immunhistochemische Detektion von DAT1-Protein in der CA1-Region aus technischen Gründen nicht sicher möglich war, da die CA1-Region besonders vulnerabel für Sauerstoffmangel ist (Rosenblum, 1997) und bei einem post mortem-Intervall von 21 bis 24 Stunden bereits verstärkt von autolytischen Veränderungen betroffen gewesen sein könnte. Denkbar ist auch, dass das Dopamin-Signal in der CA1-Region, ähnlich wie im PFC, überwiegend DAT1-unabhängig terminiert wird, was wahrscheinlich zu einer verlängerten Stimulation der D1/D5-Rezeptoren an den CA1-Pyramidenzellen führen würde. TH-positive Fasern, die aufgrund fehlender Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase-Expression als dopaminerg klassifiziert wurden, sind zuvor in der CA1-Region beschrieben worden (Baulac et al., 1986). Zur weiteren Klärung der Terminierung des Dopamin-Signals in CA1 könnten immunhistochemische Untersuchungen mit Co-Färbungen für DAT1 und TH und Mikrodialyse-Untersuchungen COMT-abhängiger Metaboliten im Hippocampus von Affen oder von hippocampal implantierten Patienten in der prächirurgischen Epilepsie-Diagnostik (Fried et al., 2001) beitragen.

### **4.1.3. Auswirkungen des COMT-Val108/158Met-Polymorphismus**

#### *4.1.3.1. COMT und präfrontale Verarbeitungseffizienz*

Der quantitative Beitrag von COMT zur Dopamin-Inaktivierung ist umstritten. Einige Studien legen nahe, dass ihre Bedeutung im Vergleich zur DAT1-abhängigen Dopamin-Wiederaufnahme und zur MAO-abhängigen Oxidation gering ist (Budygin et al., 1999; Huotari et al., 2002, 2004). Allerdings wurde in diesen Studien vor allem der Dopamin-Metabolismus im Striatum untersucht, einer Region, in der DAT1 in hoher Menge exprimiert wird. Dagegen scheint COMT im PFC, wo die DAT1-Expression wesentlich geringer ist, eine größere Bedeutung bei der Dopamin-Inaktivierung zu spielen (Karoum et al., 1994; Matsumoto et al., 2003; Tunbridge et al., 2004). Für eine prominente Rolle von COMT bei der präfrontalen Dopamin-Inaktivierung spricht auch eine Studie, in der gezeigt wurde, dass der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus, der bei Met-Allel-Trägern zu einer reduzierten Enzym-Aktivität führt (Lotta et al., 1995), die TH-Konzentration im Mittelhirn und damit die Dopamin-Synthese beeinflusst (Akil et al., 2003). Meyer-Lindenberg und Kollegen (2005) konnten außerdem zeigen, dass funktionelle Interaktionen zwischen dem dopaminergen Mittelhirn und dem präfrontalen Kortex *in vivo* durch den COMT-Polymorphismus beeinflusst werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus die Aktivität des präfrontalen Kortex bei episodischer Enkodierung moduliert, aber keinen Einfluss auf die Aktivität des Mittelhirns hat, ist mit bisherigen Befunden kompatibel, die besagen, dass COMT insbesondere an der präfrontalen Dopamin-Inaktivierung beteiligt ist. Der fehlende Einfluss des COMT-Polymorphismus auf die Enkodierungs-bezogene Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns könnte dabei im scheinbaren Widerspruch zu den Befunden von Meyer-Lindenberg und Kollegen (2005) stehen, die eine Beziehung zwischen dem COMT-Polymorphismus und Dopamin-Synthese im Mittelhirn (gemessen durch [<sup>18</sup>F]-Dopa-PET) beobachteten. In fMRI-Experiment 1 dieser Arbeit wurde die Mittelhirnaktivität in einem Ereignis-bezogenen Paradigma gemessen, also Veränderungen der Aktivität im Sekundenbereich. Ein fehlender Einfluss von COMT Val108/158Met auf solche schnellen, phasischen Variationen der Mittelhirnaktivität spricht nicht gegen einen Einfluss des Polymorphismus auf langfristige, tonische Prozesse im Mittelhirn wie etwa die Dopamin-Synthese.

Eine im Vergleich zu Met-Homozygoten höhere präfrontale Aktivierung bei COMT108/158 Val-Homozygoten ist bereits in früheren Studien bei Verwendung anderer Paradigmen, insbesondere beim N-Back-Arbeitsgedächtnis-Paradigma beobachtet worden (Egan et al., 2001; Meyer-Lindenberg et al., 2006). In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Aktivierung des rechten präfrontalen Kortex bei Val/Val-Trägern sowohl in Abhängigkeit von späterem Erinnern und Vergessen (Abb. 3.5), als auch bei tiefer im Vergleich zu oberflächlicher

Verarbeitung der Stimuli beobachtet (Abb. 3.6). Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass es sich bei der verstärkten PFC-Aktivierung bei Val-Homozygoten um ein Phänomen handelt, das bei einer Reihe unterschiedlicher kognitiver Aufgaben beobachtet werden kann. Ob dieses Phänomen eher unspezifisch ist oder ob es möglicherweise kognitive Aufgaben genau dann betrifft, wenn sie eine Arbeitsgedächtniskomponente haben, lässt sich anhand der vorliegenden Daten allein nicht eindeutig klären. In einer fMRI-Studie zur Auswirkung von COMT Val108/158Met auf exekutive Aufmerksamkeit fand sich ein vergleichbares Muster einer erhöhten Aktivierung des dorsalen anterioren Gyrus cinguli bei Val-Homozygoten (Blasi et al., 2005), was darauf hindeuten könnte, dass die Auswirkungen des Polymorphismus bei unterschiedlichen kognitiven Aufgaben auch regional spezifisch auftreten können, wenn COMT in den betreffenden Hirnregionen für die Dopamin-Inaktivierung von Bedeutung ist. All diesen Studien, wie auch der vorliegenden Arbeit, ist gemein dass, Val-Homozygote, die aufgrund der erhöhten COMT-Aktivität eine niedrigere präfrontale Dopamin-Konzentration aufweisen, im Vergleich zu Met-Homozygoten eine verstärkte kortikale Aktivierung zeigen, ohne, dass sich ein Unterschied auf Verhaltensebene findet. Dieses Phänomen wurde als Korrelat „reduzierter Verarbeitungseffizienz“ (Egan et al., 2001; Weinberger et al., 2001)) angesehen, da eine erhöhte Aktivität notwendig ist, um eine vergleichbare Performance zu erzielen. Anders ausgedrückt könnte man auch von einem kompensatorischen Mechanismus für die niedrigere präfrontale Dopamin-Verfügbarkeit sprechen. Für einen solchen kompensatorischen Mechanismus spricht auch, dass man eine vergleichbare präfrontale Überaktivierung bei Parkinson-Patienten beobachten kann, die Arbeitsgedächtnis-Aufgaben durchführen, und dass die präfrontale Aktivierung bei gleichbleibender Performance abnimmt, nachdem die Patienten L-Dopa erhalten haben (Cools et al., 2002; Mattay et al., 2002).

Während die Gesamtaktivierung im rechten PFC während der episodischen Enkodierung bei Val-Homozygoten stärker war, zeigten Met-Homozygote eine signifikant stärkere funktionelle Konnektivität zwischen dem PFC und dem Hippocampus bei erfolgreicher Enkodierung. In einer weiteren Studie, in der die fronto-hippocampale Konnektivität bei episodischen Gedächtnisprozessen untersucht wurde, fand sich ein umgekehrtes Bild – hier zeigten Val-Homozygote eine höhere funktionelle Konnektivität zwischen dem Hippocampus und dem ventrolateralen PFC (Bertolino et al., 2006a). Allerdings untersuchten Bertolino und Kollegen die fronto-hippocampale Konnektivität während der gesamten Dauer der Messung durch eine Zeitreihen-Korrelation, während in der vorliegenden Studie die für die erfolgreiche Enkodierung spezifischen Veränderungen der Konnektivität mit Hilfe der PPI-Analyse charakterisiert wurden. Möglicherweise könnten Met-Homozygote zwar eine geringere mittlere Konnektivität zwischen Hippocampus und PFC zeigen, aber eine höhere Stimulus-abhängige Variabilität. Diese könnte das Resultat einer dopaminerg vermittelten Erhöhung

des präfrontalen Signal-Rausch-Verhältnisses bei Met-Homozygoten sein (Winterer et al., 2006). Da Theta-Oszillationen eine entscheidende Rolle bei der Kommunikation des medialen Schläfenlappens mit entfernten Hirnarealen spielen (Guderian & Düzel, 2005), könnte es sinnvoll sein, in künftigen Studien die Auswirkung des COMT-Polymorphismus auf medio-temporale Theta-Aktivität zu untersuchen, um die Bedeutung präfrontaler dopaminergener Neuromodulation für die fronto-hippocampale Interaktion genauer zu charakterisieren.

Anders als in einer früheren Studie mit einer größeren Probandenpopulation (de Frias et al., 2004) hatte der COMT-Val108/158Met-Polymorphismus in dieser Arbeit keine Auswirkung auf die Gedächtnisleistung, was möglicherweise auf die geringere Stichprobengröße zurückzuführen sein könnte. Außerdem wurden hier ausschließlich junge, gesunde Probanden untersucht, während die von de Frias und Kollegen untersuchte Population auch ältere Menschen beinhaltete. Möglicherweise können junge Menschen das relative dopaminerge Defizit durch die verstärkte Rekrutierung präfrontaler Neuronenpopulationen vollständig kompensieren, während es sich im Alter auch auf Verhaltensebene negativ bemerkbar macht.

#### *4.1.3.2. Aktivierungsunterschiede in frühen visuellen Arealen*

Im Vergleich zu später vergessenen Stimuli waren später erinnerte Stimuli auch mit einer erhöhten Aktivität früher visueller Areale, einschließlich Teilen des primären visuellen Kortex, assoziiert (Abb. 3.2). Eine solche Aktivierung visueller Hirnregionen bei episodischer Enkodierung wurde bereits in mehreren Arbeiten berichtet (Tulving et al., 1999; Addis et al., 2004). Dagegen war die Beobachtung, dass diese Aktivierungen durch den COMT-Polymorphismus beeinflusst werden, ein unerwartetes Ergebnis. Val-Homozygote zeigen in diesen Regionen – ähnlich wie im PFC – eine relativ erhöhte Aktivität (Abb. 3.5). Auffällig war, dass sich dieser Unterschied zwischen den Genotyp-Gruppen in erster Linie für die oberflächliche Lernbedingung fand. Bei Anwendung oberflächlicher Lernstrategien haben perzeptuelle Besonderheiten von Stimuli einen stärkeren Einfluss auf deren erfolgreiche episodische Enkodierung (Karis et al., 1984).

Lokale Variabilität der dopaminergen Transmission scheint als Erklärung für die beobachteten visuokortikalen Aktivierungsunterschiede unwahrscheinlich, da der primäre visuelle Kortex kaum dopaminerge Afferenzen aus dem Mittelhirn erhält (Berger et al., 1991). Denkbar wäre dagegen eine indirekte Modulation der frühen visuellen Areale durch präfrontale Kontrollprozesse (Barcelo et al., 2000; Chudasama & Robbins, 2004).

Eine alternative Erklärung wäre eine durch den COMT-Polymorphismus bedingte Variabilität der noradrenergen Neuromodulation. Noradrenalin wird wie Dopamin durch COMT metabolisiert. Frühe visuelle Areale verfügen über starke noradrenerge Afferenzen (Morrison et al., 1982), und es konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin das Signal-Rausch-

Verhältnis im visuellen Kortex erhöht (Siciliano et al., 1999). Damit könnte die erhöhte visuokortikale Aktivität bei Val-Homozygoten das Korrelat eines Kompensationsmechanismus für einen erhöhten Noradrenalin-Abbau sein, analog zur verstärkten präfrontalen Aktivierung als Kompensation des relativen Dopamin-Defizits.

Eine weitere – wenn auch weniger wahrscheinliche – Erklärung für den Aktivierungsunterschied in frühen visuellen Arealen könnten Unterschiede in der dopaminergen Neurotransmission in der Retina und im Nucl. reticularis thalami sein (Mrzljak et al., 1996; Nguyen-Legros et al., 1999).

#### *4.1.3.3. Intrazelluläre Membranorientierung der COMT*

Die Ergebnisse der fMRI-Untersuchungen mit unterschiedlichen Auswirkungen von genetischen Variationen in DAT1 und COMT passen grundsätzlich gut zu den bisher bekannten Ergebnissen, die auf eine regional spezifische Bedeutung dieser Proteine bei der Dopamin-Inaktivierung hindeuten. Der COMT-Polymorphismus war in erster Linie mit Aktivierungsunterschieden in Hirnregionen assoziiert, in denen der Dopamin-Transporter eine untergeordnete Rolle spielt. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Expressionsstudien von Fusionskonstrukten der membranständigen COMT in kortikalen Neuronen zeigen, dass neuronale MB-COMT intrazellulär orientiert ist (Abb. 3.22). Damit ist eine durch extrazellulär orientierte MB-COMT vermittelte Metabolisierung als Mechanismus der DAT1-unabhängigen Dopamin-Inaktivierung sehr unwahrscheinlich. Grundsätzlich vorstellbar ist allerdings eine extrazelluläre Orientierung bisher auf Proteinebene nicht charakterisierter COMT-Isoformen. Neue Splice-Varianten der COMT-mRNA wurden erst kürzlich beschrieben (Tunbridge et al., 2007).

Eine alternative Erklärung wäre ein DAT1-unabhängiger Wiederaufnahmemechanismus für Dopamin. Da COMT in hoher Konzentration in der postsynaptischen Region dendritischer Spines exprimiert wird (Karhunen et al., 1995), könnte Dopamin über einen – bisher nicht sicher identifizierten – Transportmechanismus von postsynaptischen Neuronen aufgenommen werden, um COMT-abhängig metabolisiert zu werden. Dopamin kann im PFC grundsätzlich über den Noradrenalin-Transporter (NET) transportiert werden, insbesondere, wenn DAT1 gehemmt wird (Tanda et al., 1997; Mezei et al., 2002). Allerdings ist die quantitative Bedeutung des NET für die Dopamin-Wiederaufnahme umstritten (Wayment et al., 2001). Da der NET, ähnlich wie DAT1 in erster Linie präsynaptisch exprimiert wird (Bonisch & Bruss, 2006), ist es eher unwahrscheinlich, dass NET-abhängige Aufnahme den hohen Anteil COMT-abhängiger Dopamin-Metaboliten im PFC erklärt. Dagegen wäre gut vorstellbar, dass der kürzlich beschriebene Plasmamembran-Monoamin-Transporter (PMAT), ein niedrig-affiner Monoamin-Transporter mit hoher Wiederaufnahme-Kapazität, eine quantitativ bedeutsame Rolle bei der Dopamin-Inaktivierung in Hirnregionen mit niedriger DAT1-Expression spielen könnte. PMAT wird bei der Ratte im Kortex des

Vorderhirns und auch im Hippocampus, stark exprimiert, also in Regionen die nur über eine geringe DAT1-Expression verfügen (Dahlin et al., 2007). Darüber hinaus ist auch ein extraneuronaler Monoamin-Transporter (EMT) bekannt, der grundsätzlich in der Lage wäre, Dopamin in Gliazellen aufzunehmen, wo es COMT-abhängig metabolisiert werden könnte. Allerdings konnte EMT-Expression bisher nur in der Area postrema des Hirnstamms nachgewiesen werden (Haag et al., 2004). Diese Beobachtung spricht eher gegen eine bedeutende Rolle des EMT bei der kortikalen Dopamin-Inaktivierung.

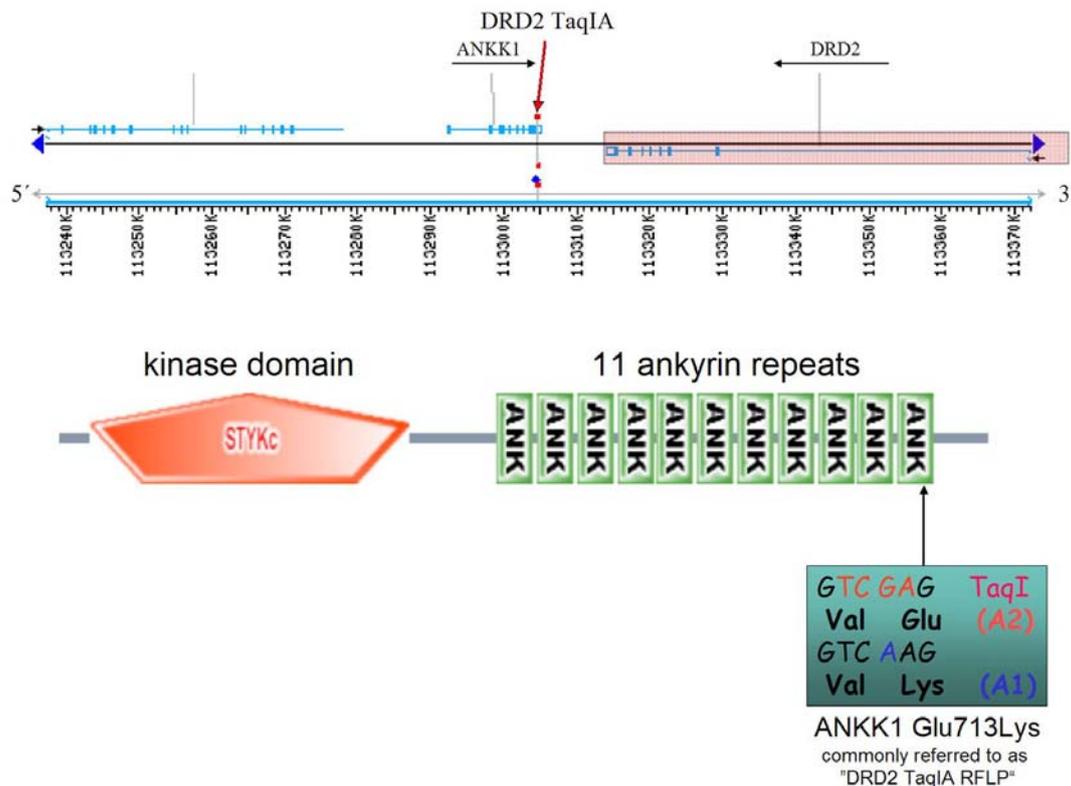
#### **4.1.4. Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus**

Der TaqIA-Polymorphismus des Dopamin-D2-Rezeptor-Gens war mit einem komplexen Muster an Aktivierungsunterschieden bei erfolgreicher episodischer Enkodierung assoziiert, welches sowohl das dopaminerge Mittelhirn als auch den rechten PFC einschloss. In beiden Regionen zeigten Homozygote für das A2-Allel eine relativ stärkere Aktivierung. Eine Erklärung für die erhöhte Mittelhirnaktivität bei A2-Trägern könnte eine niedrigere präsynaptische Dopamin-Transporterdichte sein [wie dies bereits für abstinenten Alkoholiker berichtet wurde; Laine et al., 2001] womit ein ähnlicher Mechanismus zum Tragen kommen könnte wie beim DAT1-VNTR (siehe 4.1.1.2.). Der einer möglichen Erhöhung der DAT1-Expression bei A1-Trägern zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist jedoch unklar. Vorstellbar ist auch, dass die tonische dopaminerge Aktivität bei A2-Homozygoten durch höhere Expression autoinhibitorischer präsynaptischer D2-Rezeptoren direkt herunterreguliert wird (Laakso et al., 2005). Auch dies könnte dazu führen, dass es bei erfolgreicher episodischer Enkodierung zu einem stärkeren Anstieg der Mittelhirnaktivität kommt (Abb. 4.1).

Ähnlich wie der COMT Val108/158Met-Polymorphismus war DRD2 TaqIA mit einem Aktivierungsunterschied im rechten PFC assoziiert, wobei A2-Träger eine höhere Aktivierung in dieser Region zeigten. Da das A2-Allel auch mit einem erhöhten Schizophrenie-Risiko assoziiert ist (Dubertret et al., 2004), könnte man einen den Auswirkungen des COMT-Polymorphismus vergleichbaren Mechanismus annehmen, der zu einer erniedrigten präfrontalen Dopamin-Verfügbarkeit bei A2-Homozygoten führt. Ein möglicher Mechanismus, der zu einem niedrigen präfrontalen Dopamin-Spiegel führen könnte, wäre eine erhöhte Expression präsynaptischer autoinhibitorischer D2-Rezeptoren, die zu einer geringeren präfrontalen Dopamin-Freisetzung führen könnten. Alternativ könnte auch eine erhöhte postsynaptische D2-Rezeptordichte im Striatum durch Dysregulation fronto-striataler Regelkreise zu einer erniedrigten präfrontalen Verarbeitungseffizienz führen (Meyer-Lindenberg et al., 2002). Tatsächlich ist aus Arbeiten mit transgenen Mäusen bekannt, dass schon transiente Überexpression striataler D2-Rezeptoren zu andauernder präfrontaler Dysfunktion führt (Kellendonk et al., 2006).

Bei älteren Probanden mit milden kognitiven Einbußen (*mild cognitive impairment*, MCI) war Homozygotie für das A2-Allel mit schwächerer Gedächtnisleistung assoziiert worden (Bartres-Faz et al., 2002). Dagegen fand sich in der hier untersuchten Kohorte junger Probanden kein Performance-Unterschied zwischen A1-Trägern und A2-Homozygoten. Möglicherweise wird – ähnlich wie bei COMT Val108/158Met – die nachteilige Auswirkung auf Gedächtnisleistungen bei jungen gesunden Probanden durch verstärkte PFC kompensiert und kann daher erst dann auf Verhaltensebene nachgewiesen werden, wenn solche Kompensationsmechanismen nicht mehr ausreichen.

Unklar ist nach wie vor, welche molekularen Mechanismen der unterschiedlichen D2-Rezeptordichte von A2-Homozygoten und A1-Trägern zugrunde liegen. Der TaqIA-Polymorphismus befindet sich im 3'-untranslatierten Bereich des DRD2-Gens in einer potentiell regulatorischen Region. Durch genomische Analysen konnte ein zuvor unbekanntes Gen in dieser Region identifiziert werden, das für ANKK1, eine kombinierte Ser/Thr/Tyr-Kinase mit 11 Ankyrin-Repeats im C-terminalen Bereich kodiert (Dubertret et al., 2004; Neville et al., 2004). Der DRD2-TaqIA-RFLP gehört zum 11. Exon des ANKK1-Gens und führt zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin (ANKK1 Glu713Lys) im 11. Ankyrin-Repeat (Abb. 4.2). Die biologische Funktion von ANKK1 ist unbekannt. Grundsätzlich ist eine funktionelle Interaktion zwischen ANKK1 und G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vorstellbar, da bereits für die molekular eng verwandte Kinase PKK eine membrannähe Lokalisierung nachgewiesen werden konnte (Chen et al., 2001). Allerdings ist bis heute unklar, ob ANKK1 überhaupt im Gehirn exprimiert wird. Während Dubertret und Kollegen (2004) eine Klonierung von ANKK1 aus humaner Hirn-RNA beschrieben, konnten Neville und Kollegen (2004) ANKK1-mRNA nur im Rückenmark und in der Plazenta nachweisen. Eine Charakterisierung von ANKK1 auf Proteinebene ist bisher nicht publiziert worden.



**Abb. 4.2: Genomische Lokalisation und vorausgesagte Proteinstruktur der Ankyrin-Repeat-haltigen Kinase ANKK1.** Oben: Das [in (+)-Richtung abgelesene] ANKK1-Gen befindet sich 5' von dem [in (-)-Richtung abgelesenen] DRD2-Gen auf Chromosom 11q23. Der sogenannte DRD2-TaqIA-Polymorphismus befindet sich auf dem 8. Exon des ANKK1-Gens, das im 3'-untranslatierten Bereich des DRD2-Gens liegt. Unten: Vorausgesagte Proteinstruktur von ANKK1 [generiert mit SMART: <http://smart.embl-heidelberg.de>]. Der DRD2-TaqIA-Polymorphismus führt zu einem Aminosäureaustausch (Glu713Lys) im 11. Ankyrin-Repeat.

Eine alternative Erklärung für die beschriebenen Auswirkungen des DRD2-TaqIA-Polymorphismus ist die Möglichkeit eines Kopplungsungleichgewichts mit funktionellen Polymorphismen, die sich direkt auf die D2-Rezeptor-Expression auswirken. Von besonderem Interesse ist hier der DRD2-C957T-Polymorphismus, der zu einer geringeren Stabilität der mRNA und damit zu reduzierter Proteinsynthese führt (Duan et al., 2003). Allerdings zeigte der TaqIA-Polymorphismus eine stärkere Assoziation mit Dopa-Decarboxylase-Aktivität (Laakso et al., 2005), und in einer kürzlich durchgeführten Assoziationsstudie in unterschiedlichen Populationen war das ANKK1-Gen stärker mit Nikotinabusus assoziiert als das DRD2-Gen selbst (Gelernter et al., 2006). Insbesondere angesichts der bisher widersprüchlichen Befunde zur Expression von ANKK1-mRNA im menschlichen Gehirn (Dubertret et al., 2004; Neville et al., 2004) kann langfristig nur eine molekulare Charakterisierung von ANKK1 mit Expressionsstudien auf Proteinebene helfen, eine mögliche Bedeutung dieser Kinase für die Regulation der dopaminergen Transmission zu klären.

#### **4.1.5. Genetisch bedingte Aktivierungsunterschiede bei gleicher Performance**

Ähnlich wie in mehreren früheren fMRI-Studien zur Auswirkung genetischer Polymorphismen auf kognitive und emotionale Prozesse (Bookheimer et al., 2000; Egan et al., 2001; Hariri et al., 2002) waren die Zwischengruppen-Unterschiede in der Hirnaktivität nicht mit Unterschieden auf Verhaltensebene assoziiert. Für zwei der hier untersuchten Polymorphismen (COMT Val108/158Met, DRD2 TaqIA) waren zuvor Unterschiede in der Gedächtnisleistung bei älteren Probanden gefunden worden (Bartres-Faz et al., 2002; de Frias et al., 2004), und für den Dopamin-Transporter konnte ein Zusammenhang zwischen *in vivo*-Bindungskapazität und Gedächtnis-Performance beobachtet werden (Mozley et al., 2001).

Möglicherweise können die Effekte genetischer Variationen, die sich nachteilig auf bestimmte kognitive Funktionen auswirken können, in vielen Fällen bei jungen gesunden Menschen kompensiert werden, wobei sich solche Kompensationsmechanismen in manchen Fällen durch veränderte Aktivierungsmuster in der funktionellen Bildgebung nachweisen lassen. Für diese Hypothese spricht auch eine bekannte Studie zur Auswirkung des mit erhöhtem Risiko für M. Alzheimer assoziierten  $\epsilon 4$ -Allels des Apolipoproteins E (Bookheimer et al., 2000). Klinisch unauffällige ältere Träger des  $\epsilon 4$ -Allels zeigten eine erhöhte hippocampale Aktivierung im fMRI. Obwohl sich  $\epsilon 4$ -Träger während der fMRI-Studie in ihrer Gedächtnisleistung nicht von Kontrollprobanden unterschieden, korrelierte die erhöhte Hippocampus-Aktivierung mit der Abnahme der Gedächtnisleistung nach zwei Jahren.

Eine systematische Untersuchung der Korrelation zwischen genetischen Unterschieden in fMRI-Aktivierungsmustern und kognitiven Einbußen im Alter und bei neuropsychiatrischen Erkrankungen könnte mittelfristig helfen, die Pathogenese komplexer Störungen mit polygener Ätiologie besser zu verstehen und neue Verfahren zur frühen Diagnostik zu entwickeln.

##### **4.1.5.1. Statistische Limitierungen des Genetic Imaging**

Bei der Untersuchung der Auswirkung genetischer Polymorphismen auf Hirnaktivierungsmuster in der funktionellen Bildgebung sind zwei entscheidende Limitierungen zu beachten: Zum einen muss das Risiko falsch positiver Befunde durch zufällige Assoziationen als hoch eingestuft werden. Die Hauptursache hierfür liegt in der Tatsache, dass statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich zweier Gruppen auf verschiedene Ursachen zurückgeführt werden können – der als unabhängige Variable dienende Polymorphismus ist nur eine davon. Insbesondere kann das Vorhandensein weniger statistischer Ausreißer in einer Gruppe zu falsch positiven Befunden führen. Grundsätzlich gibt es zwei Möglichkeiten, dieses Risiko zu minimieren. Erstens nimmt das Risiko der Relevanz von Ausreißern für die Gesamtstatistik mit zunehmender Gruppengröße ab; es müssen daher ausreichend große Gruppen mit einander verglichen werden. Ein noch

konservativerer Ansatz ist die Untersuchung unabhängiger Kohorten zur Replikation eines Befundes (Egan et al., 2001, 2003; Hariri et al., 2002). Auf dieser Grundidee basiert auch der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Ansatz der Konfidenzintervall-Schätzung durch die Bootstrap-Methode (siehe 2.1.1.4.).

Die zweite Limitierung besteht darin, dass auch statistisch valide Assoziationen zwischen einem Genotyp und einem (Endo-)Phänotyp keineswegs kausale Beziehungen widerspiegeln müssen. Dies ist vor allem dann von Bedeutung, wenn der untersuchte Polymorphismus Teil eines Haplotyps ist, sich also mit anderen Polymorphismen im LD befindet. Zwar lässt sich durch genomische Ansätze wie *Haplotype Mapping* der Grad der Assoziation einzelner Polymorphismen innerhalb eines Haplotyps mit einem Phänotyp quantifizieren (Gelernter et al., 2006), doch kann nie ausgeschlossen werden, dass auch der Polymorphismus, der innerhalb eines Haplotyps die stärkste Assoziation mit dem Zielphänotyp aufweist, lediglich das stärkste Kopplungsungleichgewicht mit dem tatsächlich kausal wirksamen Polymorphismus hat. Für dieses Problem gibt es – im Gegensatz zur ersten Limitierung – keinen allgemein gültigen Lösungsansatz. Eine Möglichkeit ist die systematische Untersuchung der molekularen Auswirkungen von Polymorphismen, die in einigen Fällen den beobachteten Phänotyp erklären können (Egan et al., 2003), was jedoch bisher nur in Einzelfällen weitgehend widerspruchsfrei gelungen ist.

#### **4.2. Auswirkung von Alter und M. Parkinson auf Belohnungs-Assoziationslernen**

Das Ziel von Experiment 2 war, zu untersuchen, wie sich Veränderungen des dopaminergen Systems im Alter und im Frühstadium von M. Parkinson auf Stimulus-Belohnungs-Assoziationslernen im mesolimbischen System auswirken. Bei jungen Erwachsenen führte die Präsentation von Bildern, die einen monetären Gewinn (0.50 €) in 75% der Fälle ankündigten, aber in 25% der Fälle mit einem aversiven Resultat assoziiert waren (Verlust von 0.20 €), also einen Gesamt-Erwartungswert von 0.325 € hatten, zu einer reliablen Aktivierung im ventralen Striatum und im Mittelhirn. Wie aufgrund früherer Studien erwartet werden konnte, folgte auf diese Belohnungs-Prädiktionsantwort keine weitere mesolimbische Antwort auf ein positives Belohnungs-Feedback. Dagegen zeigten sowohl gesunde ältere Probanden als auch Patienten mit M. Parkinson ein umgekehrtes Muster: Während keine ventral-striatale fMRI-Antwort auf Belohnungs-prädizierende Bilder beobachtet werden konnte, zeigte der NAcc eine reliable Aktivierung bei positivem Belohnungs-Feedback, was als Korrelat positiver mesolimbischer Prädiktionsfehler gedeutet werden kann. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass sowohl gesunde ältere Probanden als auch Parkinson-Patienten mesolimbische Prädiktionsfehler generieren können, aber Defizite bei der Nutzung dieser Prädiktionsfehler für die erfolgreiche Prädiktion künftiger Belohnungen aufweisen.

#### **4.2.1. Störungen der Belohnungs-Prädiktion im Alter und bei M. Parkinson**

Da die gestörte Verschiebung der mesolimbischen Belohnungsantwort vom Zeitpunkt des Feedbacks auf den Zeitpunkt der Belohnungserwartung gleichermaßen bei gesunden Älteren und bei Parkinson-Patienten beobachtet wurde, scheint dieses Defizit bei der Belohnungs-Prädiktion in erster Linie ein Alterseffekt zu sein. Da die Reaktionszeitschwelle für alle Probanden individuell angepasst worden war, war die Performance in der Zahlenvergleichsaufgabe in allen drei Gruppen vergleichbar. Damit kann der beobachtete Effekt nicht mit unterschiedlichem Abschneiden in der Zahlenvergleichsaufgabe erklärt werden. Defizite bei der Verarbeitung der Cue-Bilder können das beobachtete Muster ebenfalls nicht ausreichend erklären, da die fehlende Verschiebung der mesolimbischen Antwort auch noch beobachtet wurde, wenn die Erkennungsvarianten für die Cues als Kovariate in das statistische Modell eingefügt wurden. Auch eine altersabhängige Veränderung der BOLD-Antwort kommt als Erklärungsansatz kaum in Frage, da die Belohnungs-Cues und -Feedbacks zeitlich dekorreliert waren und altersbedingte Veränderungen der neurovaskulären Kopplung darüber hinaus eher mit einem früheren als mit einem späteren Peak der BOLD-Antwort assoziiert sind (Huettel et al., 2001).

Eine plausible Erklärung für das Fehlen einer mesolimbischen Belohnungs-Prädiktionsantwort könnte ein altersbedingtes Defizit bei der Berechnung von EVs für angekündigte Belohnungen sein. Dazu passt, dass nicht nur Parkinson-Patienten, sondern auch gesunde Ältere in erster Linie eine Störung des Lernens durch positives Feedback aufweisen (Frank et al., 2004). EVs sind die Summe aller Produkte der Werte möglicher Ergebnisse mit ihren Wahrscheinlichkeiten (Knutson et al., 2005). Da in den „belohnten“ Durchgängen ein Risiko von 25% für einen (geringen) Verlust bestand, war eine korrekte Berechnung der EVs notwendig, um eine folgende Belohnung korrekt vorauszusagen. Ein zu hohes Einschätzen der Wahrscheinlichkeit eines negativen Ergebnisses würde demnach zu einem Unterschätzen des tatsächlichen EV in belohnten Durchgängen führen.

Werte und Wahrscheinlichkeiten erwarteter Belohnungen werden durch ein medial-präfrontal-mesolimbisches Netzwerk kodiert (Knutson et al., 2005). Eine Störung bei der Berechnung von EVs könnte damit sowohl aus einem altersabhängigen dopaminergen Defizit resultieren, als auch aus einer Dysfunktion des medialen PFC, oder aus einer Kombination beider Faktoren. Durch altersbedingte Reduktion prä- und postsynaptischer Elemente der dopaminergen Transmission (Volkow et al., 1998b) könnte es zu einer Abnahme der SNR im mesolimbischen System kommen, wie durch ein Netzwerk-Modell des assoziativen Lernens bei altersbedingtem Dopaminmangel vorausgesagt wurde (Bäckman et al., 2006; Li et al., 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie passen aber auch zu einer möglichen altersbedingten medial-präfrontalen Dysfunktion. Während die jüngeren Probanden sowohl bei der Präsentation der Cues als auch bei positivem Belohnungs-Feedback eine Aktivierung

des medialen PFC zeigten, konnte eine mediale PFC-Aktivität bei älteren Probanden nur als Reaktion auf das Belohnungs-Feedback beobachtet werden. Da der mediale PFC an der Berechnung der Wahrscheinlichkeitskomponente von EVs beteiligt ist (Knutson et al., 2005), könnten altersbedingte strukturelle oder funktionelle Veränderungen dieser Hirnregion ebenfalls zu einer Störung der Belohnungsprädiktion bei älteren Menschen beitragen. Wie in früheren Studien (Gong et al., 2005; Tisserand et al., 2004) fand sich in der hier untersuchten Kohorte älterer Probanden eine Volumenreduktion der grauen Substanz in präfrontalen Kortexarealen, die auch den medialen PFC umfassten (Abb. 3.14). Da ältere Probanden im Vergleich zu den jüngeren Versuchsteilnehmern auch eine Abnahme der grauen Substanz im ventralen Striatum zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass das altersbedingte Defizit bei der Belohnungsprädiktion am ehesten auf eine kombinierte medial-präfrontale und striatal-dopaminerge Dysfunktion zurückzuführen ist.

Interessanterweise zeigten Parkinson-Patienten im Vergleich zu gesunden Älteren eine noch stärkere Aktivierung des medialen PFC und des anterioren Gyrus cinguli (ACC) bei positivem Belohnungs-Feedback. Eine erhöhte Aktivität des ACC – wenn auch einer weiter dorsal gelegenen Region – war zuvor bei einer Aufmerksamkeitsaufgabe beobachtet worden (Blasi et al., 2005) und könnte das neuronale Korrelat eines Kompensationsmechanismus sein (siehe 4.1.3.1.). Grundsätzlich wäre möglich, dass ein ähnlicher Mechanismus auch zur erhöhten ACC-Aktivierung bei den Patienten beitrug. Allerdings fand sich keine Beziehung zwischen der Aktivierung im medialen PFC / ACC und den Reaktionszeiten in der Zahlenvergleichsaufgabe, einem möglichen Maß der Verarbeitungseffizienz in diesem Experiment. Deshalb muss die erhöhte ACC-Aktivierung bei den Patienten mit Vorsicht interpretiert werden.

Auch im rechten medialen Mittelhirn zeigten Parkinson-Patienten im Vergleich zu den gesunden älteren Probanden eine verstärkte Aktivierung bei positivem Belohnungs-Feedback. Dies könnte möglicherweise auf einen noch stärkeren Prädiktionsfehler bei den Patienten hinweisen. Der Befund einer verstärkten Mittelhirnaktivierung bei den Patienten könnte allerdings auch auf eine grundlegendere Dysregulation im Mittelhirn zurückzuführen sein. Erhöhte Aktivierung in Hirnregionen, die von neurodegenerativen Erkrankungen betroffen sind, fand sich beispielsweise auch im präklinischen Stadium der Alzheimerschen Erkrankung (Bookheimer et al., 2000), weshalb ein – möglicherweise unspezifischer – Kompensationsmechanismus für lokale Schädigungen ebenfalls die beobachtete erhöhte Mittelhirnaktivierung erklären könnte.

#### **4.2.2. Störung der mesolimbischen funktionellen Konnektivität bei M. Parkinson**

Neben den absoluten Aktivierungsunterschieden bei Belohnungserwartung und Belohnungs-Feedback wurde auch die funktionelle Konnektivität zwischen dem medialen Mittelhirn und dem ventralen Striatum sowie dem ACC untersucht.

Bei jungen Versuchsteilnehmern fand sich eine moderate funktionelle Konnektivität zwischen dem Mittelhirn und dem Nucl. accumbens, die vergleichbar mit dem in früheren Arbeiten berichteten Ausmaß funktioneller Kopplung zwischen diesen Regionen war (Menon & Levitin, 2005). Bei den gesunden älteren Probanden war die funktionelle Konnektivität zwischen VTA und NAcc nur geringfügig und nicht signifikant niedriger. Dagegen war die Mittelhirn-Accumbens-Konnektivität bei den Parkinson-Patienten signifikant reduziert und nicht signifikant von 0 verschieden.

Während das altersbedingte Dopamin-Defizit leicht ausgeprägt ist und Prä- und Postsynapse gleichermaßen betrifft (Volkow et al., 1998b), ist das dopaminerge Defizit bei Parkinson-Patienten wesentlich ausgeprägter und betrifft praktisch ausschließlich die präsynaptische Seite. Der Befund einer funktionellen Entkopplung von VTA und NAcc ist mit einem solchen qualitativ von Altersveränderungen unterscheidbaren Muster dopaminergen Funktionsverlustes bei M. Parkinson kompatibel. Die mesolimbische funktionelle Konnektivität [NAcc-VTA] war positiv mit dem Belohnungs-abhängigen Reaktionszeitvorteil in der Zahlenvergleichsaufgabe korreliert, und, anders als bei der mesolimbischen fMRI-Antwortdifferenz [NAcc-Aktivierung Cues - Feedback] fand sich auch ein Trend für eine positive Korrelations zwischen der VTA-NAcc-Konnektivität und Reaktionszeitvorteil für die Cues selbst, was möglicherweise auf ein Parkinson-spezifisches Defizit bei der sehr frühen Verarbeitung salienter Stimuli sein könnte. Die Beobachtung, dass die Patienten über die altersbedingte Störung der Belohnungs-Prädiktion hinausgehende funktionelle Alterationen bei der Verarbeitung von Belohnungs-Cues aufwiesen, ist kompatibel mit den Ergebnissen einer kürzlich publizierten elektrophysiologischen Studie zum Belohnungs-motivierten Klassifizierungslernen (Mattox et al., 2006), in der Parkinson-Patienten schlechter abschnitten als gesunde ältere Probanden. Dabei korrelierte die Performance-Reduktion bei den Patienten mit einer Verminderung einer langsamen Prä-Stimulus-Negativität. Ob diese Reduktion eines langsamen kortikalen Potentials mit Störungen der funktionellen Konnektivität innerhalb des mesolimbischen Systems im Zusammenhang steht, könnte beispielsweise durch kombinierte EEG-Ableitungen und Tiefenableitungen bei Patienten der stereotaktischen Neurochirurgie (Brown et al., 2001) und frequenzspezifische Datenanalyse (Düzel et al., 2003b; Guderian & Düzel, 2005) untersucht werden.

Die Beziehung zwischen dopaminergem Neurotransmission und funktioneller Konnektivität innerhalb des mesolimbischen Systems ist sehr komplex und die bisherigen Daten sind teilweise widersprüchlich. Zwar wurde bereits eine reduzierte funktionelle Konnektivität im

präfrontalen Kortex bei Parkinson-Patienten berichtet (Rowe et al., 2002), allerdings zeigen elektrophysiologische Studien bei Tieren (Ruskin et al., 1999; Walters et al., 2000) und stereotaktisch operierten Parkinson-Patienten (Brown et al., 2001; Williams et al., 2002), dass Dopamin frequenzspezifisch sowohl zu einer gesteigerten als auch zu einer reduzierten Synchronisation der Aktivität entfernter Hirnregionen führen kann. Honey und Kollegen (2003) untersuchten die Auswirkung dopaminergener Pharmaka auf die Konnektivität zwischen dem dorsalen Striatum und unterschiedlichen Hirnregion, einschließlich des Mittelhirns, bei gesunden älteren Probanden. Dabei fanden sie unter dem D2-Dopamin-Antagonisten Sulpirid einen Anstieg der funktionellen Kopplung zwischen dem Nucl. caudatus und dem Thalamus, aber auch dem Mittelhirn. Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch zu der in fMRI-Experiment 2 beobachteten reduzierten funktionellen VTA-NAcc-Konnektivität bei Parkinson-Patienten könnte sein, dass dopaminerge Modulation die funktionelle Konnektivität zwischen dem Mittelhirn und dem ventralen versus dorsalen Striatum unterschiedlich beeinflusst. Darüber hinaus ist Sulpirid ein selektiver D2/D3-Rezeptor-Antagonist ohne relevanten Einfluss auf D1-Rezeptor-vermittelte Prozesse. Letztere scheinen gerade bei Belohnungs-abhängigem Lernen eine besonders wichtige Rolle zu spielen (Bratcher et al., 2005) und könnten möglicherweise unter Sulpirid durch Inhibition präsynaptischer autoinhibitorischer D2-Rezeptoren sogar hochreguliert werden (Shen & Johnson, 2000). Durch Mikrodialyse-Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die negative Feedback-Schleife zwischen NAcc und VTA von einem balancierten Zusammenspiel zwischen D1- und D2-Typ-Dopaminrezeptoren abhängt (Rahman et al., 2001). Angesichts dieser komplexen Zusammenhänge sollten Aussagen über den der bei M. Parkinson gestörten funktionellen Konnektivität zugrunde liegenden Pathomechanismus zurückhaltend getroffen werden. Zwar könnte grundsätzlich das präsynaptische Dopamin-Defizit als mögliche Erklärung in Frage kommen, allerdings sind auch kompensatorische Prozesse in Frühstadien der Erkrankung, die zu einem temporären *hyperdopaminergen* Zustand im mesolimbischen und mesokortikalen System führen könnten, zu beachten (Cropley et al., 2006).

#### **4.2.3. Klinische Implikationen**

Zusammengefasst konnte in fMRI-Experiment 2 gezeigt werden, dass normales Altern und M. Parkinson im Frühstadium mit einem Defizit der Belohnungs-Prädiktion assoziiert sind, während die Generierung mesolimbischer Prädiktionsfehler erhalten bleibt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Alterationen der neuronalen Mechanismen mesolimbischer Belohnungsverarbeitung bei Parkinson-Patienten zumindest teilweise über die beobachteten Altersveränderungen hinausgehen. Mesolimbische Dysfunktion könnte daher ein wichtiger neuronaler Kandidatenmechanismus für weitere Untersuchungen zu depressiver

Symptomatik und zu kognitiven Defiziten bei der Parkinsonschen Erkrankung und verwandten Störungen sein.

Das Fehlen einer reliablen ventral-striatalen Antwort auf Belohnungs-Cues bei gesunden Älteren und Patienten könnte ebenfalls klinische Implikationen haben. Dopaminerge Regelkreise spielen eine wichtige Rolle bei einer Reihe kognitiver Prozesse, die von Altersveränderungen betroffen sind, darunter Aufmerksamkeit (Fan et al., 2003; Blasi et al., 2005), Arbeitsgedächtnis (Mattay et al., 2002; Aalto et al., 2005) und episodisches Gedächtnis (Knecht et al., 2004; Wittmann et al., 2005; Adcock et al., 2006; siehe auch fMRI-Experiment 1 dieser Arbeit). Auch wenn kaum umstritten ist, dass Dopamin dabei regional-spezifische Effekte ausübt, sollten angesichts der hier beobachteten Störung der Belohnungs-Prädiktion in künftigen Studien zu Altersveränderungen bei kognitiven Leistungen auch motivationale Aspekte, insbesondere Probleme bei der Prädiktion positiver Resultate, mit in Betracht gezogen werden.

#### **4.3. Schlussbetrachtungen und Ausblick**

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels fMRI in Kombination mit molekulargenetischen und biochemischen Ansätzen die Rolle dopaminerger Neuromodulation bei unterschiedlichen Lernprozessen charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass sich interindividuelle Variabilität der dopaminergen Neuromodulation sowohl bei Hippocampus-abhängigem episodischem Gedächtnis als auch bei mesolimbischem Stimulus-Belohnungs-Assoziationslernen auf die Hirnaktivitätsmuster auswirken kann.

##### ***4.3.1. Bedeutung für das Konzept der Hippocampus-VTA-Schleife***

Die verstärkte Mittelhirn-Aktivierung bei der erfolgreichen Hippocampus-abhängigen Enkodierung neuer Stimuli in das episodische Gedächtnis stützt die Hypothese eines Regelkreises, der den Hippocampus und die VTA einschließt. Zu dem von Lisman und Grace (2005) vorgeschlagenen Modell passt auch die ebenfalls erhöhte Aktivität mesolimbischer Strukturen wie des Nucl. accumbens bei der episodischen Gedächtnisbildung und der Befund, dass der DAT1-VNTR die Mittelhirnaktivität und die Aktivierungen der mesolimbischen basalen Vorderhirnstrukturen gleichartig beeinflusst. Da Dopamin nach Lisman und Grace in erster Linie Plastizitätsprozesse in der CA1-Region beeinflussen soll, erscheint die bei den immunhistochemischen Untersuchungen gefundene Verteilung des Dopamin-Transporters im Hippocampus mit deutlicher DAT1-Expression in CA3, aber nicht CA1, überraschend. Da in früheren Studien jedoch bereits gezeigt werden konnte, dass der gesamte Hippocampus und insbesondere CA1 und das Subiculum dopaminerge Projektionen erhalten (Samson et al., 1990; Gasbarri et al., 1991), ist anzunehmen, dass tatsächlich dopaminerge Neuromodulation an den Schaffer-Kollateralsynapsen erfolgen kann, das Dopamin-Signal aber durch einen DAT1-

unabhängigen Weg terminiert wird, möglicherweise über postsynaptische Aufnahme durch den PMAT und COMT-abhängige Metabolisierung. Unklar bleibt auch die zeitliche Dynamik der dopaminergen Neuromodulation im Hippocampus (siehe 4.1.1.1.). Sollte die Dopamin-Inaktivierung in CA1 tatsächlich DAT1-unabhängig sein, könnte dies auch bedeuten, dass sie relativ langsam erfolgt, womit sich die Wahrscheinlichkeit erhöhen würde, dass die Stimulation aktiver (also nicht  $Mg^{2+}$ -blockierter) NMDA-Rezeptoren in das Zeitfenster der dopaminergen Aktivität in CA1 fällt.

Ein weiterer bisher wenig beachteter Aspekt der Hippocampus-VTA-Schleife ist die Möglichkeit, dass der Hippocampus über die ausgedehnten Projektionen vom Subiculum grundsätzlich in der Lage ist, die Aktivität des Nucl. accumbens zu beeinflussen, etwa beim episodischen Abruf Motivations-relevanter Ereignisse. Künftige Studien sollten daher neben Modulation des Hippocampus-abhängigen Gedächtnisses durch mesolimbische Belohnungsverarbeitung auch die Möglichkeit eines umgekehrten Prozesses mit in Betracht ziehen.

#### ***4.3.2. In vivo-Bildgebung von Transmittersystemen beim Menschen***

Aufgrund des bei Humanexperimenten in den allermeisten Fällen geltenden Gebotes der Nicht-Invasivität ist es nicht immer trivial, einen direkten Bezug zu den Ergebnissen tierphysiologischer Studien herzustellen. Die Beobachtung, dass Hirnstammstrukturen reliable fMRI-Aktivierungsmuster zeigen, die möglicherweise tatsächlich ein Korrelat neuromodulatorischer Transmissionsprozesse darstellt, könnte mit dazu beitragen, die Rolle solcher Transmitternetzwerke auch beim Menschen in vivo zu charakterisieren. Da fMRI ein rein funktionell-neuroanatomisches Verfahren ist, erscheint es sinnvoll, die bildgebenden Untersuchungen mit pharmakologischen (Mattay et al., 2002) und – wie auch in dieser Arbeit – mit molekulargenetischen Ansätzen zu verknüpfen. Da Dopamin-Freisetzung beim Menschen bereits in vivo durch PET-Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Koeppe et al., 1998; Aalto et al., 2005), wäre ein weiterer möglicher Schritt in der Validierung der fMRI-Daten eine Korrelation der Mittelhirnaktivierung im fMRI mit der durch PET gemessenen Dopamin-Freisetzung. Aufgrund der sehr niedrigen zeitlichen Auflösung der PET-Methode (Pappata et al., 2002) könnte solch eine Korrelation jedoch nur zwischen Probanden erfolgen.

#### ***4.3.3. Klinische Bedeutung***

In den vergangenen Jahren hat die funktionelle Magnetresonanztomographie zunehmend zum Verständnis der Pathomechanismen bei neuropsychiatrischen Erkrankungen beigetragen (Mattay et al., 2002; Schoenfeld et al., 2005; Juckel et al., 2006; Krauel et al., 2006). Auch Experiment 2 dieser Arbeit konnte mit dazu beitragen, neuronale Mechanismen zu identifizieren, die möglicherweise bestimmten Krankheitssymptomen zugrunde liegen.

Von entscheidender Bedeutung für eine weitere erfolgreiche Anwendung bildgebender Verfahren in der klinischen Forschung könnte – wie hier in Experiment 2 erfolgt – ein Rückbezug der beobachteten Veränderungen auf parallel oder auch separat erhobene Verhaltensparameter und etablierte Symptomskalen sein, um diejenigen Mechanismen zu identifizieren, die tatsächlich mit Einschränkungen assoziiert sein könnten (Bäckman et al., 2000; Juckel et al., 2006).

Mit zunehmender Verfügbarkeit der fMRI-Methodik besteht grundsätzlich auch das Potential, dass sie künftig als diagnostisches Werkzeug in der Neurologie und Psychiatrie an Bedeutung gewinnen könnte. Bisher beschränkt sich ihre klinische Anwendung allerdings weitgehend auf die Lokalisierung eloquenter Kortexareale in der neurochirurgischen Operationsplanung (Tharin & Golby, 2007). In der vorliegenden Arbeit bestätigte sich ein bereits zuvor beobachtetes Muster, dass Hirnregionen, die bei einer Erkrankung besonders betroffen sind, im Frühstadium der Erkrankung oder auch schon bei Vorhandensein von genetischen Risikofaktoren eine – möglicherweise kompensatorische – verstärkte Aktivierung zeigen (Bookheimer et al., 2000; Egan et al., 2001; Weinberger et al., 2001). Allerdings sind solche kompensatorischen Aktivierungen bisher nur im Vergleich von Gruppen miteinander beobachtet worden. Eine Herausforderung bei der Weiterentwicklung der fMRI-Bildgebung zum klinisch-diagnostischen Werkzeug ist daher die Entwicklung von robusten Paradigmen und statistischen Analyseverfahren, die Aussagen auf Einzelprobandenebene erlauben.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aalto S, Bruck A, Laine M, Nagren K, Rinne JO (2005). Frontal and temporal dopamine release during working memory and attention tasks in healthy humans: a positron emission tomography study using the high-affinity dopamine D2 receptor ligand [<sup>11</sup>C]FLB 457. *J Neurosci* 25: 2471-2477.
- Aarsland D, Tandberg E, Larsen JP, Cummings JL (1996). Frequency of dementia in Parkinson disease. *Arch Neurol* 53: 538-42.
- Adcock RA, Thangavel A, Whitfield-Gabrieli S, Knutson B, Gabrieli JD (2006). Reward-motivated learning: mesolimbic activation precedes memory formation. *Neuron* 50: 507-17.
- Addis DR, McIntosh AR, Moscovitch M, Crawley AP, McAndrews MP (2004). Characterizing spatial and temporal features of autobiographical memory retrieval networks: a partial least squares approach. *Neuroimage* 23: 1460-1471.
- Akaike N, Ishibashi H, Hara H, Oyama Y, Ueha T (1993). Effect of KB-2796, a new diphenylpiperazine Ca<sup>2+</sup> antagonist, on voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> currents and oxidative metabolism in dissociated mammalian CNS neurons. *Brain Res* 619: 263-70.
- Akil M, Kolachana BS, Rothmond DA, Hyde TM, Weinberger DR, Kleinman JE (2003). Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *J Neurosci* 23: 2008-2013.
- Ashburner J, Friston KJ (1999). Nonlinear spatial normalization using basis functions. *Hum Brain Mapp* 7: 254-66.
- Ashburner J, Friston KJ (2000). Voxel-based morphometry – the methods. *Neuroimage* 11: 805-21.
- Bach ME, Barad M, Son H, Zhuo M, Lu YF, Shih R, Mansuy I, Hawkins RD, Kandel ER (1999). Age-related defects in spatial memory are correlated with defects in the late phase of hippocampal long-term potentiation in vitro and are attenuated by drugs that enhance the cAMP signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5280-5285.
- Bäckman L, Ginovart N, Dixon AR, Wahlin TBR, Wahlin SA, Halldin C, et al. (2000). Age-Related Cognitive Deficits Mediated by Changes in the Striatal Dopamine System. *Am J Psychiatry* 157: 635-637.
- Bäckman L, Nyberg L, Lindenberger U, Li SC, Farde L (2006). The correlative triad among aging, dopamine, and cognition: current status and future prospects. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 791-807.
- Barcelo F, Suwazono S, Knight RT (2000). Prefrontal modulation of visual processing in humans. *Nat Neurosci* 3: 399-403.
- Bartres-Faz D, Junque C, Serra-Grabulosa JM, Lopez-Alomar A, Moya A, Bargallo N, Mercader JM, Moral P, Clemente IC (2002). Dopamine DRD2 Taq I polymorphism associates with caudate nucleus volume and cognitive performance in memory impaired subjects. *Neuroreport* 13: 1121-5.
- Baulac M, Verney C, Berger B (1986). [Dopaminergic innervation of the parahippocampal and hippocampal regions in the rat]. *Rev Neurol (Paris)* 142: 895-905.
- Becker G, Seufert J, Bogdahn U, Reichmann H, Reiners K (1995). Degeneration of substantia nigra in chronic Parkinson's disease visualized by transcranial color-coded real-time sonography. *Neurology* 45: 182-4.
- Berger B, Gaspar P, Verney C (1991). Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. *Trends Neurosci* 14: 21-27.
- Bergson C, Mrzljak L, Smiley JF, Pappy M, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1995). Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain. *J Neurosci* 15: 7821-36.
- Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg , Schmitz P, Bianchin M, Izquierdo I, Medina JH (1997). Involvement of hippocampal cAMP/cAMP-dependent protein kinase signaling pathways in a late memory consolidation phase of aversively motivated learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7041-7046.

- Bernstein HG, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B, Gundelfinger ED, Braunewell KH (1999). Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *J Neurocytol* 28: 655-662.
- Berridge KC, Robinson TE (1998). What is the role of dopamine in reward: hedonic impact, reward learning, or incentive salience? *Brain Res Brain Res Rev* 28: 309-69.
- Bertolino A, Rubino V, Sambataro F, Blasi G, Latorre V, Fazio L, Caforio G, Petruzzella V, Kolachana B, Hariri A, Meyer-Lindenberg A, Nardini M, Weinberger DR, Scarabino T (2006a). Prefrontal-hippocampal coupling during memory processing is modulated by COMT val158met genotype. *Biol Psychiatry* 60: 1250-8.
- Bertolino A, Blasi G, Latorre V, Rubino V, Rampino A, Sinibaldi L, Caforio G, Petruzzella V, Pizzuti A, Scarabino T, Nardini M, Weinberger DR, Dallapiccola B (2006b). Additive effects of genetic variation in dopamine regulating genes on working memory cortical activity in human brain. *J Neurosci* 26: 3918-22.
- Biggins CA, Boyd JL, Harrop FM, Madeley P, Mindham RH, Randall JI, Spokes EG (1992). A controlled, longitudinal study of dementia in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 55: 566-71.
- Birnboim HC, Doly J (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-23.
- Biswal B, Yetkin FZ, Haughton VM, Hyde JS (1995). Functional connectivity in the motor cortex of resting human brain using echo-planar MRI. *Magn Reson Med* 34: 537-41.
- Blasi G, Mattay VS, Bertolino A, Elvevag B, Callicott JH, Das S, Kolachana BS, Egan MF, Goldberg TE, Weinberger DR (2005). Effect of catechol-O-methyltransferase val158met genotype on attentional control. *J Neurosci* 25: 5038-45.
- Bonisch H, Bruss M (2006). The norepinephrine transporter in physiology and disease. *Handb Exp Pharmacol* 175: 485-524.
- Bookheimer SY, Strojwas MH, Cohen MS, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Mazziotta JC, Small GW (2000). Patterns of brain activation in people at risk for Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 343:450-456.
- Bozarth, M.A. (1994). Pleasure systems in the brain. In: D. M. Warburton (ed.), *Pleasure: The politics and the reality*, pp. 5-14. New York, John Wiley & Sons.
- Bratcher NA, Farmer-Dougan V, Dougan JD, Heidenreich BA, Garris PA (2005). The role of dopamine in reinforcement: changes in reinforcement sensitivity induced by D1-type, D2-type, and nonselective dopamine receptor agonists. *J Exp Anal Behav* 84: 371-99.
- Braver TS, Barch DM (2002). A theory of cognitive control, aging cognition, and neuromodulation. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 809-17.
- Brett M, Anton J-L, Valabregue R, Poline J-B (2002). Region of interest analysis using an SPM toolbox (CD-ROM). *Neuroimage* 16.
- Brookes KJ, Neale BM, Sugden K, Khan N, Asherson P, D'Souza UM (2007). Relationship between VNTR polymorphisms of the human dopamine transporter gene and expression in post-mortem midbrain tissue. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* Jun 19 [Epub ahead of print].
- Brown M, & Aggleton JP (2001). Recognition memory: What are the roles of the perirhinal cortex and the hippocampus. *Nat Rev Neurosci* 2: 51 -61.
- Brown P, Oliviero A, Mazzone P, Insola A, Tonali P, Di Lazzaro V (2001). Dopamine dependency of oscillations between subthalamic nucleus and pallidum in Parkinson's disease. *J Neurosci* 21: 1033-8.
- Brown SM, Hariri AR (2006). Neuroimaging studies of serotonin gene polymorphisms: exploring the interplay of genes, brain, and behavior. *Cogn Affect Behav Neurosci* 6: 44-52.
- Buckner RL, Logan J, Donaldson DI, Wheeler ME (2000). Cognitive neuroscience of episodic memory encoding. *Acta Psychol (Amst)* 105:127-139.

- Budygin EA, Gainetdinov RR, Kilpatrick MR, Rayevsky KS, Mannisto PT, Wightman RM (1999). Effect of tolcapone, a catechol-O-methyltransferase inhibitor, on striatal dopaminergic transmission during blockade of dopamine uptake. *Eur J Pharmacol* 370: 125–131.
- Burton EJ, McKeith IG, Burn DJ, Williams ED, O'Brien JT (2004). Cerebral atrophy in Parkinson's disease with and without dementia: a comparison with Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and controls. *Brain* 127: 791-800.
- Carbon M, Marie RM (2003). Functional imaging of cognition in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 16: 475-80.
- Castner SA, Williams GV (2007). Tuning the engine of cognition: a focus on NMDA/D1 receptor interactions in prefrontal cortex. *Brain Cogn* 63: 94-122.
- Chen J, Lipska BK, Halim N, Ma QD, Matsumoto M, Melhem S, Kolachana BS, Hyde TM, Herman MM, Apud J, Egan MF, Kleinman JE, Weinberger DR (2004). Functional analysis of genetic variation in catechol-O-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein, and enzyme activity in postmortem human brain. *Am J Hum Genet* 75(5): 807-21.
- Chen L, Haider K, Ponda M, Cariappa A, Rowitch D, Pillai S (2001). Protein kinase C-associated kinase (PKK), a novel membrane-associated, ankyrin repeat-containing protein kinase. *J Biol Chem* 276: 21737-44.
- Cheon KA, Ryu YH, Kim JW, Cho DY (2005). The homozygosity for 10-repeat allele at dopamine transporter gene and dopamine transporter density in Korean children with attention deficit hyperactivity disorder: relating to treatment response to methylphenidate. *Eur Neuropsychopharmacol* 15: 95-101.
- Chudasama Y, Robbins TW (2004). Dopaminergic modulation of visual attention and working memory in the rodent prefrontal cortex. *Neuropsychopharmacology* 29:1628-1636.
- Ciliax BJ, Drash GW, Staley JK, Haber S, Mobley CJ, Miller GW, Mufson EJ, Mash DC, Levey AI (1999). Immunocytochemical localization of the dopamine transporter in human brain. *J Comp Neurol* 409: 38–56.
- Cools R, Stefanova E, Barker RA, Robbins TW, Owen AM (2002). Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET. *Brain* 125: 584-594.
- Cragg SJ, Rice ME (2004). DAncing past the DAT at a DA synapse. *Trends Neurosci* 27: 270-277.
- Craik FIM, Lockhart RS (1972). Levels of processing: A framework for memory research. *J Verb Learn Verb Behav* 11: 671-684.
- Critchley HD, Mathias CJ, Dolan RJ (2001). Neural activity in the human brain relating to uncertainty and arousal during anticipation. *Neuron* 29: 537-45.
- Cropley VL, Fujita M, Innis RB, Nathan PJ (2006). Molecular imaging of the dopaminergic system and its association with human cognitive function. *Biol Psychiatry* 59: 898-907.
- Dahlin A, Xia L, Kong W, Hevner R, Wang J (2007). Expression and immunolocalization of the plasma membrane monoamine transporter in the brain. *Neuroscience* 146: 1193-211.
- Dale AM, Buckner RL (1997). Selective averaging of rapidly presented individual trials using fMRI. *Hum Brain Mapp* 5: 329-340.
- Dale AM (1999). Optimal experimental design for event-related fMRI. *Hum Brain Mapp* 8: 109-114.
- Das P, Kemp AH, Liddell BJ, Brown KJ, Olivieri G, Peduto A, Gordon E, Williams LM (2005). Pathways for fear perception: modulation of amygdala activity by thalamo-cortical systems. *Neuroimage* 26: 141-148.
- de Frias CM, Annerbrink K, Westberg L, Eriksson E, Adolfsson R, Nilsson LG (2004). COMT gene polymorphism is associated with declarative memory in adulthood and old age. *Behav Genet* 34: 533-539.
- DeMille MM, Kidd JR, Ruggeri V, Palmatier MA, Goldman D, Odunsi A, Okonofua F, Grigorenko E, Schulz LO, Bonne-Tamir B, Lu RB, Parnas J, Pakstis AJ, Kidd KK (2002). Population variation in linkage disequilibrium across the COMT gene considering promoter region and coding region variation. *Hum Genet* 111: 521–537.

- Dick DM, Aliev F, Kramer J, Wang JC, Hinrichs A, Bertelsen S, Kuperman S, Schuckit M, Nurnberger J Jr, Edenberg HJ, Porjesz B, Begleiter H, Hesselbrock V, Goate A, Bierut L (2007). Association of CHRM2 with IQ: Converging Evidence for a Gene Influencing Intelligence. *Behav Genet* 37: 265-72.
- Dolan RJ, Fletcher PC (1997). Dissociating prefrontal and hippocampal function in episodic memory encoding. *Nature* 388: 582-5.
- Doucette-Stamm LA, Blakely DJ, Tian J, Mockus S, Mao JI (1995). Population genetic study of the human dopamine transporter gene (DAT1). *Genet Epidemiol* 12: 303-308.
- Duan J, Wainwright MS, Comeron JM, Saitou N, Sanders AR, Gelernter J, Gejman PV (2003). Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum Mol Genet* 12: 205-16.
- Dubertret C, Gouya L, Hanoun N, Deybach JC, Ades J, Hamon M, Gorwood P (2004). The 3' region of the DRD2 gene is involved in genetic susceptibility to schizophrenia. *Schizophr Res* 67: 75-85.
- Düzel E, Habib R, Rotte M, Guderian S, Tulving E, Heinze HJ (2003a). Human hippocampal and parahippocampal activity during visual associative recognition memory for spatial and nonspatial stimulus configurations. *J Neurosci* 23, 9439-9444.
- Düzel E, Habib R, Schott B, Schoenfeld A, Lobaugh N, McIntosh R, Scholz M, Heinze HJ (2003b). A multivariate, spatio-temporal analysis of electromagnetic time frequency data of recognition memory. *Neuroimage* 18: 185-197.
- Düzel E, Habib R, Guderian S, Heinze HJ (2004). Four types of novelty-familiarity responses in associative recognition memory of humans. *European Journal of Neuroscience* 19: 1408-16.
- Düzel E, Vargha-Khadem F, Heinze HJ, Mishkin M (2001). Brain activity evidence for recognition without recollection after early hippocampal damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 8101-8106.
- Eckert T, Sailer M, Kaufmann J, Schrader C, Peschel T, Bodammer N, Heinze H, Schoenfeld M (2004). Differentiation of idiopathic Parkinson's disease, multiple system atrophy, progressive supranuclear palsy, and healthy controls using magnetization transfer imaging. *Neuroimage* 21: 229-235.
- Efron B, Tibshirani R (1993). *An Introduction to the Bootstrap*. New York: Chapman and Hall.
- Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, Callicott JH, Mazzanti CM, Straub RE, Goldman D, Weinberger DR (2001). Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6917-6922.
- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M, Lu B, Weinberger DR (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell* 112: 257-269.
- Eichenbaum H (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci* 1: 41-50.
- Eldridge L.L., Knowlton B.J., Furmanski C.S., Bookheimer S.Y., Engel S.A. (2000). Remembering episodes: a selective role for the hippocampus during retrieval. *Nat Neurosci* 3: 1149-52.
- Erixon-Lindroth N, Farde L, Wahlin TB, Sovago J, Halldin C, Bäckman L (2005). The role of the striatal dopamine transporter in cognitive aging. *Psychiatry Res* 138: 1-12.
- Fan J, Fossella J, Sommer T, Wu Y, Posner MI (2003). Mapping the genetic variation of executive attention onto brain activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7406-7411.
- Fenker DB, Schott BH, Richardson-Klavehn A, Heinze HJ, Düzel E (2005). Recapitulating emotional context: activity of amygdala, hippocampus and fusiform cortex during recollection and familiarity. *Eur J Neurosci* 21: 1993-9.
- Fernández G, Weyerts H, Tendolkar I, Smid HG, Scholz M, Heinze HJ (1998). Event-related potentials of verbal encoding into episodic memory: dissociation between the effects of subsequent memory performance and distinctiveness. *Psychophysiology* 35: 709-20.

- Finckh U, Giraldo-Velasquez M, Pelz J, Otto G, Sander T, Schmidt LG, Rommelspacher H, Rolfs A (1996). Dopamine D2 receptor gene (DRD2) haplotypes in Caucasians. *Gene* 179: 251-5.
- Fisher R (1921). On the "probable error" of a coefficient of correlation deduced from a small sample. *Metron* 1: 3-32.
- Floresco SB, Todd CL, Grace AA (2001). Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J Neurosci* 21: 4915-22.
- Foster JD, Cervinski MA, Gorentla BK, Vaughan RA. Regulation of the dopamine transporter by phosphorylation (2006). *Handb Exp Pharmacol* 2006(175): 197-214.
- Frank MJ, Seeberger LC, O'Reilly RC (2004). By carrot or by stick: cognitive reinforcement learning in parkinsonism. *Science* 306: 1940-3.
- Frey U, Schroeder H, Matthies H (1990). Dopaminergic antagonists prevent long-term maintenance of posttetanic LTP in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Brain Res* 522: 69-75.
- Fried I, Wilson CL, Morrow JW, Cameron KA, Behnke ED, Ackerson LC, Maidment NT (2001). Increased dopamine release in the human amygdala during performance of cognitive tasks. *Nat Neurosci* 4: 201-6.
- Friston KJ, Buechel C, Fink GR, Morris J, Rolls E, Dolan RJ (1997). Psychophysiological and modulatory interactions in neuroimaging. *Neuroimage* 6: 218-229.
- Friston KJ, Fletcher P, Josephs O, Holmes A, Rugg MD, Turner R (1998). Event-related fMRI: characterizing differential responses. *Neuroimage* 7: 30-40.
- Fuke S, Suo S, Takahashi N, Koike H, Sasagawa N, Ishiura S (2001). The VNTR polymorphism of the human dopamine transporter (DAT1) gene affects gene expression. *Pharmacogenomics J* 1: 152-156.
- Gasbarri A, Campana E, Pacitti C, Hajdu F, Tombol T (1991). Organization of the projections from the ventral tegmental area of Tsai to the hippocampal formation in the rat. *J Hirnforsch.* 32: 429-37.
- Gasbarri A, Sulli A, Innocenzi R, Pacitti C, Brioni JD (1996). Spatial memory impairment induced by lesion of the mesohippocampal dopaminergic system in the rat. *Neuroscience* 74: 1037-1044.
- Gelernter J, Yu Y, Weiss R, Brady K, Panhuysen C, Yang BZ, Kranzler HR, Farrer L (2006). Haplotype spanning TTC12 and ANKK1, flanked by the DRD2 and NCAM1 loci, is strongly associated to nicotine dependence in two distinct American populations. *Hum Mol Genet* 15: 3498-507.
- Gerlach M, Reichmann H, Riederer P (2003). *Die Parkinson-Krankheit. Grundlagen – Klinik – Therapie.* Wien: Springer-Verlag. 2. Aufl.
- Gitelman DR, Penny WD, Ashburner J, Friston KJ (2003). Modeling regional and psychophysiological interactions in fMRI: the importance of hemodynamic deconvolution. *Neuroimage* 19: 200-207.
- Gluzman Y (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23: 175-82.
- Goldberg TE, Weinberger DR (2004). Genes and the parsing of cognitive processes. *Trends Cogn Sci* 8: 325-35.
- Gong QY, Sluming V, Mayes A, Keller S, Barrick T, Cezayirli E, et al. (2005). Voxel-based morphometry and stereology provide convergent evidence of the importance of medial prefrontal cortex for fluid intelligence in healthy adults. *Neuroimage* 25: 1175-86.
- Good CD, Johnsrude IS, Ashburner J, Henson RN, Friston KJ, Frackowiak RS (2001). A voxel-based morphometric study of ageing in 465 normal adult human brains. *Neuroimage* 14: 21-36.
- Good CD, Scahill RI, Fox NC, Ashburner J, Friston KJ, Chan D, Crum WR, Rossor MN, Frackowiak RS (2002). Automatic differentiation of anatomical patterns in the human brain: validation with studies of degenerative dementias. *Neuroimage* 17: 29-46.
- Gosso MF, de Geus EJ, van Belzen MJ, Polderman TJ, Heutink P, Boomsma DI, Posthuma D (2006). The SNAP-25 gene is associated with cognitive ability: evidence from a family-based study in two independent Dutch cohorts. *Mol Psychiatry* 11: 878-86.

- Gothelf D, Eliez S, Thompson T, Hinard C, Penniman L, Feinstein C, Kwon H, Jin S, Jo B, Antonarakis SE, Morris MA, Reiss AL (2005). COMT genotype predicts longitudinal cognitive decline and psychosis in 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Neurosci* 8: 1500-2.
- Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O (1989). The human dopamine D2 receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a TaqI RFLP. *Am J Hum Genet* 45: 778-85.
- Guderian S, Düzel E (2005). Induced theta oscillations mediate large-scale synchrony with mediotemporal areas during recollection in humans. *Hippocampus* 15: 901-12.
- Guderian S, Schott BH, Richardson-Klavehn R, Düzel E. Mediotemporal theta oscillations before an event predict episodic encoding success. In Revision.
- Haag C, Berkels R, Grundemann D, Lazar A, Taubert D, Schomig E (2004). The localisation of the extraneuronal monoamine transporter (EMT) in rat brain. *J Neurochem* 88: 291-7.
- Hariri AR, Mattay VS, Tessitore A, Kolachana B, Fera F, Goldman D, Egan MF, Weinberger DR (2002). Serotonin Transporter Genetic Variation and the Response of the Human Amygdala. *Science* 297: 400-403.
- Hariri AR, Goldberg TE, Mattay VS, Kolachana BS, Callicott JH, Egan MF, Weinberger DR (2003). Brain-derived neurotrophic factor val66met polymorphism affects human memory-related hippocampal activity and predicts memory performance. *J Neurosci* 23: 6690-4.
- Hasselmo ME, Wyble BP (1997). Free recall and recognition in a network model of the hippocampus: simulating effects of scopolamine on human memory function. *Behav Brain Res* 89: 1-34.
- Heils A, Teufel A, Petri S, Stober G, Riederer P, Bengel D, Lesch KP (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression. *J Neurochem* 66: 2621-4.
- Heinz A, Braus DF, Smolka MN, Wrase J, Puls I, Hermann D, Klein S, Grusser SM, Flor H, Schumann G, Mann K, Büchel C (2005). Amygdala-prefrontal coupling depends on a genetic variation of the serotonin transporter. *Nat Neurosci* 8: 20-21.
- Heinz A, Goldman D, Jones DW, Palmour R, Hommer D, Gorey JG, Lee KS, Linnoila M, Weinberger DR (2000). Genotype influences in vivo dopamine transporter availability in human striatum. *Neuropsychopharmacology* 22: 133-139.
- Henson RN, Cansino S, Herron JE, Robb WG, Rugg MD (2003). A familiarity signal in human anterior medial temporal cortex? *Hippocampus* 13: 301-304.
- Henson RN, Rugg MD, Shallice T, Josephs O, Dolan RJ (1999). Recollection and familiarity in recognition memory: an event-related functional magnetic resonance imaging study. *J Neurosci* 19: 3962-72.
- Henke K, Weber B, Kneifel S, Wieser HG, Buck A (1999). Human hippocampus associates information in memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5884-9.
- Hersi AI, Rowe W, Gaudreau P, Quirion, R (1995). Dopamine D1 receptor ligands modulate cognitive performance and hippocampal acetylcholine release in memory-impaired aged rats. *Neuroscience* 69: 1067-74.
- Hinrichs H, Scholz M, Tempelmann C, Woldorff MG, Dale AM, Heinze HJ (2000). Deconvolution of event-related fMRI responses in fast-rate experimental designs: tracking amplitude variations. *J Cogn Neurosci* 12 Suppl 2: 76-89.
- Holmes AP, Friston KJ (1998). Generalisability, random effects and population inference. *Neuroimage* 7,Pt 2: S754.
- Honey GD, Suckling J, Zelaya F, Long C, Routledge C, Jackson S, et al. (2003). Dopaminergic drug effects on physiological connectivity in a human cortico-striato-thalamic system. *Brain* 126: 1767-81.
- Huang YY, Kandel ER (1995). D1/D5 receptor agonists induce a protein synthesis-dependent late potentiation in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 2446-50.
- Huang YY, Cate SP, Battistuzzi C, Oquendo MA, Brent D, Mann JJ (2004). An association between a functional polymorphism in the monoamine oxidase a gene promoter, impulsive traits and early abuse experiences. *Neuropsychopharmacology* 29: 1498-505.

- Huettel SA, Singerman JD, McCarthy G (2001). The effects of aging upon the hemodynamic response measured by functional MRI. *Neuroimage* 13: 161-75.
- Huotari M, Santha M, Lucas LR, Karayiorgou M, Gogos JA, Mannisto PT (2002). Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase-disrupted mice. *J Pharmacol Exp Ther* 303: 1309-1316.
- Huotari M, Garcia-Horsman JA, Karayiorgou M, Gogos JA, Mannisto PT (2004). D-Amphetamine responses in catechol-O-methyltransferase (COMT) disrupted mice. *Psychopharmacology* 172: 1-10.
- Hutchison WD, Dostrovsky JO, Walters JR, Courtemanche R, Boraud T, Goldberg J, et al. (2004). Neuronal oscillations in the basal ganglia and movement disorders: evidence from whole animal and human recordings. *J Neurosci* 24: 9240-3.
- Ingram SL, Prasad BM, Amara SG (2002). Dopamine transporter-mediated conductances increase excitability of midbrain dopamine neurons. *Nat Neurosci* 5: 971-8.
- Ishihara L, Brayne C (2006). A systematic review of depression and mental illness preceding Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand* 113: 211-20.
- Ito K, Nagano-Saito A, Kato T, Arahata Y, Nakamura A, Kawasumi Y, et al. (2002). Striatal and extrastriatal dysfunction in Parkinson's disease with dementia: a 6-[<sup>18</sup>F]fluoro-L-dopa PET study. *Brain* 125: 1358-65.
- Jaber M, Jones S, Giros B, Caron MG (1997). The dopamine transporter: a crucial component regulating dopamine transmission. *Mov Disord* 12: 629-633.
- Jacobsen LK, Staley JK, Zoghbi SS, Seibyl JP, Kosten TR, Innis RB, Gelernter J (2000). Prediction of dopamine transporter binding availability by genotype: a preliminary report. *Am J Psychiatry* 157: 1700-1703.
- Jones SR, Gainetdinov RR, Jaber M, Giros B, Wightman RM, Caron MG (1998). Profound neuronal plasticity in response to inactivation of the dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4029-4034.
- Jonsson EG, Nothen MM, Grunhage F, Farde L, Nakashima Y, Propping P, Sedvall GC (1999). Polymorphisms in the dopamine D2 receptor gene and their relationships to striatal dopamine receptor density of healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 4: 290-6.
- Josephs O, Turner R, Friston KJ (1997). Event-related fMRI. *Hum Brain Mapp* 5: 243-248.
- Juckel G, Schlagenhauf F, Koslowski M, Wüstenberg T, Villringer A, Knutson B, Wrase J, Heinz A (2006). Dysfunction of ventral striatal reward prediction in schizophrenia. *Neuroimage* 29: 409-16.
- Kaasinen V, Rinne JO (2002). Functional imaging studies of dopamine system and cognition in normal aging and Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev* 26: 785-93.
- Kadota T, Yamaai T, Saito Y, Akita Y, Kawashima S, Moroi K, Inagaki N, Kadota K (1996). Expression of dopamine transporter at the tips of growing neurites of PC12 cells. *J Histochem Cytochem* 44: 989-96.
- Kandel ER (2000). Cellular Mechanisms of Learning and Memory. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM: *Principles of Neural Science, Fourth Edition*, pp. 1247-79. New York: McGraw-Hill Professional.
- Karhunen T, Tilgmann C, Ulmanen I, Panula P (1995). Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein. *Neurosci Lett* 187: 57-60.
- Karis D, Fabiani M, Donchin E (1984). "P300" and Memory: Individual differences in the von Restorff effect. *Cognitive Psychology* 16: 177-216.
- Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF (1994). 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *J Neurochem* 63: 972-979.

- Kellendonk C, Simpson EH, Polan HJ, Malleret G, Vronskaya S, Winiger V, Moore H, Kandel ER (2006). Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. *Neuron* 49: 603-15.
- Kirsch P, Schienle A, Stark R, Sammer G, Blecker C, Walter B, Ott U, Burkart J, Vaitl D (2003). Anticipation of reward in a nonaversive differential conditioning paradigm and the brain reward system: an event-related fMRI study. *Neuroimage* 20: 1086-95.
- Knecht S, Breitenstein C, Bushuven S, Wailke S, Kamping S, Floel A, Zwitserlood P, Ringelstein EB (2004). Levodopa: faster and better word learning in normal humans. *Ann Neurol* 56: 20-26.
- Knutson B, Cooper JC (2005). Functional magnetic resonance imaging of reward prediction. *Curr Opin Neurol* 18: 411-7.
- Knutson B, Fong GW, Adams CM, Varner JL, Hommer D (2001). Dissociation of reward anticipation and outcome with event-related fMRI. *Neuroreport* 12: 3683-7.
- Knutson B, Taylor J, Kaufman M, Peterson R, Glover G (2005). Distributed neural representation of expected value. *J Neurosci* 25: 4806-12.
- Koepp MJ, Gunn RN, Lawrence AD, Cunningham VJ, Dagher A, Jones T, Brooks DJ, Bench CJ, Grasby PM (1998). Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature* 393: 266-8.
- Koob GF, Swerdlow NR (1988). The functional output of the mesolimbic dopamine system. *Ann N Y Acad Sci* 537: 216-27.
- Krauel K, Duzel E, Hinrichs H, Santel S, Rellum T, Baving L (2007). Impact of emotional salience on episodic memory in attention-deficit/hyperactivity disorder: a functional magnetic resonance imaging study. *Biol Psychiatry* 61: 1370-9.
- Krause J, Dresel SH, Krause KH, La Fougere C, Zill P, Ackenheil M (2006). Striatal dopamine transporter availability and DAT-1 gene in adults with ADHD: no higher DAT availability in patients with homozygosity for the 10-repeat allele. *World J Biol Psychiatry* 7: 152-7.
- Krueger BK (1990). Kinetics and block of dopamine uptake in synaptosomes from rat caudate nucleus. *J Neurochem* 55: 260-7.
- Laakso A, Pohjalainen T, Bergman J, Kajander J, Haaparanta M, Solin O, Syvalahti E, Hietala J (2005). The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene is associated with increased activity of striatal L-amino acid decarboxylase in healthy subjects. *Pharmacogenet Genomics* 15: 387-91.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.
- Laine TP, Ahonen A, Rasanen P, Pohjalainen T, Tiihonen J, Hietala J (2001). The A1 allele of the D2 dopamine receptor gene is associated with high dopamine transporter density in detoxified alcoholics. *Alcohol Alcohol* 36: 262-5.
- Lee AC, Robbins TW, Owen AM (2000). Episodic memory meets working memory in the frontal lobe: functional neuroimaging studies of encoding and retrieval. *Crit Rev Neurobiol* 14: 165-197.
- Lemke MR, Reiff J (2001). Therapie der Depression bei Parkinson-Patienten. *Psychotherapeut* 4: 145-8.
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-31.
- Li S, Cullen WK, Anwyl R, Rowan MJ (2003). Dopamine-dependent facilitation of LTP induction in hippocampal CA1 by exposure to spatial novelty. *Nat Neurosci* 6: 526-531.
- Li SC, Lindenberger U, Sikstrom S (2001). Aging cognition: from neuromodulation to representation. *Trends Cogn Sci* 5: 479-486.
- Li SC, Brehmer Y, Shing YL, Werkle-Bergner M, Lindenberger U (2006). Neuromodulation of associative and organizational plasticity across the life span: empirical evidence and neurocomputational modeling. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 775-90.

- Lisman JE, Grace AA (2005). The hippocampal-VTA loop: controlling the entry of information into long-term memory. *Neuron* 46: 703-713.
- Lisman JE, Otmakhova NA (2001). Storage, recall, and novelty detection of sequences by the hippocampus: elaborating on the SOCRATIC model to account for normal and aberrant effects of dopamine. *Hippocampus* 11: 551-568.
- Logothetis NK, Pauls J, Augath M, Trinath T, Oeltermann A (2001). Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature* 412: 150-157.
- Lotta T, Vidgren J, Tilgmann C, Ulmanen I, Melen K, Julkunen I, Taskinen J (1995). Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34: 4202-4210.
- Marschner A, Mell T, Wartenburger I, Villringer A, Reischies FM, Heekeren HR (2005). Reward-based decision-making and aging. *Brain Res Bull* 67: 382-90.
- Martinez D, Gelernter J, Abi-Dargham A, van Dyck CH, Kegeles L, Innis RB, Laruelle M (2001). The variable number of tandem repeats polymorphism of the dopamine transporter gene is not associated with significant change in dopamine transporter phenotype in humans. *Neuropsychopharmacology* 24: 553-60.
- Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR (2003). Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116: 127-137.
- Mattay VS, Tessitore A, Callicott JH, Bertolino A, Goldberg TE, Chase TN, Hyde TM, Weinberger DR (2002). Dopaminergic modulation of cortical function in patients with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 51: 156-164.
- Mattay VS, Goldberg TE, Fera F, Hariri AR, Tessitore A, Egan MF, Kolachana B, Callicott JH, Weinberger DR (2003). Catechol O-methyltransferase val158-met genotype and individual variation in the brain response to amphetamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 6186-91.
- Mazei MS, Pluto CP, Kirkbride B, Pehek EA (2002). Effects of catecholamine uptake blockers in the caudate-putamen and subregions of the medial prefrontal cortex of the rat. *Brain Res* 936: 58-67.
- McClure SM, York MK, Montague PR (2004). The neural substrates of reward processing in humans: the modern role of FMRI. *Neuroscientist* 10: 260-8.
- McGinty JF (1999). Regulation of neurotransmitter interactions in the ventral striatum. *Ann N Y Acad Sci* 877: 129-39.
- Meador-Woodruff JH, Grandy DK, Van Tol HH, Damask SP, Little KY, Civelli O, Watson SJ Jr (1994). Dopamine receptor gene expression in the human medial temporal lobe. *Neuropsychopharmacology* 10: 239-48.
- Mell T, Heekeren HR, Marschner A, Wartenburger I, Villringer A, Reischies FM (2005). Effect of aging on stimulus-reward association learning. *Neuropsychologia* 43: 554-63.
- Menon V, Levitin DJ (2005). The rewards of music listening: response and physiological connectivity of the mesolimbic system. *Neuroimage* 28: 175-84.
- Meyer-Lindenberg A, Kohn PD, Kolachana B, Kippenhan S, McInerney-Leo A, Nussbaum R, Weinberger DR, Berman KF (2005). Midbrain dopamine and prefrontal function in humans: interaction and modulation by COMT genotype. *Nat Neurosci* 8: 594-596.
- Meyer-Lindenberg A, Nichols T, Callicott JH, Ding J, Kolachana B, Buckholtz J, Mattay VS, Egan M, Weinberger DR (2006). Impact of complex genetic variation in COMT on human brain function. *Mol Psychiatry* 11: 867-77, 797.
- Mill J, Asherson P, Browes C, D'Souza U, Craig I (2002). Expression of the dopamine transporter gene is regulated by the 3' UTR VNTR: Evidence from brain and lymphocytes using quantitative RT-PCR. *Am J Med Genet* 114: 975-979.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K

- (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3-8.
- Montague PR, Hyman SE, Cohen JD (2004). Computational roles for dopamine in behavioural control. *Nature* 431: 760-7.
- Morrison JH, Foote SL, O'Connor D, Bloom FE (1982). Laminar, tangential and regional organization of the noradrenergic innervation of monkey cortex: dopamine-beta-hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res Bull* 9: 309-319.
- Mozley LH, Gur RC, Mozley PD, Gur RE (2001). Striatal dopamine transporters and cognitive functioning in healthy men and women. *Am J Psychiatry* 158: 1492-1499.
- Mrzljak L, Bergson C, Pappy M, Huff R, Levenson R, Goldman-Rakic PS (1996) Localization of dopamine D4 receptors in GABAergic neurons of the primate brain. *Nature* 381:245-248.
- Munafo M, Clark T, Johnstone E, Murphy M, Walton R (2004). The genetic basis for smoking behavior: a systematic review and meta-analysis. *Nicotine Tob Res* 6: 583-97.
- Munafo MR, Johnstone EC, Welsh KI, Walton RT (2005). Association between the DRD2 gene Taq1A (C32806T) polymorphism and alcohol consumption in social drinkers. *Pharmacogenomics J* 5: 96-101.
- Neville MJ, Johnstone EC, Walton RT (2004). Identification and characterization of ANKK1: a novel kinase gene closely linked to DRD2 on chromosome band 11q23.1. *Hum Mutat* 23: 540-5.
- Nguyen-Legros J, Versaux-Botteri C, Vernier P (1999). Dopamine receptor localization in the mammalian retina. *Mol Neurobiol* 19:181-204.
- Noble EP (2003). D2 dopamine receptor gene in psychiatric and neurologic disorders and its phenotypes. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 116: 103-25.
- Noble EP (2000). Addiction and its reward process through polymorphisms of the D2 dopamine receptor gene: a review. *Eur Psychiatry* 15: 79-89.
- O'Doherty JP, Buchanan TW, Seymour B, Dolan RJ (2006). Predictive neural coding of reward preference involves dissociable responses in human ventral midbrain and ventral striatum. *Neuron* 49: 157-66.
- O'Doherty JP, Dayan P, Friston K, Critchley H, Dolan RJ (2003). Temporal difference models and reward-related learning in the human brain. *Neuron* 38: 329-37.
- Olds J, Milner P (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* 47: 419-427.
- Onn SP, Wang XB, Lin M, Grace AA (2006). Dopamine D1 and D4 receptor subtypes differentially modulate recurrent excitatory synapses in prefrontal cortical pyramidal neurons. *Neuropsychopharmacology* 31: 318-38.
- Otmakhova NA, Lisman JE (1996). D1/D5 dopamine receptor activation increases the magnitude of early long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 16: 7478-7486.
- Otten LJ, Henson RN, Rugg MD (2002). State-related and item-related neural correlates of successful memory encoding. *Nat Neurosci* 5: 1339-1344.
- Paller KA, Kutas M, Mayes AR (1987). Neural correlates of encoding in an incidental learning paradigm. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 67: 360-71.
- Pappata S, Dehaene S, Poline JB, Gregoire MC, Jobert A, Delforge J, et al. (2002). In vivo detection of striatal dopamine release during reward: a PET study with [(11)C]raclopride and a single dynamic scan approach. *Neuroimage* 16: 1015-27.
- Pezawas L, Meyer-Lindenberg A, Drabant EM, Verchinski BA, Munoz KE, Kolachana BS, Egan MF, Mattay VS, Hariri AR, Weinberger DR (2005). 5-HTTLPR polymorphism impacts human cingulate-amygdala interactions: a genetic susceptibility mechanism for depression. *Nat Neurosci* 8: 828-34.
- Poewe W (1993). Clinical features, diagnosis, and imaging of parkinsonian syndromes. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 6: 333-8.

- Pohjalainen T, Rinne JO, Nagren K, Lehtikainen P, Anttila K, Syvalahti EK, Hietala J (1998). The A1 allele of the human D2 dopamine receptor gene predicts low D2 receptor availability in healthy volunteers. *Mol Psychiatry* 3: 256-60.
- Rahman S, McBride WJ (2001). D1-D2 dopamine receptor interaction within the nucleus accumbens mediates long-loop negative feedback to the ventral tegmental area (VTA). *J Neurochem* 77: 1248-55.
- Ranganath, C., Rainer, G. (2003). Neural mechanisms for detecting and remembering novel events. *Nat Rev Neurosci* 4: 193-202.
- Rashid AJ, So CH, Kong MM, Furtak T, El-Ghundi M, Cheng R, O'Dowd BF, George SR (2007). D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 654-9.
- Redgrave P, Gurney K (2006). The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? *Nat Rev Neurosci* 7: 967-75.
- Reenilä I, Mannistö PT (2001). Catecholamine metabolism in the brain by membrane-bound and soluble catechol-o-methyltransferase (COMT) estimated by enzyme kinetic values. *Med Hypotheses* 57: 628-32.
- Retz W, Rosler M, Supprian T, Retz-Junginger P, Thome J (2003). Dopamine D3 receptor gene polymorphism and violent behavior: relation to impulsiveness and ADHD-related psychopathology. *J Neural Transm* 110: 561-72.
- Richardson-Klavehn A, Gardiner JM (1996). Cross-modality priming in stem completion reflects conscious memory, but not voluntary memory. *Psychonom Bull Rev* 3: 238-244.
- Richardson-Klavehn A, Gardiner JM (1998). Depth-of-processing effects on priming in stem completion: tests of the voluntary-contamination, conceptual-processing, and lexical-processing hypotheses. *J Exp Psychol Learn Mem Cogn* 24: 593-609.
- Riepe MW, Kassubek J, Tracik F, Ebersbach G (2006). Screening for cognitive impairment in Parkinson's disease--which marker relates to disease severity? *J Neural Transm* 113: 1463-8.
- Rossion, B., Pourtois, G. Revisiting Snodgrass and Vanderwart's object pictorial set: the role of surface detail in basic level object recognition. *Perception* 2004; 33: 217-36.
- Rosenblum WI (1997). Histopathologic clues to the pathways of neuronal death following ischemia/hypoxia. *J Neurotrauma* 14: 313-26.
- Rowe J, Stephan KE, Friston K, Frackowiak R, Lees A, Passingham R (2002). Attention to action in Parkinson's disease: impaired effective connectivity among frontal cortical regions. *Brain* 125: 276-89.
- Ruskin DN, Bergstrom DA, Kaneoke Y, Patel BN, Twery MJ, Walters JR (1999). Multisecond oscillations in firing rate in the basal ganglia: robust modulation by dopamine receptor activation and anesthesia. *J Neurophysiol* 81: 2046-55.
- Salinovich O, Montelaro RC (1986). Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156: 341-7.
- Samson Y, Wu JJ, Friedman AH, Davis JN (1990). Catecholaminergic innervation of the hippocampus in the cynomolgus monkey. *J Comp Neurol* 298: 250-63.
- Schoenfeld MA, Tempelmann C, Gaul C, Kuhnel GR, Duzel E, Hopf JM, Feistner H, Zierz S, Heinze HJ, Vielhaber S (2005). Functional motor compensation in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 252: 944-52.
- Schott BH, Henson RN, Richardson-Klavehn R, Becker C, Thoma V, Heinze HJ, Düzel E (2005). Redefining implicit and explicit memory: The functional neuroanatomy of priming, remembering and control of retrieval. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1257-1262.
- Schott B, Richardson-Klavehn A, Heinze HJ, Düzel E (2002). Perceptual priming versus explicit memory: dissociable neural correlates at encoding. *J Cogn Neurosci* 14: 578-92.
- Schott BH, Richardson-Klavehn A, Henson RN, Becker C, Heinze HJ, Düzel E (2006). Neuroanatomical dissociation of encoding processes related to priming and explicit memory. *Journal of Neuroscience* 26: 792-800.

- Schott BH, Sellner DB, Lauer CJ, Habib R, Frey JU, Guderian S, Heinze HJ, Düzel E (2004). Activation of midbrain structures by associative novelty and the formation of explicit memory in humans. *Learn Mem* 11: 383-387.
- Schröder N, O'Dell SJ, Marshall JF (2003). Neurotoxic methamphetamine regimen severely impairs recognition memory in rats. *Synapse* 49: 89-96.
- Schultz W (1997). Dopamine neurons and their role in reward mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 7: 191-7.
- Schultz W, Dayan P, Montague PR (1997). A neural substrate of prediction and reward. *Science* 275: 1593-9.
- Schultz W (1998). Predictive reward signal of dopamine neurons. *J Neurophysiol* 80: 1-27.
- Schultz W (2002). Getting formal with dopamine and reward. *Neuron* 36: 241-263.
- Schultz W (2004). Neural coding of basic reward terms of animal learning theory, game theory, microeconomics and behavioural ecology. *Curr Opin Neurobiol* 14: 139-47.
- Scoville WB, Milner B (1957). Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 20: 11-21.
- Seamans JK, Yang CR (2004). The principal features and mechanisms of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Prog Neurobiol* 74: 1-58.
- Seeman P, Wilson A, Gmeiner P, Kapur S (2006). Dopamine D2 and D3 receptors in human putamen, caudate nucleus, and globus pallidus. *Synapse* 60: 205-11.
- Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D (2006). Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets* 7: 1659-69.
- Shaffer JP (1995). Multiple Hypothesis Testing. *Ann Rev Psychol* 46: 561-584.
- Shen KZ, Johnson SW (2000). Presynaptic dopamine D2 and muscarine M3 receptors inhibit excitatory and inhibitory transmission to rat subthalamic neurones in vitro. *J Physiol* 525 Pt 2: 331-41.
- Shiba M, Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Peterson BJ, Ahlskog JE, Schaid DJ, Rocca WA (2000). Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord* 15: 669-77.
- Siciliano R, Fornai F, Bonaccorsi I, Domenici L, Bagnoli P (1999). Cholinergic and noradrenergic afferents influence the functional properties of the postnatal visual cortex in rats. *Vis Neurosci* 16: 1015-1028.
- Skinner BF (1938). *The behavior of organisms*. New York, Appleton-Century-Crofts.
- Smolka MN, Schumann G, Wrase J, Grusser SM, Flor H, Mann K, Braus DF, Goldman D, Buchel C, Heinz A (2005). Catechol-O-methyltransferase val158met genotype affects processing of emotional stimuli in the amygdala and prefrontal cortex. *J Neurosci* 25: 836-42.
- Squire LR, Stark CE, Clark RE (2004). The medial temporal lobe. *Annu Rev Neurosci* 27: 279-306.
- Stolwyk RJ, Charlton JL, Triggs TJ, Iansek R, Bradshaw JL (2006). Neuropsychological function and driving ability in people with Parkinson's disease. *J Clin Exp Neuropsychol* 28: 898-913.
- Sturm V, Lenartz D, Koulousakis A, Treuer H, Herholz K, Klein JC, Klosterkötter J (2003). The nucleus accumbens: a target for deep brain stimulation in obsessive-compulsive- and anxiety-disorders. *J Chem Neuroanat* 26: 293-9.
- Talairach J, Tournoux P (1988). *Co-planar Stereotaxic Atlas of The Human Brain*. New York: Thieme Medical.
- Tanda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G (1997). Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* 9: 2077-85.
- Tharin S, Golby A (2007). Functional brain mapping and its applications to neurosurgery. *Neurosurgery* 60 Suppl 2: 185-201.
- Thompson J, Thomas N, Singleton A, Piggott M, Lloyd S, Perry EK, Morris CM, Perry RH, Ferrier IN, Court JA (1997). D2 dopamine receptor gene (DRD2) Taq1 A polymorphism: reduced

- dopamine D2 receptor binding in the human striatum associated with the A1 allele. *Pharmacogenetics* 7: 479-84.
- Tisserand DJ, van Boxtel MP, Pruessner JC, Hofman P, Evans AC, Jolles J (2004). A voxel-based morphometric study to determine individual differences in gray matter density associated with age and cognitive change over time. *Cereb Cortex* 14: 966-73.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4.
- Tsien JZ, Huerta PT, Tonegawa S (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* 87: 1327-38.
- Tulving, E. (1972). Episodic and semantic memory. In: *Organization of Memory*, E. Tulving und W. Donaldson, eds., pp. 381-403. New York: Academic Press.
- Tulving, E. (1985). Memory and consciousness. *Canadian Psychology* 26: 1-12.
- Tulving, E., Markowitsch, H.J., Craik, F.E., Habib, R., Houle, S. (1996). Novelty and familiarity activations in PET studies of memory encoding and retrieval. *Cereb Cortex* 6: 71-79.
- Tulving E, Habib R, Nyberg L, Lepage M, McIntosh AR (1999). Positron emission tomography correlations in and beyond medial temporal lobes. *Hippocampus* 9: 71-82.
- Tulving E (2002). Episodic memory: from mind to brain. *Annu Rev Psychol* 53: 1-25.
- Tunbridge EM, Harrison PJ, Weinberger DR (2006). Catechol-o-methyltransferase, cognition, and psychosis: Val158Met and beyond. *Biol Psychiatry* 60: 141-51.
- Tunbridge EM, Bannerman DM, Sharp T, Harrison PJ (2004). Catechol-o-methyltransferase inhibition improves set-shifting performance and elevates stimulated dopamine release in the rat prefrontal cortex. *J Neurosci* 24: 5331-5.
- Ulmanen I, Peranen J, Tenhunen J, Tilgmann C, Karhunen T, Panula P, Bernasconi L, Aubry JP, Lundstrom K (1997). Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur J Biochem* 243: 452-9.
- VanNess SH, Owens MJ, Kilts CD (2005). The variable number of tandem repeats element in DAT1 regulates in vitro dopamine transporter density. *BMC Genet* 6: 55.
- van Oostrom I, Dollfus S, Brazo P, Abadie P, Halbecq I, They S, Marie RM (2003). Verbal learning and memory in schizophrenic and Parkinson's disease patients. *Psychiatry Res* 117: 25-34.
- Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M (1997). Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory. *Science* 277: 376-380.
- Verney C, Baulac M, Berger B, Alvarez C, Vigny A, Helle KB (1985). Morphological evidence for a dopaminergic terminal field in the hippocampal formation of young and adult rat. *Neuroscience* 14: 1039-52.
- Vinogradova OS (2001). Hippocampus as comparator: role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information. *Hippocampus* 11: 578-598.
- Volkow ND, Gur RC, Wang GJ, Fowler JS, Moberg PJ, Ding YS, et al. (1998a). Association between decline in brain dopamine activity with age and cognitive and motor impairment in healthy individuals. *Am J Psychiatry* 155: 344-9.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Gur RC, Gatley J, et al. (1998b). Parallel loss of presynaptic and postsynaptic dopamine markers in normal aging. *Ann Neurol* 44: 143-7.
- Wagner AD, Schacter DL, Rotte M, Koutstaal W, Maril A, Dale AM, Rosen BR, Buckner RL (1998). Building memories: remembering and forgetting of verbal experiences as predicted by brain activity. *Science* 281: 1188-1191.
- Wan H, Aggleton JP, Brown MW (1999). Different contributions of the hippocampus and perirhinal cortex to recognition memory. *J Neurosci* 19:1142-148.
- Wang X, Zhong P, Yan Z (2002). Dopamine D4 receptors modulate GABAergic signaling in pyramidal neurons of prefrontal cortex. *J Neurosci* 22: 9185-93.

- Walter U, Niehaus L, Probst T, Benecke R, Meyer BU, Dressler D (2003). Brain parenchyma sonography discriminates Parkinson's disease and atypical parkinsonian syndromes. *Neurology* 60: 74-7.
- Wayment HK, Schenk JO, Sorg BA (2001). Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. *J Neurosci* 21: 35-44.
- Weinberger DR, Egan MF, Bertolino A, Callicott JH, Mattay VS, Lipska BK, Berman KF, Goldberg TE (2001). Prefrontal neurons and the genetics of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 50: 825-44.
- Williams D, Tijssen M, Van Bruggen G, Bosch A, Insola A, Di Lazzaro V, et al. (2002). Dopamine-dependent changes in the functional connectivity between basal ganglia and cerebral cortex in humans. *Brain* 125: 1558-69.
- Winterer G, Musso F, Vucurevic G, Stoeter P, Konrad A, Seker B, Gallinat J, Dahmen N, Weinberger DR (2006). COMT genotype predicts BOLD signal and noise characteristics in prefrontal circuits. *Neuroimage* 32: 1722-32.
- Wittmann BC, Schott BH, Guderian S, Frey JU, Heinze HJ, Duzel E (2005). Reward-related FMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. *Neuron* 45: 459-467.
- Wu RM, Cheng CW, Chen KH, Lu SL, Shan DE, Ho YF, Chern HD (2001). The COMT L allele modifies the association between MAOB polymorphism and PD in Taiwanese. *Neurology* 56: 375-82.
- Xu H, Kellendonk CB, Simpson EH, Keilp JG, Bruder GE, Polan HJ, Kandel ER, Gilliam TC (2007). DRD2 C957T polymorphism interacts with the COMT Val158Met polymorphism in human working memory ability. *Schizophr Res* 90: 104-7.
- Yacubian J, Glascher J, Schroeder K, Sommer T, Braus DF, Büchel C (2006). Dissociable systems for gain- and loss-related value predictions and errors of prediction in the human brain. *J Neurosci* 26: 9530-7.
- Zimprich A, Kraus J, Woltje M, Mayer P, Rauch E, Höllt V (2000). An allelic variation in the human prodynorphin gene promoter alters stimulus-induced expression. *J Neurochem* 74: 472-7.
- Zinkstok JR, de Wilde O, van Amelsvoort TA, Tanck MW, Baas F, Linszen DH (2007). Association between the DTNBP1 gene and intelligence: a case-control study in young patients with schizophrenia and related disorders and unaffected siblings. *Behav Brain Funct* 3: 19.

## 6. Anhang

### 6.1. Vorstudie zu fMRI-Experiment 1

In der Vorstudie wurde überprüft, ob das anterior-mediale Mittelhirn, in dem sich die dopaminergen Neurone der SN/VTA befinden, grundsätzlich durch Hippocampus-abhängige Gedächtnisprozesse aktivierbar ist. Dazu wurde eine bereits durchgeführte fMRI-Studie neu analysiert (Düzel et al., 2003a; Schott et al., 2004), und ein episodisches Enkodierungs-Experiment pilotiert, auf dem das oben beschriebene fMRI-Experiment 1 aufbaute (Schott et al., 2004). Die Studien waren von der Ethik-Kommission der Universität Magdeburg, Medizinische Fakultät, genehmigt worden.

#### 6.1.1. Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns durch Stimulus-Neuheit

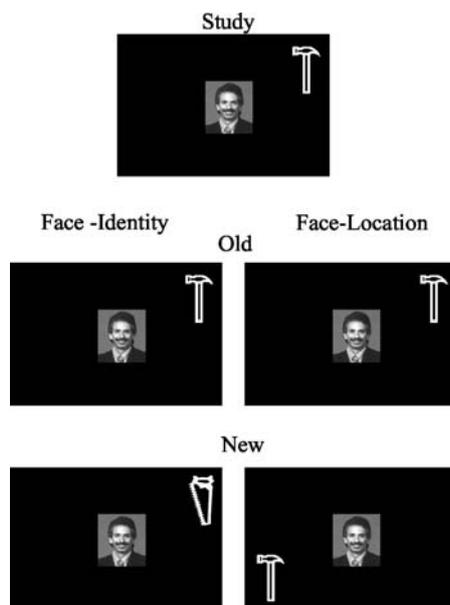
##### 6.1.1.1. Methoden

Die fMRI-Daten für dieses Experiment waren bereits zuvor durch Düzel et al. (2003a) erhoben worden. Im Rahmen der Vorstudie wurde eine Neu-Analyse der Daten mit besonderer Berücksichtigung von Hirnstamm-Aktivierungen durchgeführt. Die Studie war auf dem gleichen GE 1.5 T Signa MRT-System durchgeführt worden, wie die oben beschriebenen fMRI-Experimente 1 und 2. 10 junge, gesunde Probanden nahmen an dem Experiment teil, das an zwei separaten Tagen durchgeführt wurde.

*Paradigma:* An jedem Tag des Experimentes lernten die Probanden die Assoziation von Gesichtern mit Werkzeugen (schematische Zeichnungen von Hammer, Säge, Schraubenzieher, Bohrer; Gesicht-Werkzeug) oder mit der Position von Werkzeugen (Gesicht-Position). Die Reihenfolge der Bedingungen über die beiden Tage wurde über die Probanden gewechselt. In jedem Durchgang wurden den Probanden fünf Assoziationen präsentiert, die sich in zufälliger Reihenfolge fünfmal wiederholten. Jedes Gesicht wurde in der Mitte des Rückprojektionsschirms präsentiert, und die Werkzeuge erschienen einer der vier Eckpositionen. Auf die Lernphase folgte ein assoziativer Wiedererkennungstest, währenddessen die Akquisition der fMRI-Daten erfolgte. Neue Test-Stimuli in der Gesicht-Werkzeug-Aufgabe bestanden aus einem vorher gesehenen Gesicht zusammen mit einem der drei Werkzeuge, mit denen es nicht in der vorangegangenen Lernphase präsentiert worden war, wobei sich das Werkzeug an der Position des ursprünglich präsentierten Werkzeugs befand. In der Gesicht-Positions-Aufgabe wurde das Gesicht bei neuen Stimuli zusammen mit dem ursprünglich präsentierten Werkzeug gezeigt, letzteres befand sich jedoch an einer anderen Position. Die Aufgabe der Probanden war es, alte und neue Stimulus-Konfigurationen zu unterscheiden. Jede Konfiguration wurde für 3 s präsentiert, mit einem Inter-Stimulus-Intervall von 12 s. In jedem Wiedererkennungs-Durchgang wurden jeweils fünf bekannte und fünf neue Konfigurationen präsentiert.

*MR-Bildakquisition und Datenanalyse:* Jeder funktionelle Durchlauf bestand aus 54 Ganzkopf-Volumen [T2\*-gewichtete EPis, TR=3.2 s, TE=40 ms, 30 Schichten à 64 x 64 Voxel, Schichtdicke = 6 mm (5 mm + 1 mm gap), orthogonal zur Hippocampus-Achsem, Voxelgröße = 3.13 x 3.13 x 6 mm; siehe Düzel et al., 2003a). Von jedem Probanden wurden sieben Studien- und Testdurchgänge akquiriert (von einem Probanden waren nur sechs Durchgänge auswertbar).

Die Datenanalyse wurde mit SPM99 durchgeführt. Statistical modeling was carried out using a two-stage mixed effects model. Die Auswertung durch ein zweistufiges Mixed-Effects-Modell erfolgte wie für fMRI-Experiment 1 und 2 beschrieben. Aufgrund der *a priori*-Hypothese zur Rolle des Hippocampus und des Mittelhirns bei associativer Neuheitserkennung, wurde ein Signifikanzniveau von  $p < .01$  (unkorrigiert) gewählt, das twas über dem Signifikanzniveau in der ursprünglichen Publikation der Daten lag (Düzel et al. 2003a).



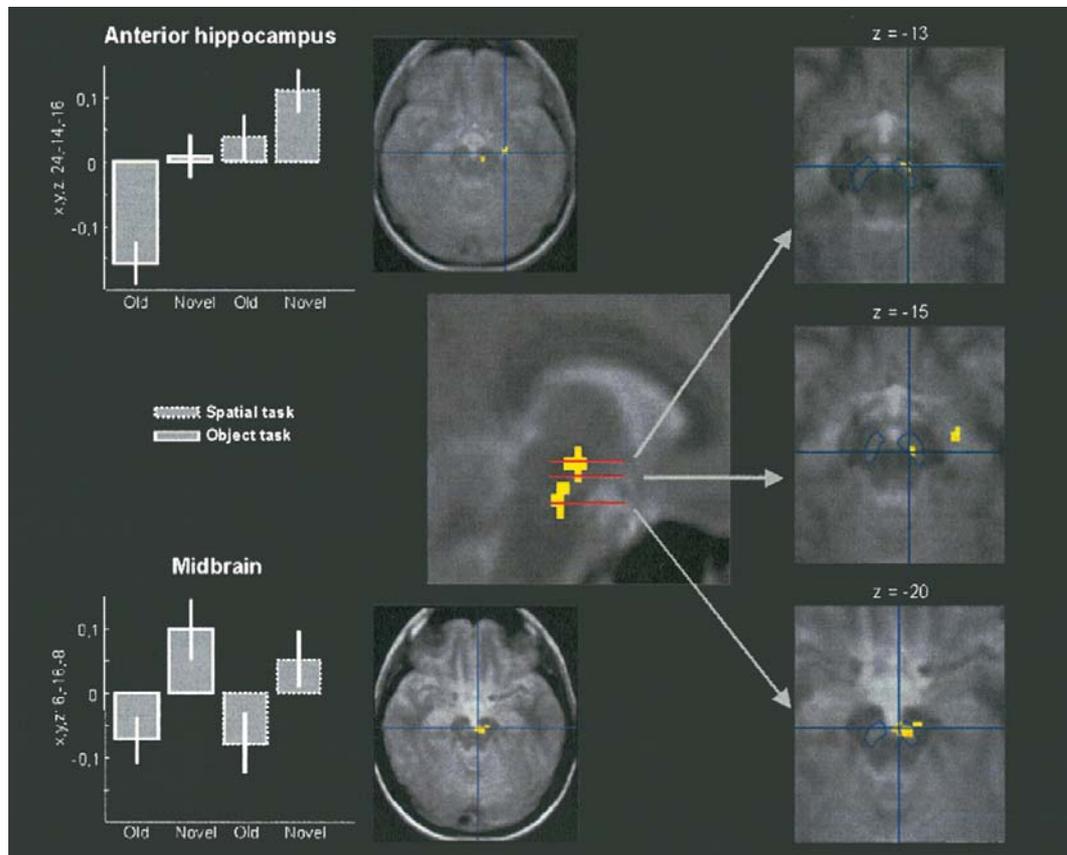
**Abb. 6.1: Paradigma für Experiment 1 der Vorstudie.** In der Lernphase wurden den Probanden ein Gesicht in der Mitte des Bildschirms zusammen mit einem Objekt (eines von 4 Werkzeugen) in einer der vier Eckpositionen präsentiert. In der Gesichts-Werkzeug-Bedingung („face-identity“) sollten die Probanden die Assoziation zwischen dem Gesicht und der Art des Werkzeugs lernen. In der Gesicht-Positions-Bedingung („face-location“) lernten sie die Assoziation zwischen dem Gesicht und der räumlichen Position des Objektes. Jedes Bild wurde in der Studienphase fünfmal wiederholt. In der Testphase wurden den Probanden die ursprünglichen Konfigurationen im Wechsel mit neuen Konfigurationen der bekannten Stimuli gezeigt. In der Gesicht-Werkzeug-Bedingung bestanden neue Stimuli aus den bekannten Gesichtern, die mit einem anderen Werkzeug gezeigt wurden. In der Gesicht-Positions-Bedingung bestanden neue Konfigurationen aus bekannten Gesichtern mit den ursprünglich präsentierten Werkzeugen in einer neuen Position.

### 6.1.1.2. Ergebnisse

In beiden Bedingungen wurden 90% der alten und neuen Konfigurationen korrekt erkannt, und es fand sich kein signifikanter Reaktionszeitunterschied zwischen korrekt klassifizierten alten (1820.34 ms) und neuen (1864.25 msec) Stimulus-Konfigurationen und keine Interaktion zwischen Aufgabe und Wiedererkennungsrate.

Die Neu-Analyse der fMRI-Ergebnisse von Düzel et al. (2003a) erbrachte zusätzliche Informationen über Aktivierungen im Bereich des Hippocampus und des Hirnstamms, die in Abb. 6.1. zusammengefasst sind. In beiden Aufgaben zeigten neue im Vergleich zu bekannten Konfigurationen, eine signifikante Aktivierung des rechten anterioren Hippocampus ( $x, y, z = 24, -14, -16$ ), die in der räumlichen Bedingung (Gesicht-Position) im

Vergleich zur nicht-räumlichen Bedingung (Gesicht-Werkzeug) stärker ausgeprägt war. Mittelhirn-Strukturen zeigten ebenfalls eine verstärkte Aktivierung für neue im Vergleich zu bekannten Stimulus-Konfigurationen, welche jedoch, anders als die hippocampale Aktivierung, keinen Unterschied zwischen der räumlichen und nicht-räumlichen Bedingung aufwies.



**Abb. 6.2: Aktivierung des medialen Mittelhirns bei assoziativer Neuheitsdetektion.** Das Bild zeigt Regionen im Mesencephalon, in denen stärkere hämodynamische Antworten für neue im Vergleich zu alten Stimulus-Konfigurationen beobachtet wurden, auf Magnetisierungs-Transfer- (MT-) Bilder superimponiert. Die Substantia nigra wurde segmentiert (blau). Bar-Plots zeigen die Kontraste der Parameter-Schätzungen (für die Peak-Voxel), getrennt für alte und neue Konfigurationen und für die räumliche und nicht-räumliche Bedingung. Aktivierungen des Mittelhirns sind, ebenso wie die des anterioren Hippocampus stärker für neue im Vergleich zu alten Konfigurationen, zeigen jedoch im Gegensatz zu diesen keine Modulation durch die Aufgabe (räumlich vs. nicht räumlich). Die funktionellen Aktivierungsbilder wurden auf MT-Bilder superimponiert, um die SN-Aktivierung anatomisch zu überprüfen (s. o.). x,y,z: Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Inst.). Bild übernommen aus Schott et al., *Learning & Memory*, 2004.

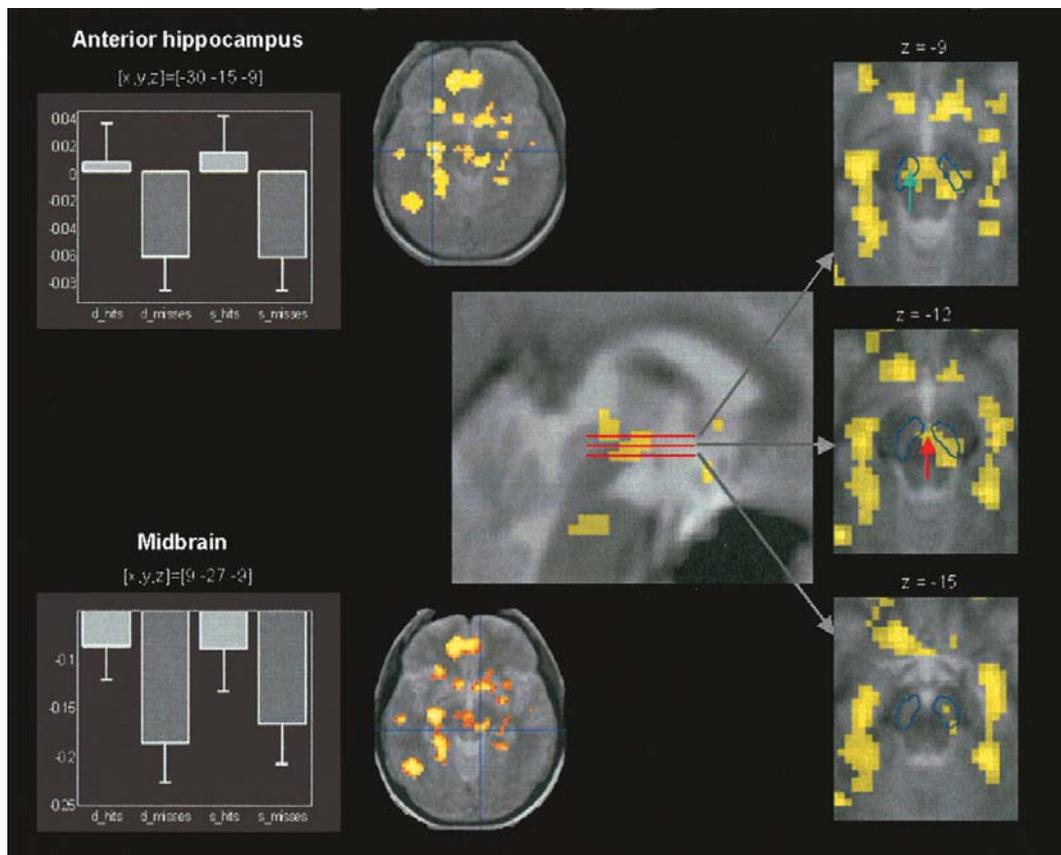
## 6.1.2. Aktivierung des dopaminergen Mittelhirns bei episodischer Gedächtnisbildung

### 6.1.2.1. Methoden

16 junge (Alter 18 – 31, 11 weiblich, alle Rechtshänder und deutsche Muttersprachler), gesunde Probanden nahmen an der Studie teil. Das Paradigma, das im zweiten Teil der Vorstudie angewandt wurde, entspricht dem im Methodenteil zu fMRI-Experiment 1 beschriebenen (siehe 2.1.1.2.). Die Akquisition und Analyse der fMRI-Daten erfolgte wie für fMRI-Experiment 1 beschrieben, allerdings ohne Konnektivitätsanalyse und

Zwischengruppen-Vergleiche (siehe 2.1.1.3. – 2.1.1.4.). Das Signifikanz-Niveau wurde auf  $p < .0001$  (unkorrigiert) festgelegt, mit mindestens 24 zusammenhängend aktivierten Voxeln.

### 6.1.2.2. Ergebnisse



**Abb. 6.3: Aktivierung des medialen Mittelhirns bei episodischer Gedächtnisbildung.** Das Bild zeigt Regionen im Mesencephalon, in denen stärkere hämodynamische Antworten für neue im Vergleich zu alten Stimulus-Konfigurationen beobachtet wurden, auf Magnetisierungs-Transfer- (MT-) Bilder superimponiert. Die Substantia nigra wurde segmentiert (blau). Bar-Plots zeigen die Kontraste der Parameter-Schätzwerte (SPM-Betas der Peak-Voxel) für später erinnerte im Vergleich zu später vergessenen Wörtern, aufgetrennt nach tiefer und oberflächlicher Verarbeitung. Aktivierungen des anterioren Hippocampus und des Mittelhirns sind signifikant höher für später erinnerte Wörter, unabhängig von der Verarbeitungstiefe.  $x,y,z$ : Voxel-Koordinaten im MNI-Koordinatensystem (Montreal Neurological Inst.). Bild übernommen aus Schott et al., *Learning & Memory*, 2004.

Wie im gesamten Experiment 1 (siehe 2.1.1.) fand sich auch in der initial untersuchten Kohorte ein signifikanter LOP-Effekt; die Erinnerungsrate war höher tief verarbeitete Wörter (32.8%; SD = 9.36) im Vergleich zu oberflächlich verarbeiteten (25.0%; SD = 8.57), und dieser Unterschied war signifikant [ $F(1,15) = 64.2, P < .0001$ ; zweifache ANOVA für Messwiederholungen]. Die fMRI-Korrelate tiefer im Vergleich zu oberflächlicher Verarbeitung entsprachen den für die Gesamtkohorte beschriebenen (siehe 3.2.2.1.). Die Verarbeitungstiefe hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung des medialen Temporallappens oder des Mittelhirns. Dagegen waren später erinnerte Wörter unabhängig von LOP mit verstärkter Aktivierung des bilateralen anterioren Hippocampus assoziiert (Abb. 6.2) und zeigten darüber hinaus eine robuste Aktivierung des anterior-medialen Mittelhirns (Substantia nigra, VTA).

## 6.2. Schriftliche Probanden-Instruktionen für fMRI-Experiment 2

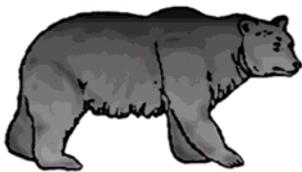
Beispielhaft sind die Instruktionen für die Bedingung „lebend = belohnt“ und Antwort mit der rechten Hand angegeben.

Im folgenden Versuch geht es um die Wirkung von Belohnung auf das Gehirn. In der Hälfte der Versuchsdurchläufe können Sie durch eine schnelle und richtige Reaktion auf eine gezeigte Zahl Geld gewinnen (50 Cent) oder verlieren (20 Cent), in der anderen Hälfte der Durchläufe sollen Sie sich ebenfalls um eine schnelle und richtige Reaktion bemühen, erhalten aber kein Geld.

Zu Beginn jedes Versuchsdurchgangs werden Ihnen Bilder gezeigt, von denen es abhängt, ob der jeweilige Versuchsdurchgang mit Geld belohnt wird oder nicht.

Ein Bild sieht beispielsweise so aus:

oder so:



Handelt es sich um ein Lebewesen oder Teile davon (z. B. einen Finger oder Obst), ist der Durchgang belohnt, d.h. Sie erhalten für eine richtige Antwort Geld. Ist auf dem Bild ein unbelebtes Objekt zu sehen (beispielsweise ein Buch), ist der Durchgang nicht belohnt und auf Ihrem Konto tut sich nichts.

Wenn das Bild erscheint, sollen Sie durch Tastendruck entscheiden, ob es sich um einen belohnten oder unbelohnten Versuchsdurchgang handelt. **Drücken Sie für „unbelohnt“ bitte die linke Taste, für „belohnt“ die rechte Taste.**

Anschließend folgt eine kurze Pause. Dann blinkt kurz eine Zahl (1, 4, 6 oder 9) auf. Sie sollen entscheiden, ob die Zahl unter 5 oder über 5 liegt. **Drücken Sie für „unter 5“ bitte die linke Taste, für „über 5“ die rechte Taste.** Für die Bewertung Ihrer Reaktion ist auch die Geschwindigkeit wichtig. Eine Entscheidung wird also dann als „richtig“ gewertet, wenn Sie innerhalb einer festgesetzten Zeit die richtige Taste drücken. Drücken Sie die falsche Taste oder war die Entscheidung zu langsam, wird es als „falsch“ gewertet.

Sie erhalten bei den „belohnten“ Versuchsdurchgängen für eine „richtige“ Entscheidung 50 Cent gutgeschrieben, für eine „falsche“ Entscheidung werden 20 Cent abgezogen. Sie erhalten jeweils ein Feedback, das Sie informiert, wie Ihre Reaktion gewertet wurde. Ein grüner Pfeil nach oben steht für „richtig, 50 Cent plus“, ein roter Pfeil nach unten für „falsch, 20 Cent minus“. Bitte versuchen Sie nicht, im Verlauf des Versuchs mitzurechnen, wie hoch Ihr Kontostand ist. Der Versuch und die Summen sind so gewählt, dass Sie am Ende des Versuchs auf jeden Fall eine zufriedenstellende Summe erhalten werden.

Bei „unbelohnten“ Versuchsdurchgängen bekommen Sie ein neutrales Feedback (ein Fragezeichen „?“) unabhängig davon, ob der Durchgang als „richtig“ oder „falsch“ gewertet wird.

Nach dem Feedback folgt eine kurze Pause, bevor der nächste Versuchsdurchgang mit dem nächsten Bild beginnt.

## 6.3. Weitere Erläuterungen zu den verwendeten Methoden

### 6.3.1. Formeln

Allgemeines lineares Modell

$$Y_i = \beta_{i1}x_{i1} + \beta_{i2}x_{i2} + \beta_{i3}x_{i3} + \dots + \beta_{in}x_{in} + \varepsilon_i$$

;  $Y_i$ : beobachteter Wert  
 $x_i$ : erklärende Variable (1-n)  
 $\beta$ : Parametergewicht  
 $\varepsilon_i$ : Fehlerterm

$\delta$ -Funktion

$$\delta(x) = \begin{cases} \infty & ; x = x_0 \\ 0 & ; x \neq x_0 \end{cases}$$

Arcus tangens hyperbolicus

$$\operatorname{arctanh} x = \frac{1}{2} \ln \frac{1+x}{1-x} \quad ; -1 < x < 1$$

### 6.3.2. Lösungen und Medien

#### 6.3.2.1. Lösungen und Puffer

Lösung / Puffer	Bestandteile
1 x TAE	0.02 Teile 50 x TAE @ H <sub>2</sub> O dest.
50 x TAE	0.05 M EDTA; 1 M Essigsäure; 2 M Tris-Base
Beladungspuffer für DNA-Gelelektrophorese	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 50 mM EDTA; 30% Glycerin
EtBr-Stammlösung	10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
1 x TBS	0.1 Teile 10 x TAE @ H <sub>2</sub> O dest.
10 x TBS	1.5 M NaCl; 100 mM Tris pH 7.5 @ 1 l H <sub>2</sub> O dest.
TBS-A	0.1 Teile 10 x TBS + 0.025% Na-Azid @ H <sub>2</sub> O dest.
TBS-M	5% Milchpulver @ 1 x TBS
TBS-T	0.1% Tween-20 @ 1 x TBS
1 x Elektrophoresepuffer (TGS)	0.1 Teile 10 x TGS @ H <sub>2</sub> O dest.
10 x Elektrophoresepuffer	1.92 M Glycin; 250 mM Tris-Base; 1% (w/v) SDS
Protein-Probenpuffer	1% SDS; 40% Glycerin; 20% $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,004% Bromphenolblau; 250 mM Tris-HCl, pH 6,8
Western-Blot-Puffer (TGS-Methanol)	192 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,2% (w/v) SDS; 25 mM Tris, pH 8.3
Ponceau-S-Lösung	0.5% Ponceau S <sup>®</sup> ; 1% Essigsäure
Poly-D-Lysin	100 mg Poly-D-Lysin (Sigma) @ 1 l Borsäure 0.15 M (pH 8.4, mit NaOH)

<sup>1</sup>nach Herstellerangaben

### 6.3.2.2. Medien

Medium	Bestandteile
LB-Agar	15g Select Agar (Invitrogen) je 1l LB-Medium <sup>1</sup>
LB-Medium	20g LB-Broth Base (Invitrogen) je 1l H <sub>2</sub> O <sup>1</sup>
SOC-Medium	20 g/l Peptone 140 (Gibco); 5g/l Hefeextrakt (Gibco), 10 mM NaCl; 2.5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose <sup>1</sup>
DMEM +FKS/PS/Gln	500 ml DMEM (Gibco); 50 ml fetales Kälberserum (Hitze-inaktiviert, steril filtriert, Gibco); 5 ml Penicillin/Streptavidin; 5 ml Glutamin 0.2 M
Neurobasal-Medium +B27/PS/Gln	50 ml Neurobasal-Medium (Gibco); 1 ml B27 (Gibco); 0.5 ml Penicillin/Streptavidin; 0.2 ml Glutamin 0.2 M

<sup>1</sup>nach Herstellerangaben

### 6.3.3. Primer und Annealing-Temperaturen

#### 6.3.3.1. Zusätzliche Genotypisierungen

Polymorphismus	f-Primer, r-Primer	T <sub>A</sub>	Restriktionsenzym
5HTT fragment length	<i>STPR-5</i> : GCGGTTGCCGCTCTGAATGC <i>STPR-3</i> : GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC (Hairi et al., 2002)	60	n/a
BDNF Val66Met	<i>gBDNF-5'</i> : GCATCCCGGTGAAAGAAAGCCCTAAC <i>gBDNF-3'</i> : GCCCCTCAGCCTTCTTTTGTGTAAC (O. Stork, persönl. Kommunikation)	60	<b>Eco72I</b> ( <i>PmaCI</i> ) CAC <sup>^</sup> GTG 37°C
DRD3 Ser9Gly	<i>DRD3-Ex1-f</i> : GCTCTATCTCCAACCTCTCACA <i>DRD3-Ex1-r</i> : AAGTCTACTCACCTCCAGGTA (Retz et al., 2003)	55	<b>MisI</b> ( <i>Ball</i> ) TGG <sup>^</sup> CCA 37°C
eNOS Glu298Asp	<i>eNOS-Ex7f</i> : AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA <i>eNOS-Ex7r</i> : CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA (Miyamoto et al., 1998)	55	<b>Eco24I</b> ( <i>BanII</i> ) G(A/G)GC(C/T) <sup>^</sup> C 37°C
MAO-A VNTR	<i>MAOA-VNTR-5</i> : TGCTCCAGAAACATGAGCAC <i>MAOA-VNTR-3</i> : TAGACTTGGGGATCCGACTG (Huang et al., 2004)	55	n/a
MAO-B Intr 13	<i>MAOB-Ex13-f</i> : GGAACCTCTTATACCACAGG <i>MAOB-Ex13-r</i> : GACTGCCAGATTTTCATCCTC (Wu et al., 2001)	54	<b>NmuCI</b> ( <i>Tsp45I</i> ) <sup>^</sup> GT(C/G)AC 37°C

T<sub>A</sub>: Annealing-Temperatur in °C. Restriktionsenzyme sind mit Restriktionsschnittstelle und optimaler Temperatur angegeben. Bei Verwendung von Isoschizomeren (Fermentas) sind die Restriktionsenzyme mit dem jeweiligen Prototyp angegeben.

#### 6.3.3.2. Klonierung und Mutagenese von COMT-GFP-Fusionsproteinen

Arbeitsschritt	f-Primer, r-Primer	T <sub>A</sub>
Klonierung (äußere PCR)	<i>cCOMT-out-f</i> : CCTGCTCAGAGGTGCTTTGAAG <i>cCOMT-out-r</i> : TCAGTACCAGGCTGGGTGAGA	52
Klonierung (innere PCR)	<i>cMB-COMT-f</i> : AAGAATTCAGATGCCGGAGGCCCGCCTCTG <i>cS-COMT-f</i> : AAGAATCCTCATGGGTGACACCAAGGAGCAG <i>cCOMT-r</i> : ATGGATCCGCGGGCCCTGCTTCGCTGCCTGG	58
Mutagenese 51Ala	<i>cCOMT51Ala-f</i> : CAACCTGCTCGCGGGTGACACCAAGG <i>cCOMT51Ala-r</i> : CCTTGGTGTACCCGCGAGCAGGTTG	58
Mutagenese 51Val	<i>cCOMT51Val-f</i> : CAACCTGCTCGTGGGTGACACCAAGG <i>cCOMT51Val-r</i> : CCTTGGTGTACCCACGAGCAGGTTG	58

T<sub>A</sub>: Annealing-Temperatur in °C.

### 6.3.4. Ausführliche Protokolle für Molekularbiologie und Proteinbiochemie

#### 6.3.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Benötigte Puffer / Lösungen: 1x TAE  
DNA-Beladungspuffer  
Ethidiumbromidstammlösung

DNA-Moleküle wurden unter nichtdenaturierenden Bedingungen in Agarosegelen (1 – 4.5%) aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TAE (siehe 6.3.2.1.) unter Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidstammlösung je 200 ml Agaroselösung gelöst, und bei einer Feldstärke von ca. 300 V/m in einer Pufferkammer (1x TAE) aufgetrennt. Visualisierung erfolgte unter UV-Licht mit einem Gel Doc 2000-System (BioRad). Die Überprüfung der Fragmentgrößen erfolgte durch einen zusammen mit den Proben aufgetragenen Nucleotid-Marker (GeneRuler, Fermentas). DNA-Banden, die für Klonierungen eingesetzt wurden, wurden sie mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem Gel-Elutionskit (Marligen) nach dem Protokoll des Herstellers eluiert und wie in 2.3.2.1. weiterverarbeitet.

#### 6.3.4.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Benötigte Puffer und Lösungen: TGS-Elektrophoresepuffer  
Protein-Probenpuffer

Acrylamid-Lösungen für Trenn- und Sammelgele (Ansatz für 12 Gele):

Bestandteil	Trenngel		Sammelgel
	Acrylamid T = 20%	Acrylamid T = 5%	Acrylamid T = 5%
Tris-HCl, pH = 8.8	8.25 ml	8.25 ml	6.00 ml (pH = 6.8)
H <sub>2</sub> O		17.94 ml	7.95 ml
Glycerol 87%	7.5 ml	1.89 ml	5.52 ml
Acrylamidlösung			
- T = 40%	16.5 ml	4.12 ml	
- T = 30%			3.90 ml
EDTA 0.2M	330 µl	330 µl	240 µl
SDS 10%	330 µl	330 µl	240 µl
TEMED	22 µl	22 µl	17.2 µl
Bromphenolblau 0.5%	60 µl		
Phenolrot			10 µl
APS 10%	75 µl	118 µl	137 µl

APS: Ammoniumpersulfat; TEMED: Tetramethylethyldiamin

Zur Auftrennung von Proteingemische anhand des Molekulargewichts wurde die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter vollständig denaturierenden Bedingungen eingesetzt (Laemmli, 1970). Um eine gleichmäßigere Auftrennung schwerer und leichter Proteine zu erreichen, wurden Gradientengele (5 – 20%) eingesetzt, bei denen die Laufgeschwindigkeit mit zunehmender Laufweite abnimmt. Die Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 8 mA (Spannung ca. 500 V). Anschließend erfolgte eine spezifische Visualisierung der Proteine durch Western Blot.

#### 6.3.4.4. Western Blots

Benötigte Puffer und Lösungen: Ponceau-S-Färbelösung  
Western-Blot-Puffer (TGS-Methanol)  
Western-Blot-Puffer

Für die Western-Blot-Analysen wurden die Proteine nach vollständiger elektrophoretischer Auftrennung (6.2.4.3.) vom Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch bei 200 mA (Spannung ca. 500 V) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (Towbin et al., 1979). Nach Beendigung des Protein-Transfers wurde die erfolgreiche Übertragung auf die Membran mit einer Ponceau-Rot-Färbung überprüft (Salinovitch & Montelaro, 1986), und anschließend wurden die freien Proteinbindungsstellen durch zweistündige Inkubation in 1x TBS mit 5% Milchpulver (TBS-M) abgesättigt. Zur immunologischen Detektion der Proteinbanden wurde die Membran zunächst mit dem primären Antikörper (in TBS-A) bei 4°C über Nacht inubiert. Antikörperrückstände und Reste von Na-Azid wurden durch dreimaliges Waschen der Membranen mit TBS-T für je 10 min bei Raumtemperatur entfernt. Die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte für 2 h bei Raumtemperatur, und die Visualisierung von Proteinbanden wurde mit dem ECL-Chemilumineszenz-System (Amersham Biociences) durchgeführt.

#### 6.3.4.5. Diagnostische Präparation von DNA-Plasmiden aus Bakterien

Benötigte Puffer: P1: 50 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 100 mg/ml RNase A; pH 8,0  
P2 : 200 mM NaOH; 1% (w/v) SDS  
P3: 3 M K-Acetat; pH 5,5

Die Präparation von DNA-Plasmiden aus *E. coli* DH5 $\alpha$  erfolgte nach einem Protokoll von Birnboim & Doly (1979) mit geringen Abweichungen.

1. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden 2.5 ml der Kulturen für 30 s bei 12.000 g abzentrifugiert und die Pellets mit dem RNase-haltigen Puffer P1 (250  $\mu$ l) resuspendiert.
2. Die Lyse der Bakterien erfolgte mit dem alkalischen, SDS-haltigen Puffer P2 (ca. 3 – 5 min).
3. Die Neutralisierung erfolgte mit dem sauren Acetat-Puffer P3, gefolgt von einer Zentrifugation (12.000 g, 10 min).
4. Anschließend wurde der klare Überstand mit 550  $\mu$ l Isopropanol gefällt und die ausgefallene Plasmid-DNA durch Zentrifugation (18.000 g, 20 min) pelletiert.
5. Nach Dekantierung des Überstandes wurden die Pellets mit 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und erneut kurz zentrifugiert (18.000 g, 3 min).
6. Die Pellets wurden durch Zentrifugation unter Vakuum getrocknet und in 50  $\mu$ l 10 mM Tris (pH 8.0) aufgenommen (zur Sequenzierung erfolgte die Aufnahme in dest. H<sub>2</sub>O).

#### 6.4. Lebenslauf und Publikationsliste

Name: Björn Hendrik Schott  
Geburtsdatum: 29. 10. 1975  
Geburtsort: Scherzingen, Schweiz  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Dienstliche Anschrift: Leibniz-Institut für Neurobiologie  
Abteilung Verhaltensneurologie  
Brenneckestr. 6  
39118 Magdeburg  
Email: [bschott@neuro2.med.uni-magdeburg.de](mailto:bschott@neuro2.med.uni-magdeburg.de)

#### Ausbildung

Schulbildung: 1982 – 1986: Burgbergschule Überlingen / Bodensee  
1986 – 1995: Gymnasium Überlingen / Bodensee  
Abitur 07/1995  
Notendurchschnitt: 1.1

Studium: Humanmedizin  
10/1995 – 09/1997: Christian-Albrechts-Universität Kiel  
10/1997 – 09/1999, 10/2000 – 11/2002:  
Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
Ärztliche Prüfung 11/2002  
Gesamtnote: 1.66

Klinische Ausbildung: Promotion zum Dr. med. 02/2004:  
Titel: Elektromagnetische Korrelate verbaler  
Wiedererkennung: Anatomische Lokalisierung und Zeit-  
Frequenz-Analyse  
Doktorvater: Prof. Dr. Hans-Jochen Heinze  
Betreuer: Dr. Emrah Düzel,  
Note: *summa cum laude*

Auslandsstudium: 09/1999 – 08/2000:  
Austauschstudient,  
Center for Cognitive Neuroscience, Dartmouth College,  
Hanover, NH, USA  
Betreuer: Robert Fendrich, PhD, Michael S. Gazzaniga, PhD  
10/2001 – 01/2002:  
PJ-Tertial Wahlfach Neurologie,  
Institute of Neurology / National Hospital of Neurology and  
Neurosurgery,  
University College London, London, England

#### Beruflicher Werdegang

11/02 – 05/04: Arzt im Praktikum  
Klinik für Neurologie II, Universität Magdeburg

06/04 – 05/05: Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Assistenzarzt  
Klinik für Neurologie II, Universität Magdeburg

05/03 – 05/07: Gastwissenschaftler  
Abtl. Neurochemie und Molekularbiologie,  
Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg

Seit 06/07: Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Abtl. Verhaltensneurologie  
Leibniz-Institut für Neurobiologie, Magdeburg

## Publikationen

### **Veröffentlichte Originalarbeiten (IF: Impact Factor 2004)**

\*Schott BH, Niehaus L, Wittmann BC, Schütze H, Seidenbecher CI, Heinze HJ, Düzel E (2007). Ageing and early-stage Parkinson's disease affect separable neural mechanisms of mesolimbic reward processing. **Brain** 130(9):2412-2424 (IF: 8.201).

\*Schott BH, Seidenbecher CI, Fenker DB, Lauer CJ, Bunzeck N, Bernstein HG, Tischmeyer W, Gundelfinger ED, Heinze HJ, Düzel E (2006). The dopaminergic midbrain participates in human episodic memory formation: Evidence from genetic imaging. **Journal of Neuroscience** 26(5):1407-1417 (IF: 7.907).

Schott BH, Richardson-Klavehn A, Henson RN, Becker C, Heinze HJ, Düzel E. Neuroanatomical dissociation of encoding processes related to priming and explicit memory (2006). **Journal of Neuroscience** 26(3):792-800 (IF: 7.907).

Lindquist S, Schott BH, Ban M, Compston A, Sawcer S, Sailer M (2005). The BDNF Val66Met polymorphism: implications for susceptibility to multiple sclerosis and severity of disease. **Journal of Neuroimmunology** 167(1-2):183-185 (IF: 2.704).

Fenker DB, Schott BH, Richardson-Klavehn A, Heinze HJ, Düzel E (2005). Recapitulating emotional context: Activity of amygdala, hippocampus and fusiform cortex during recollection and familiarity. **European Journal of Neuroscience** 21(7):1993-1999 (IF: 3.820).

Düzel E, Richardson-Klavehn A, Neufang M, Schott BH, Scholz M, Heinze HJ (2005). Early, partly anticipatory, neural oscillations set the stage for priming. **Neuroimage** 25(3):690-700 (IF: 4.869).

Wittmann BC, Schott BH, Guderian S, Frey JU, Heinze HJ, Düzel E (2005). Reward-related fMRI activation of dopaminergic midbrain is associated with enhanced hippocampus-dependent long-term memory formation. **Neuron** 45(3):459-467 (IF: 14.439).

Schott BH, Henson RN, Richardson-Klavehn R, Becker C, Thoma V, Heinze HJ, Düzel E (2005). Redefining implicit and explicit memory: The functional neuroanatomy of priming, remembering and control of retrieval. **Proc Natl Acad Sci USA** 102(4):1257-1262 (IF: 10.425).

\*Schott BH, Sellner DB, Lauer CJ, Habib R, Frey JU, Guderian S, Heinze HJ, Düzel E (2004). Activation of midbrain structures by novelty and the formation of explicit memories in humans. **Learning & Memory** 11(4):383-387 (IF: 4.694)

Handy TC, Miller MB, Schott B, Shroff NM, Janata P, Van Horn JD, Inati S, Grafton ST, Gazzaniga MS (2004). Visual Imagery and memory – Do retrieval strategies affect what the mind's eye sees? **European Journal of Cognitive Psychology** 16(5):631-652 (IF: 0.640).

Düzel E, Kaufmann J, Guderian S, Szentkuti A, Schott B, Bodammer N, Hopf M, Kanowski M, Tempelmann C, Heinze HJ (2004). Interictal measures of hippocampal diffusion and 1H-MRS metabolic abnormalities in temporal lobe epilepsy provide partially complementary information. **European Journal of Neurology** 11(3):195-205 (IF: 2.225).

Düzel E, Habib R, Schott B, Schoenfeld A, Lobaugh N, McIntosh R, Scholz M, Heinze HJ (2003). A multivariate, spatio-temporal analysis of electromagnetic time frequency data of recognition memory. **Neuroimage** 18(2):185-197 (IF: 4.869).

Schott B, Richardson-Klavehn A, Heinze HJ, Düzel E (2002). Perceptual Priming Versus Explicit Memory: Dissociable Neural Correlates at Encoding. **Journal of Cognitive Neuroscience** 14(4):578-592 (IF: 5.275).

\*Ergebnisse aus diesen Publikationen sind Bestandteil der hier vorliegenden Arbeit.

### ***Ausgewählte Kongressbeiträge***

Primed, but not Remembered: Encoding Activity Leading to Remembering versus Priming as Revealed by Combined EEG/MEG Recordings. Schott B, Richardson-Klavehn A, Düzel E, Hagner T, Heinrich J, Scholz M, Heinze HJ. Cognitive Neuroscience Society Annual Meeting, San Francisco, CA, 2000.

Spatial and temporal mapping of two distinct components of recognition memory in the human inferior temporal lobe. Schott B, Hagner T, Scholz M, Heinze HJ, Düzel E. Human Brain Mapping, Brighton, UK, 2001.

Volition and awareness in memory: Evidence from event-related potentials. Richardson-Klavehn A, Düzel E, Schott B, Heinze HJ, Gardiner JM. Invited keynote address presented in the symposium on Fundamentals and Clinical Applications of Implicit Memory: Remarks After a Decade of Controversies, Babes-Bolyai University, Cluj-Napoca, Romania, 2001.

Genetic variations in the dopaminergic system affect prefrontal cortex activity during memory formation in humans. Schott BH, Seidenbecher CI, Sellner DB, Lauer CJ, Guderian S, Frey JU, Gundelfinger ED, Heinze HJ, Düzel E. XIIth World Congress of Psychiatric Genetics, Dublin, Ireland, 2004.

Reward-related midbrain activation influences memory consolidation. Wittmann B, Schott B, Guderian S, Frey JU, Heinze HJ, Düzel E. Society for Neuroscience, San Diego, CA, 2004.

A dopamine transporter genetic variation affects the response of the human midbrain in episodic memory formation. Schott BH, Seidenbecher CI, Sellner DB, Lauer CJ, Tischmeyer W, Gundelfinger ED, Heinze HJ, Düzel E. 20th Biennial Meeting of the International Society for Neurochemistry, Innsbruck, Austria, 2005.

The COMT Val108/158Met polymorphism affects fronto-hippocampal coupling during episodic memory formation – an index for processing efficiency? Schott BH, Seidenbecher CI, Fenker DB, Lauer CJ, Bunzeck N, Tischmeyer W, Bernstein HG, Gundelfinger ED, Heinze HJ, Düzel E. Cognitive Neuroscience Society Annual Meeting, San Francisco, CA, 2006.

Distinct neural mechanisms underlying altered mesolimbic reward processing in healthy aging and early-stage Parkinson's disease. Schott BH, Niehaus L, Wittmann BC, Schütze H, Seidenbecher CI, Heinze HJ, Düzel E. Cognitive Neuroscience Society Annual Meeting, New York, NY, 2007.

Magdeburg, Oktober 2007

Björn Hendrik Schott