Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung für Neuroradiologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. K. Voigt
Sektion für Experimentelle Kernspinresonanz des zentralen Nervensystems
Leiter: Professor Dr. W. Grodd

Protonenmagnetresonanzspektroskopie bei spinocerebellarer Ataxie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Michael David Drepper
aus
Erlenbach am Main

2007

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Grodd
2. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. I. Mader

Meiner Mutter und meinem Großvater gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Spinocerebellare Ataxie (SCA) 1
1.1.1 Einteilung 1
1.1.2 Klinische Charakteristika 4
1.1.3 Pathogenese 7
1.2 Magnetresonanzbildgebung bei spinocerebellarer Ataxie 9
1.3 Magnetresonanzspektroskopie bei spinocerebellarer Ataxie 11
1.4 Zielsetzung 12
2 Material und Methodik 14
2.1 Grundlagen der Magnetresonanzspektroskopie 14
2.1.1 Entwicklung 14
2.1.2 Chemische Verschiebung 15
2.1.3 Kopplung 17
2.1.4 Lokalisationsverfahren 18
2.1.5 Metaboliten in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie 24
2.1.6 Makromoleküle in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie . 33
2.2 Methoden 38
2.2.1 Ausrüstung 38
2.2.2 Sequenzen 38
2.2.3 Absolute Quantifizierung 41
2.2.4 Segmentierung 46
2.2.5 Statistische Auswertung 51
2.3 Versuchspersonen 57
2.3.1 Patienten 57
2.3.2 Probanden 61
3 Ergebnisse 63
3.1 Metaboliten 63
3.1.1 Untersuchungsregion Pons 63
3.1.2 Untersuchungsregion Cerebellum 66
3.2 Makromoleküle 68

3.2.1 Untersuchungsregion Pons ... 68
3.2.2 Untersuchungsregion Cerebellum ... 69
3.3 Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer ... 69
3.4 Abhängigkeit von der Anzahl der CAG-Repeats ... 70
3.5 Abhängigkeit vom SCA-Subtyp ... 70
3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse ... 70
4 Diskussion ... 71
4.1 Makromoleküle ... 71
4.2 Metaboliten ... 73
4.2.1 Freies Glutamin und Glutamat ... 75
4.2.2 N-Acetylaspartat ... 76
4.2.3 Creatin ... 77
4.2.4 Myoinositol ... 78
4.2.5 Cholinhaltige Verbindungen ... 79
4.2.6 Lactat ... 80
4.3 Abhängigkeit von Erkrankungsdauer, Anzahl der CAG-Repeats und dem SCA-Subtyp ... 81
5 Zusammenfassung ... 83
6 Literaturverzeichnis ... 85
7 Anhang ... 95
7.1 Danksagung ... 95
7.2 Lebenslauf ... 97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 18
Abbildung 2 19
Abbildung 3 20
Abbildung 4 21
Abbildung 5 23
Abbildung 6 24
Abbildung 7 26
Abbildung 8 27
Abbildung 9 28
Abbildung 10 29
Abbildung 11 30
Abbildung 12 31
Abbildung 13 32
Abbildung 14 35
Abbildung 15 36
Abbildung 16 39
Abbildung 17 40
Abbildung 18 41
Abbildung 19 42
Abbildung 20 43
Abbildung 21 45
Abbildung 22 49
Abbildung 23 64
Abbildung 24 64
Abbildung 25 65
Abbildung 26 66
Abbildung 27 67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1..... 4
Tabelle 2..... 6
Tabelle 3..... 44
Tabelle 4..... 52
Tabelle 5..... 53
Tabelle 6..... 54
Tabelle 7..... 55
Tabelle 8..... 56
Tabelle 9..... 57
Tabelle 10..... 57
Tabelle 11..... 58
Tabelle 12..... 58
Tabelle 13..... 59
Tabelle 14..... 59
Tabelle 15..... 60
Tabelle 16..... 60
Tabelle 17..... 61
Tabelle 18..... 61
Tabelle 19..... 62
Tabelle 20..... 62
Tabelle 21..... 65
Tabelle 22..... 67
Tabelle 23..... 68
Tabelle 24..... 69

1 Einleitung

1.1 Spinocerebellare Ataxie (SCA)

1.1.1 Einteilung

Degenerative Ataxien sind aufgrund ihrer Heterogenität und unterschiedlicher Klassifikationsansatzpunkte schwierig einzuteilen. In letzter Zeit werden bei der Einteilung vermehrt genetische und Vererbungseigenheiten zur Klassifikation eingesetzt. So teilt man die Ataxien nach Harding in vier Hauptgruppen gemäß ihrem Vererbungsmechanismus ein: autosomal rezessive, autosomal dominante, X-chromosomale und sporadische Ataxien (Harding, 1982; Schöls et al., 2001; Viau and Boulanger, 2004).

Die autosomal dominant vererbten Ataxien, zu denen die in dieser Arbeit untersuchten spinocerebellaren Ataxien zählen, wurden 1982 ebenfalls durch Harding ursprünglich in vier Gruppen anhand der zusätzlich auftretenden extracerebellaren Symptome eingeteilt: ADCA (*autosomal dominant cerebellar ataxia*) I einhergehend mit extrapyramidalen oder pyramidalen Störungen, Pseudobulbärparalyse, nucleärer Ophthalmoplegie und milder Demenz, ADCA II über pigmentöse Retinadegeneration, ADCA III über spät beginnende reine cerebellare Syndrome sowie ADCA IV über Myocloni und Schwerhörigkeit (Bürk et al., 1996; Harding, 1982; Mascalchi et al., 1998; Maschke et al., 2005). Eine weitere Einteilung, ursprünglich von Holmes 1907 begründet, orientiert sich am regionalen Vorkommen neuronaler Degeneration und neuerdings am Auftreten von Atrophiezeichen innerhalb der Magnetresonanzbildgebung. Hierbei wird zwischen cerebellocorticaler Atrophie (CCA), olivopontocerebellarer Atrophie (OPCA) und spinaler Atrophie (SA) unterschieden (Bürk et al., 1996; Mascalchi et al., 2002; Tedeschi et al., 1996).

Diese klinisch und morphologisch-neuropathologisch orientierten Einteilungen sind aufgrund überlappender Syndrome und starker Symptomvarianten fehlerbehaftet und wurden in den letzten Jahren durch die Entdeckung molekulargenetischer Ursachen vieler Ataxien revolutioniert. Die

neuentstandene Klassifizierung anhand des genetischen Defekts hat zur Gruppe der spinocerebellaren Ataxien (SCA) geführt, von der zur Zeit 24 Subtypen unterschieden werden. Für SCA1 - 3, 6 - 8, 10, 12 ,14, 17 ist dabei die Mutation entschlüsselt und bei SCA4, 5, 11, 13, 15, 16, 19, 21 - 23, 25, und 26 der betroffene Genlocus (Chung et al., 2003; Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2004; Stevanin et al., 2004; Tsuji, 2004).

Weitere Forschungen ergaben, dass sich hinter den Mutationen unterschiedliche Mechanismen verbergen, die zu einer Einordnung der spinocerebellaren Ataxien in die Gruppe der Trinucleotidrepeaterkrankungen führte. Diesen Erkrankungen sind Expansionen aus drei Basen bestehender DNA-Einheiten, den sogenannten Trinucleotiden gemeinsam. Hierbei werden zwei Gruppen unterschieden: Einerseits die Gruppe der nicht codierenden Trinucleotiderkrankungen, bei der die expandierten Trinucleotidsequenzen in nicht translatierten Genbereichen liegen. Zu dieser Gruppe zählen das Fragile-X-Syndrom (FRAXA), das Fragile XE Syndrom (FRAXE), die Friedreich Ataxie, die myotonische Ataxie sowie die spinocerebellaren Ataxien SCA8 und SCA12 (Cummings and Zoghbi, 2000; Klockgether et al., 2000; Schöls et al., 2001).

Andererseits die Gruppe der Polyglutaminerkrankungen, bei der als genetischer Defekt eine Vervielfältigung der Trinucleotidsequenz CAG im betroffenen Genlocus vorliegt, der im Unterschied zur vorherigen Gruppe translatiert wird. Nachdem die Basen Cytosin, Adenin und Guanin für die Aminosäure Glutamin kodieren, kommt es zur Ausbildung verlängerter Glutaminsequenzen, sogenannter Polyglutaminstränge innerhalb der Proteine, für die der entsprechende Genlocus codiert (Cummings and Zoghbi, 2000; Martin, 1999; Schöls et al., 2001). Der Gruppe der Polyglutaminerkrankungen werden die Spinobulbäre Muskelatrophie (Kennedy-Krankheit), Chorea Huntington, die Dentatorubropallidoluysiane Atrophie (DRPLA) sowie die Spinocerebellaren Ataxien SCA1, SCA2, SCA3 (Machado-Joseph-Krankheit), SCA6 und SCA7 zugeordnet (Cummings and Zoghbi, 2000; Schöls et al., 2001). Ein verfeinerter Einteilungsansatz wurde von Klockgether und Kollegen vorgestellt. Sie fügten der bei ihnen CAG Repeat-Störungen genannten Gruppe der Polyglutaminerkrankungen und der Gruppe der nichttranslatierten CTG

(Trinucleotid)-Expansionen eine dritte bei, in der sie Erkrankungen einordneten, die durch Mutationen in für Ionenkanäle codierenden Genen entstehen. Hierunter ordneten sie die SCA6, für die eine Mutation innerhalb des für eine spannungsabhängige Calciumkanaluntereinheit codierenden CACNA1A Gens gefunden wurde und die Episodischen Ataxien Typ 1 und 2, die gleichfalls Veränderungen in Ionenkanalgenen aufweisen, ein (Klockgether et al., 2000).

Wir untersuchten Patienten, die an SCA1, SCA2 und SCA3 erkrankt waren. Für SCA1 liegt die Mutation auf Chromosom 6p23 und codiert das Ataxin 1 genannte Protein. Bei Gesunden enthält das SCA1-Gen 6-44 CAG-Repeats, wohingegen bei Erkrankten 39-88 CAG-Repeats vorliegen (siehe Tabelle 1) (Cummings and Zoghbi, 2000; Martin, 1999; Rüb et al., 2004; Schöls et al., 2001).

Das SCA2-Gen liegt auf Chromosom 12q23-24.1 und codiert das Protein Ataxin 2. 14-32 CAG-Triplets finden sich innerhalb des Gens bei Gesunden und 33-77 bei an SCA2 Erkrankten (siehe Tabelle 1) (Brenneis et al., 2003; Cummings and Zoghbi, 2000; Martin, 1999; Rüb et al., 2004; Rüb et al., 2003a; Rüb et al., 2005; Rüb et al., 2003b; Schöls et al., 2001).

Bei SCA3 befindet sich die Mutation auf Chromosom 14q32.1. Das SCA3-Gen codiert für das Protein Ataxin 3 und besitzt bei Gesunden 12-40 CAG-Repeats, wohingegen bei Erkrankten 55-86 CAG-Repeats nachgewiesen wurden (siehe Tabelle 1) (Cummings and Zoghbi, 2000; Kawaguchi et al., 1994; Rüb et al., 2004; Rüb et al., 2005; Schöls et al., 2001).

Tabelle 1

Gegenüberstellung der spinocerebellaren Ataxien 1, 2, und 3 bezüglich ihrer molekulargenetischen Charakteristika. Modifiziert nach Cummings und Zoghbi, Rüb et al. und Schöls et al. (Cummings and Zoghbi, 2000; Rüb et al., 2005; Schöls et al., 2001).

Spinocerebellare Ataxie	Gen	Locus	Proteinprodukt	CAG-Repeatlänge	
				Gesund	Krank
Subtyp 1	SCA1	6p23	Ataxin 1	6-44	39-88
Subtyp 2	SCA2	12q23-24.1	Ataxin 2	14-32	33-77
Subtyp 3	SCA3	14q32.1	Ataxin 3	12-40	55-86

1.1.2 Klinische Charakteristika

Die spinocerebellaren Ataxien stellen zur Zeit unbehandelbare und zu schwerster Neurodegeneration bis hin zum Tode führende neurologische Erkrankungen dar (Maschke et al., 2005; Rüb et al., 2004; Rüb et al., 2003a; Rüb et al., 2005).

Ihre Prävalenz wird mit mindestens 3 Fällen pro 100 000 Einwohner angegeben, wobei nur sehr wenige epidemiologische Studien seit Einführung der SCA-Gentests durchgeführt wurden (Schöls et al., 2004; van de Warrenburg et al., 2002). Die Häufigkeit der einzelnen spinocerebellaren Ataxien zeigt weltweit Unterschiede auf. So kommt SCA3 insgesamt am häufigsten vor, wobei der Anteil an SCA3 unter Portugiesen, Azoren und Japanern besonders hoch ist. In Indien und Korea wurde am häufigsten der SCA2-Subtyp diagnostiziert und SCA1 bildete den Hauptanteil in Russland. In den Niederlanden und Deutschland wurde am meisten der SCA3-Subtyp

festgestellt, gefolgt von SCA6, SCA2 und SCA1 (Basu et al., 2000; Haacke et al., 2006; Lee et al., 2003; van de Warrenburg et al., 2002).

Die Erkrankung tritt im Mittel im frühen Erwachsenenalter Anfang dreißig auf. Lediglich für SCA6 wurde ein späteres mittleres Erkrankungsalter Mitte vierzig beschrieben. Allerdings werden mit Unterschieden bei allen Subtypen Ersterkrankungen von der Adoleszenz bis zum sechsten Lebensjahrzehnt berichtet (Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2004).

Haupt- und zumeist auch Initialsymptom der spinocerebellaren Ataxien ist eine progrediente Gangunsicherheit (Gangataxie) ohne Remission, die durch Degeneration des Kleinhirns sowie dessen afferenten und efferenten Bahnen entsteht (Bürk et al., 1999; Schöls et al., 2001). Hierzu treten meist zusätzliche cerebellare Symptome wie eine Stand- und Extremitätenataxie, Okulomotorikstörungen (sakkadierte Blickfolge, Blickrichtungsnystagmus), sowie Dysarthrie (Martin, 1999; Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2001).

Die in dieser Arbeit relevante Subtypen SCA1, SCA2 und SCA3 werden aufgrund des Auftretens zusätzlicher nicht-cerebellarer Syptome der klinischen Einteilung ADCA I nach Harding zugeordnet (Schöls et al., 2004). So finden sich Zeichen der Beteiligung anderer neurologischer Systeme, wie beispielsweise Optikusatrophie, Pyramidenbahnzeichen, extrapyramidalmotorische Symptome, Ophthalmoplegien, Polyneuropathie, Dysphagie und Demenz (Bürk et al., 1999; Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2004; Schöls et al., 2001). Anstrengungen wurden unternommen, klinisch signifikante Unterschiede zwischen den Subtypen zu entdecken, um eine Vorauswahl unter den spezifischen SCA-Gentests treffen zu können und damit die Durchführung kostenintensiver genetischer Tests einzuschränken.

Bei SCA1 wurden vermehrt Pyramidenbahnzeichen (Hyperreflexie; Spastik), Dysphagie, Myocloni, Amyotrophie, Ophthalmoplegien und kognitive Defizite festgestellt, wohingegen bei SCA2 verlangsamte Blicksakkaden, Zeichen peripherer Polyneuropathie (Hyporeflexie; Hypotonie, Parästhesien), Tremor aber auch Myocloni und Ophthalmoplegien häufiger auftraten. Die SCA3 wies verstärkt Diplopie (häufig als Initialsymptom vor Auftreten der Ataxie), Nystagmus, Pseudoexophthalmus (aufgrund Lidretraktion), Restless-legs

Syndrom, Thermhypästhesie jedoch auch Polyneuropathie- und Pyramidenbahnzeichen auf (Bürk et al., 1996; Bürk et al., 1999; Martin, 1999; Maschke et al., 2005; Robitaille et al., 1997; Schöls et al., 2001). Auch wurden für SCA2 und SCA3 vermehrt extrapyramidalmotorische Symptome, wie einerseits Dystonien (Martin, 1999; Robitaille et al., 1997; Schöls et al., 2001) aber auch Ruhetremor, Rigor und Bradykinesie beschrieben, wobei der letztere Symptomenkomplex als parkinsoniformer Phänotyp beschrieben wurde (Lu et al., 2004; Schöls et al., 2004). Weiterhin kann es in der Spätphase der SCA1 auch zu choreiformen Hyperkinesien kommen (Schöls et al., 2004). Hierbei bleibt anzumerken, dass eine Vielzahl der Symptome bei allen drei SCA-Subtypen auftraten, was eine Unterscheidung im klinischen Alltag erschwert (Bürk et al., 1996; Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2004). Eine Gegenüberstellung charakteristischer Symptome der drei spinocerebellaren Ataxien ist in Tabelle 2 gegeben.

Tabelle 2

Charakteristische klinische Symptome bei SCA1, SCA2 und SCA3. Modifiziert nach Martin et al., Maschke et al. und Schöls et al. (Martin, 1999; Maschke et al., 2005; Schöls et al., 2004)

Spinocerebellare Ataxie		
Typ 1	Typ 2	Typ 3
Pyramidenbahnzeichen	verlangsamte	Diplopie
Dysphagie	Blicksakkaden,	Nystagmus
Myocloni	Polyneuropathiezeichen	Pseudoexophthalmus
Amyotrophie	Tremor	Restless-legs Syndrom
Ophthalmoplegien	Myocloni	Thermhypästhesie
	Ophthalmoplegien	Parkinsonismus
	Parkinsonismus	Dystonien
		Pyramidenbahnzeichen
		Polyneuropathiezeichen
		Ophthalmoplegien

Des weiteren wurde für SCA1, SCA2, SCA3 und SCA7 eine Tendenz zur zusätzlichen Verlängerung der CAG Repeatlänge bei der folgenden Generation aufgezeigt. Zusätzlich hierzu fand sich eine negative Korrelation zwischen CAG Repeatlänge und dem Alter bei der Ersterkrankung, wobei die Erkrankung bei längeren CAG-Repeats früher auftrat. Dieses Phänomen des früheren Krankheitseintritts bei folgenden Generationen wird als Antizipation bezeichnet (Bürk et al., 1996; Klockgether et al., 2000; Martin, 1999).

1.1.3 Pathogenese

Neuropathologisch wurde ein Neuronenuntergang in verschiedenen Hirnregionen beschrieben, der mit dem klinischen Bild weitgehend übereinstimmt. Vorwiegend betroffen sind die cerebellaren Purkinjezellen sowie der Nucleus dentatus. Je nach SCA-Subtyp lassen sich Degenerationen der Pedunculi cerebellaris, pontiner Kerne und der Oliven aber auch der Basalganglien und des Thalamus finden. Eine Auffälligkeit sind dabei Zellkerneinschlusskörper, sogenannte NIs (*nuclear inclusions)* innerhalb der von Degeneration betroffenen Zellen (Martin, 1999; Rüb et al., 2004; Rüb et al., 2003a; Rüb et al., 2005; Schöls et al., 2004; Schöls et al., 2001).
Die den Polyglutaminerkrankungen gemeinsamen CAG-Repeatverlängerungen führen, wie unter 1.1.1 beschrieben zu verlängerten Glutaminsequenzen innerhalb der entsprechenden Proteine. Für die spinocerebellaren Ataxien werden diese Proteine Ataxine genannt, unter Zusatz der jeweiligen Subtypennummer (siehe Tabelle 1). Sie werden sowohl in neuronalem als auch nicht-neuronalem Gewebe exprimiert und ihre Funktion innerhalb der Zelle ist bis heute noch weitgehend unklar (Klockgether et al., 2000; Schöls et al., 2004). Zahlreiche Tiermodelle, vor allem für Chorea Huntington aber auch für SCA1, 2, 3, 7 und 8 haben in den letzten Jahren zu Erklärungsansätzen der Pathogenese der Polyglutaminerkrankungen geführt (Schöls et al., 2004). Dabei scheinen die im Vergleich zum gesunden Protein verlängerten Glutaminstränge eine zentrale Rolle zu spielen, denn transgene Mäuse, die Polyglutaminstränge in einem

völlig anderen Protein (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) exprimierten, entwickelten ein den Polyglutaminerkrankungen vergleichbares Krankheitsbild (Cummings and Zoghbi, 2000; Schöls et al., 2004).

Eine weitgefasste pathogenetische Modellvorstellung ist, das die Polyglutaminstränge zu einer Fehlfaltung der Ataxine führen und diese eine toxische Rolle erlangen (sogenanntes *gain of function*) (Cummings and Zoghbi, 2000; Paulson, 2000). So wurde für Ataxin 3 eine Strukturänderung nachgewiesen, nachdem eine deutliche Zunahme der β-Faltblattstruktur unter Abnahme α-helicaler Struktur bei mutiertem Ataxin 3 gefunden wurde (Bevivino and Loll, 2001). Ein Forschungsansatz ist daher die Prävention und Reversion der Proteinfehlfaltung über die Überexpression von Chaperonen, wie beispielsweise Hitzeschockproteine (HSP), für die in Zellkulturen bereits ein protektiver Effekt aufgezeigt wurde (Schöls et al., 2004; Schöls et al., 2001).

Weiterhin scheinen die mutierten Ataxine ihre starke toxische Wirkung erst nach ihrer proteolytischen Aufspaltung zu entfalten, konnte doch gezeigt werden, dass polyglutaminhaltige Proteinspaltprodukte eine deutlich höhere pathogenetische Potenz besitzen als komplette sogenannte *full-length* Ataxine. Dies führte zu der *toxic fragment* Hypothese, die davon ausgeht, dass nur die proteolytisch aufgespaltenen Proteinfragmente eine Proteinaggregation und damit den Krankheitsprozeß initiieren können (Burnett and Pittman, 2005; Haacke et al., 2006; Paulson, 2000). Haacke und Kollegen konnten aufzeigen, dass proteolytisch entstandene polyglutaminhaltige Ataxin 3-Spaltprodukte die Aggregation gesunden Ataxin 3 einleitet. Dementsprechend präzisierten sie die *toxic fragment* Hypothese wie folgt: Kurze poyglutaminhaltige Ataxin 3 Fragmente, die durch Proteolyse entstanden sind, interagieren mit *full-length* Ataxin 3 und führen zur Ablagerung des gesunden Ataxin 3 innerhalb von stabil aggregierten Einschlusskörperchen (*nuclear inclusions*), was zu einem Mangel an funktionsfähigem Ataxin 3 führt. Ihrer Meinung nach beruht die Pathogenese neben der *gain of function* der polyglutaminhaltigen Proteine zusätzlich auf einem Verlust der natürlichen Funktion der unmutierten Proteine aufgrund ihrer Aggregation (Haacke et al., 2006).

Auch scheint bei vielen Polyglutaminerkrankungen das Vorliegen der mutierten Proteine innerhalb des Nucleus für die Krankheitsentstehung vonnöten zu sein, zeigten sich doch bei SCA1 transgenen Mäuse, bei denen ein Transport des Ataxin 1 in den Nucleus verhindert wurde keine Krankheitszeichen (Klockgether et al., 2000; Paulson, 2000; Schöls et al., 2004). Um einen Transfer der mutierten Proteine in den Nucleus zu ermöglichen, müssen diese zuvor proteolytisch aufgespalten werden (Cummings and Zoghbi, 2000). Dies hat zur weiteren Hypothese geführt, dass polyglutaminhaltige Proteine einen zellulären Stress innerhalb des Neurons induzieren, der zur Aktivierung von Proteasen wie beispielweise Caspasen führt. Durch die nachfolgende Proteolyse der mutierten Proteine entstehen polyglutaminstranghaltige Spaltprodukte, die ihrerseits deutlich zelltoxischer sind und den zellulären Stress noch verstärken, was zum Untergang der Zelle führt (Paulson, 2000). So konnte über Hemmung von Caspasen innerhalb von Chorea Huntington-Zellkulturen der Zelltod verhindert und bei Chorea Huntington transgenen Mäusen ein vermindertes Fortschreiten der Krankheit erreicht werden (Cummings and Zoghbi, 2000).
Innerhalb der Eingangs erwähnten NIs (*nuclear inclusions)* wurden ubiquitinierte Ataxinspaltprodukte, die den Polyglutamintrakt enthalten, nachgewiesen. Eine Hemmung der Ubiquitinierung im Mäusemodell bei Chorea Huntington hatte eine Verminderung der NIs zur Folge, allerdings erhöhte sich die Zelltodrate deutlich (Saudou et al., 1998). Daher scheint die ubiquitinvermittelte Aggregation der mutierten Ataxine unter Bildung von NIs ein Versuch der Zelle zu sein, die toxischen Ataxinspaltprodukte innerhalb des Zellkern abzukapseln und somit die Zelle zu schützen, nachdem ein regelrechter Abbau der mutierten Proteine über Proteasome nicht möglich ist (Colomer Gould, 2005; Cummings and Zoghbi, 2000; Schöls et al., 2004).

1.2 Magnetresonanzbildgebung bei spinocerebellarer Ataxie

Zahlreiche magnetresonanzspektroskopische Untersuchungen wurden in den letzten Jahren durchgeführt um eine weitere Methode zur Diagnosestellung der

spinocerebellaren Ataxie zu etablieren. Vor allem die ausgeprägte Variabilität der Symptome bei den verschiedenen Subtypen sowie das Vorkommen gleicher Symptome bei verschiedenen Subtypen macht eine Vorauswahl aus der immer zahlreicheren Menge der spezifischen SCA-Gentest sehr schwierig. Diese ist jedoch aufgrund der hohen Kosten für einen einzelnen Tests (400 EUR und mehr) sowie der geringen Aussagekraft eines negativen Testergebnisses unerlässlich (Viau and Boulanger, 2004; Viau et al., 2005). Weitere diagnostische Möglichkeiten zur Unterscheidung der SCA-Subtypen sind daher vonnöten. Ein Ansatz ist hierbei die Verwendung der Magnetresonanzbildgebung und -spektroskopie.

Schon seit längerer Zeit betriebene Magnetresonanzbildgebungsstudien zeigten diagnostische Schwächen in der Frühphase der Krankheit, da zuerst eine entsprechende Hirngewebsatrophie respektive ein ausreichender Anteil erkrankten Gewebes relativ zum Gesunden vorliegen muss, um einen Signalunterschied in der Bildgebung zu erhalten (Mascalchi et al., 2002; Viau and Boulanger, 2004; Yoshizawa et al., 2003). Es konnten jedoch den einzelnen SCA-Subtypen spezifische Atrophiemuster zugeordnet werden, wobei es auch hier wie bei den klinischen Symptomen Überschneidungen gibt. Bei SCA1 wurde eine cerebellare, pontine und cervical-spinale Atrophie unter Aussparung des Kleinhirnwurms beschrieben. SCA2-Patienten entwickeln das Vollbild einer Olivopontocerebellaren Atrophie (OPCA), die deutlich stärker ausgeprägt ist als bei SCA1 und von einer Atrophie des Thalamus und Mesencephalons sowie supratentorieller Gebiete begleitet wird, was auf den Untergang cerebellarer Afferenzen zurückzuführen sein könnte. Die SCA3 zeigt eine milde Atrophie des Cerebellums und Hirnstamms (vorwiegend im Tegmentum pontis) und keinerlei Atrophie der Cerebellumhemisphären im Vergleich zu SCA1 und SCA2. Weiterhin wurde eine Atrophie der Basalganglien (Nucleus caudatus/ Putamen) beschrieben (Brenneis et al., 2003; Bürk et al., 1996; Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 1998; Schöls et al., 2004; Viau and Boulanger, 2004; Yoshizawa et al., 2003).

1.3 Magnetresonanzspektroskopie bei spinocerebellarer Ataxie

Im Gegensatz zur Magnetresonanzbildgebung nutzt die Magnetresonanzspektroskopie nicht das Protonensignal des Wassermoleküls, sondern verwendet das deutlich schwächere Signal von unter anderem an Metaboliten des Hirngewebsstoffwechsels gebundenen Protonen. In magnetresonanzspektroskopischen Studien konnten während der letzten Jahre einige Veränderungen der Hirngewebsmetaboliten bei SCA-Patienten festgestellt werden sowie Unterschiede zwischen den SCA-Subtypen aufgedeckt werden (Viau and Boulanger, 2004; Viau et al., 2005). Zu den untersuchten Metaboliten zählten zumeist N-Acetylaspartat (NAA), Creatin (Cr), Myoinositol (Ins), Cholin (Cho), Lactat (Lac) und Glutamin/ Glutamat (Glx) (siehe hierzu 2.1).

Ein verringertes NAA/Cr Verhältnis bzw. eine Verringerung des absoluten NAAs konnte innerhalb des Pons und des Cerebellums für SCA1, SCA2, olivopontocerebellare Atrophie (OPCA), cerebellocorticale Atrophie (CCA), spinale Atrophie (SA) und bei der Gesamtgruppe der autosomal dominanten cerebellaren Ataxien (ADCA) aufgezeigt werden (Boesch et al., 2001; Davie et al., 1995; Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005). Weiterhin wurde ein geringere Reduktion bei asymptomatischen Krankheitsträgern gegenüber symptomatischen berichtet, sowie eine negative Korrelation des NAA/Cr-Verhältnisses mit der Erkrankungsdauer respektive dem klinischen Defizit der Erkrankten (Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005). Dies eröffnet die Möglichkeit des Einsatzes der Magnetresonanzspektroskopie zur Früherkennung und Krankheitsverlaufskontrolle bei spinocerebellarer Ataxie.

Im Pons und Cerebellum wurden erhöhte Creatinwerte für SCA2 beim Menschen beschrieben und für SCA3 an transgenen Mäusen(Griffin et al., 2004; Viau et al., 2005), ebenso wie eine erhöhte Myoinositolkonzentration für SCA2 (Viau et al., 2005). Gleichzeitig konnte eine Korrelation der Hirnatrophie

mit dem Ins/Cr-Verhältnis entdeckt werden, was von den Autoren als Korrelat einer verstärkten Gliose während des Krankheitsverlaufes gedeutet wurde (Viau et al., 2005).
Cholinreduktionen innerhalb des Pons wurden bei SCA1 und OPCA und für das Cerebellum bei SCA2, OPCA und ADCA berichtet (Boesch et al., 2001; Davie et al., 1995; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998). Zusätzlich fand sich eine Abhängigkeit des Cho/Cr-Verhältnisses von der Erkrankungsdauer und der CAG-Repeatanzahl (Viau et al., 2005).
Geringe Lactatmengen konnten lediglich im Cerebellum bei SCA2 nachgewiesen werden und erhöhte Glutaminkonzentrationen wurden bis heute nur in Hirngewebslösungen sowie erhaltenem Cerebellumgewebe von SCA3 transgenen Mäusen entdeckt (Boesch et al., 2001; Griffin et al., 2004). Allerdings fand sich bei Chorea Huntington, die ebenfalls zur Gruppe der Polyglutaminerkrankungen gehört *in vivo* ein erhöhtes Glutamat/Cr Verhälnis (Taylor-Robinson et al., 1996).

1.4 Zielsetzung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, inwieweit die bei der spinocerebellaren Ataxie vorliegenden pathologischen Proteinveränderungen spektroskopisch feststellbar sind. Dabei ist es aufgrund ihrer abschirmenden ß-Falltblattstruktur sehr unwahrscheinlich, die kompletten mutierten Ataxine nachweisen zu können. Allerdings könnten die proteolytisch entstandenen Ataxinfragmente durchaus spektroskopisch sichtbar sein. Hierbei könnte einerseits freies Glutamin/Glutamat (Glx) feststellbar sein nachdem in Modellstudien Glx mit der Protonenmagnetresonanzspektroskopie erfasst werden konnte (Behar and Ogino, 1993). Andererseits wären auch erhöhte Konzentrationen proteingebundenen Glx denkbar. So konnte an Makromoleküle gebundenes Glx spektroskopischen Resonanzen bei 2.05 und 2.29 ppm unter Verwendung hoher Magnetfeldstärken zugeordnet werden (Behar et al., 1994). Darüber

hinaus gelang es bei 1,5 T korrespondierende makromolekulare Resonanzen bei 2.1 ppm aufzufinden (Seeger et al., 2003).

Vertiefend soll der Frage nachgegangen werden, ob sich eine Abhängigkeit der zu erwartenden spektroskopischen Veränderungen von Erkrankungsdauer, SCA-Subtyp und Anzahl der CAG-Repeats nachweisen lässt.

Eine weitere Aufgabe dieser Studie soll eine Überprüfung der vorliegenden magnetresonanzspektroskopischen Ergebnisse bei der spinocerebellaren Ataxie sein. Hierzu führten wir im Unterschied zu den meisten unter 1.3 erwähnten Vorstudien eine Partialvolumenkorrektur für den Anteil an Liquor cerebrospinalis innerhalb unseres Messbereiches durch, eingedenk der Tatsache, dass die spinocerebellare Ataxie mit einer deutlichen Atrophie der betroffenen Hirnregionen einhergeht. Dadurch kann es zu einer Verfälschung der Metaboliten- und Makromolekülkonzentrationen kommen. Abgesehen von Viau und Kollegen, die eine etwas abweichende Methode zur Partialvolumenkorrektur benutzten (Viau et al., 2005), wurde bei den vorliegenden Studien keinerlei derartige Korrektur durchgeführt. Wir erwarten hierdurch verlässlichere Ergebnisse über magnetresonanzspektroskopisch erfassbare pathologische Veränderungen bei der spinocerebellaren Ataxie.

2 Material und Methodik

2.1 Grundlagen der Magnetresonanzspektroskopie

2.1.1 Entwicklung

Magnetresonanz beruht auf magnetischen Kerneigenschaften unter zu Hilfenahme von Radiofrequenzen in starken Magnetfeldern. Purcell (Purcell, 1946) und Bloch (Bloch, 1946a; Bloch, 1946b; Bloch et al., 1946) entdeckten unabhängig voneinander die magnetische Kernresonanz und erhielten dafür den Nobelpreis für Physik im Jahre 1952. Die Entdeckung des Effekts der sogenannten chemischen Verschiebung, der die Eigenschaft von Kernen beschreibt, in unterschiedlicher chemischer Umgebung verschiedene Resonanzfrequenzen zu besitzen (Dickinson, 1950; Proctor, 1950), machte die Entwicklung der Magnetresonanzspektroskopie möglich. Auf diese Weise können über die gemessenen Resonanzfrequenzen Rückschlüsse auf die Elektronenverteilung und die Molekülstruktur gezogen werden. Die Entwicklung der Fourier transformierten Spektroskopie (Ernst and Anderson, 1966) wird bis heute bei allen spektroskopischen *in vivo* Untersuchungen verwendet. Magnetresonanzspektroskopie findet in weiten Teilen der Physik, Chemie, Biochemie und Biologie ihre Anwendung. Im lebenden Organismus wird sie als sogenannte *in-vivo* Spektroskopie durchgeführt. 1971 berichtete Damadian über unterschiedliche Relaxationszeiten des Wasserpeaks in bösartigem Tumorgewebe und gesundem Gewebe (Damadian, 1971), was die Hoffnung weckte, die Magnetresonanz als Diagnosemittel einsetzen zu können. Mit ihren bahnbrechenden Forschungsergebnissen legten Lauterbur (Lauterbur, 1973) und Mansfield (Mansfield, 1977) die Grundlagen der heutigen Magnetresonanztomographie. Für diese Entdeckungen wurde ihnen im Jahre 2003 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin verliehen. Beide Methoden, die Magnetresonanztomographie und die Magnetresonanzspektroskopie beruhen auf den gleichen physikalischen Grundlagen. Die Magnetresonanztomographie nutzt das Signal der Protonen in Gewebe,

Wasser oder Fett. Die Magnetresonanzspektroskopie hingegen stellt neben dem Wassersignal das schwächere Protonensignal metabolischer Stoffe mit geringerer Konzentration oder das Signal anderer Kerne mit geringerem natürlichen Vorkommen dar und kann verschiedene Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Frequenz zuordnen (Chemische Verschiebung/ *chemical shift*). Diese geringere Sensitivität der Magnetresonanzspektroskopie verglichen mit der Magnetresonanzbildgebung, muss durch ein größeres Untersuchungsvolumen (was eine Reduktion der räumlichen Auflösung bedeutet) ausgeglichen werden, wenn die *in-vivo* Messungen in einem praktikablen Zeitrahmen durchgeführt werden sollen. Die Magnetresonanzspektroskopie stellt höhere Anforderungen an die Feldhomogenität des statischen Magnetfeldes (B_0) als die Magnetresonanzbildgebung. Daher wurde die Magnetresonanzspektroskopie in der Vergangenheit vorwiegend in Forschungstandorten verwendet. Die Tendenz zu höheren Feldstärken und Fortschritte im Umgang mit der Spektroskopie während des klinischen Alltags, konnten zur Etablierung der Magnetresonanzspektroskopie als eine klinische Untersuchungsmethode beitragen.

Im Folgenden werden die Prinzipien der Kernspinresonanz lediglich über die klassische Erklärung dargelegt, da eine quantenmechanische Erklärung für das Verständnis der klinisch angewandten Spektroskopie nicht zwingend erforderlich ist.

2.1.2 Chemische Verschiebung

Die Magnetresonanzspektroskopie ist auf das Phänomen der chemischen Verschiebung (*chemical shift*) zurückzuführen: die Kernspinresonanzfrequenz in einem äußeren Magnetfeld ist durch die Larmorfrequenz ω_0 bestimmt:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \qquad \text{(Larmorgleichung)} \qquad (1)$$

wobei γ das gyromagnetische Verhältnis und B_0 das äußere Magnetfeld bezeichnen.
Die Larmorfrequenz der Kerne in verschiedenen chemischen Umgebungen wird durch eine Abschirmung des Kernes vor dem äußeren Magnetfeld über umgebende Elektronen beeinflusst. Die Elektronen verringern das auf den Kern einwirkende Magnetfeld. Das kann wie folgt ausgedrückt werden

$$B_i = B_0 (1 - \sigma_i) \qquad (2)$$

wobei B_i ($B_{individual}$) das effektive, auf den Kern einwirkende Magnetfeld in der gleichen Umgebung und σ_i die Abschirmungskonstante bezeichnen. σ_i ist dimensionslos und wird üblicherweise in parts per million (ppm) angegeben.

Aus der Larmorgleichung ergibt sich die charakteristische Resonanzfrequenz über

$$\omega_i = \gamma B_i = \gamma B_0 (1 - \sigma_i). \qquad (3)$$

Chemisch nicht äquivalente Kerne werden nicht in gleicher Weise abgeschirmt und haben normalerweise unterschiedliche Resonanzfrequenzen.
Da lediglich relative chemischen Verschiebungen von Bedeutung sind um zwischen verschiedenen äquivalenten Kernen zu unterscheiden, wird die relative chemischen Verschiebung δ_i in Bezug gesetzt zu einer Bezugsverbindung R:

$$\Delta\sigma_i[ppm] \equiv \delta_i = 10^6 \cdot \left(\frac{\omega_i - \omega_R}{\omega_R} \right) = 10^6 \cdot \frac{\Delta\omega_i}{\omega_R} \qquad (4)$$

δ_i ist nicht abhängig von B_0. In der Protonenmagnetresonanzspektroskopie wird Tetramethylsilan (TMS) als Bezugsverbindung genutzt, da es vier Methylgruppen mit gleichwertigen Protonen besitzt. Da TMS nicht in *in-vivo* Systemen zu finden ist; werden für *in-vivo* Anwendungen innere

Referenzgrößen benutzt. Für die Protonenmagnetresonanzspektroskopie des Gehirns verwendet man allgemein die Resonanz von N-Acetylaspartat bei 2.02 ppm als innere Referenzgröße.

2.1.3 Kopplung

Wenn Protonen in einem Molekül vom lokalen Feld anderer Protonen des gleichen Moleküls beeinflusst werden, sind diese Protonen nicht gleichwertig und das Phänomen der Kopplung taucht auf. Das bedeutet, dass die Resonanzen nicht als Einzelpeak zu sehen sind, sondern in Doppelpeaks, Dreifachpeaks oder Mehrfachpeaks aufgespalten werden. Als Beispiel wird hier Lactat dargestellt (Abbildung 1). Die Methylresonanz am dritten β C-Atom spaltet sich in einen Doppelpeak auf, da es von zwei möglichen Spinrichtungen des Protons im zweiten α C-Atom beeinflusst wird. Das Proton am α C-Atom teilt sich in einen Vierfachpeak. Dieses Kopplungsverhalten ist abhängig von der Echozeit, was bedeutet, dass nicht alle aufgespaltenen Peaks notwendigerweise die gleiche Richtung haben. Manche Signale werden in negative Bereiche moduliert oder sind nicht sichtbar bei bestimmten Echozeiten.

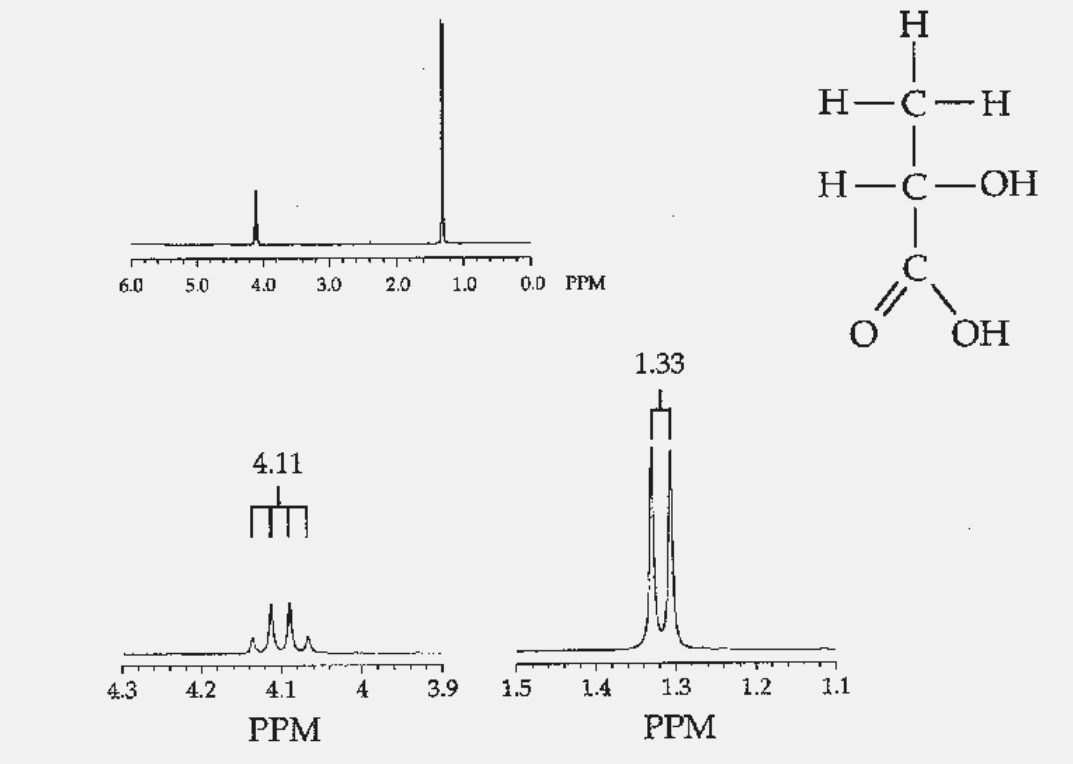

Abbildung 1

Lactat: Molekülstruktur und Spektrum

Die Methylresonanz am α C-Atom (CH3) spaltet sich in einen Doppelpeak auf, da es von zwei möglichen Spinrichtungen des Protons im β C-Atom (H-C-OH) beeinflusst wird. Das Proton im α C-Atom teilt sich in einen Vierfachpeak.

2.1.4 Lokalisationsverfahren

Für die Einzelvoxelspektroskopie sind im Prinzip zwei Lokalisationsverfahren verfügbar: die PRESS- (point resolved spectroscopy) (Bottomley, 1984; Bottomley, 1987) oder die STEAM- (stimulated echo acquisition mode) (Frahm et al., 1989) Sequenz. Bei beiden Techniken werden drei orthogonale schichtselektive Impulse verwendet, um ein Echo eines angeregten Volumens (dem sogenannten „*volume of interest*“= VOI) zu erhalten. Das *volume of interest* stellt den Schnittpunkt der drei orthogonalen Schichten dar. Im PRESS-

Verfahren werden ein 90-Grad und zwei 180-Grad Impulse verwendet, die ein Doppelspinecho hervorrufen (Abbildung 2). Bei der STEAM-Sequenz werden drei 90-Grad Impulse benutzt, die in einem stimulierten Echo (Abbildung 3) resultieren. In beiden Sequenztypen wird das Entstehen von unerwünschten Signalen, die von anderen Pulskombinationen herrühren unterdrückt, um einen Signalbeitrag von außerhalb des angeregten *volume of interest* zu verhindern (sogenanntes „*spoiling*“).

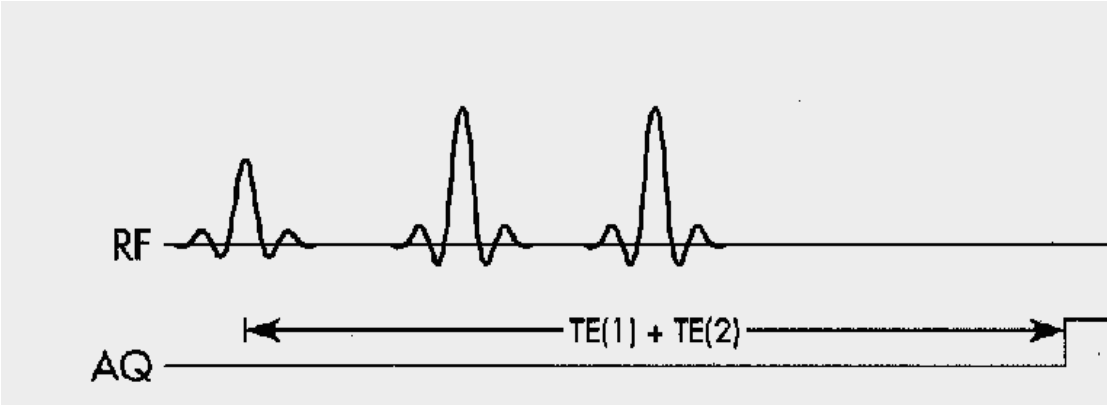

Abbildung 2

Voxelauswahl mit PRESS (point resolved spectroscopy)

Der erste schichtselektive Impuls ist ein 90-Grad Impuls, dem zwei schichtselektive 180-Grad Impulse folgen. Nur die Spins, die von allen drei schichtselektiven Impulsen angeregt wurden, tragen zu einem Doppelspinecho bei, das vom angeregten volume of interest *herrührt.*

Der Vorteil der PRESS-Sequenz liegt in der vollen Signalhöhe, da die komplette Magnetisierung durch die 180-Grad Impulse umgepolt wird. Der Nachteil besteht in den längeren Echozeiten im Vergleich zur STEAM-Sequenz. Kürzere Echozeiten können mit STEAM-Sequenzen erreicht werden. Die Verwendung kurzer Echozeiten ist insofern bedeutsam, als dass man Einflüsse der T2-Relaxationszeit vermindern kann (Abbildung 4). Der Nachteil der STEAM-Sequenz besteht jedoch in der halben Signalhöhe, da nur die Hälfte der Magnetisierung durch den zweiten und dritten 90-Grad Impuls umgepolt wird.

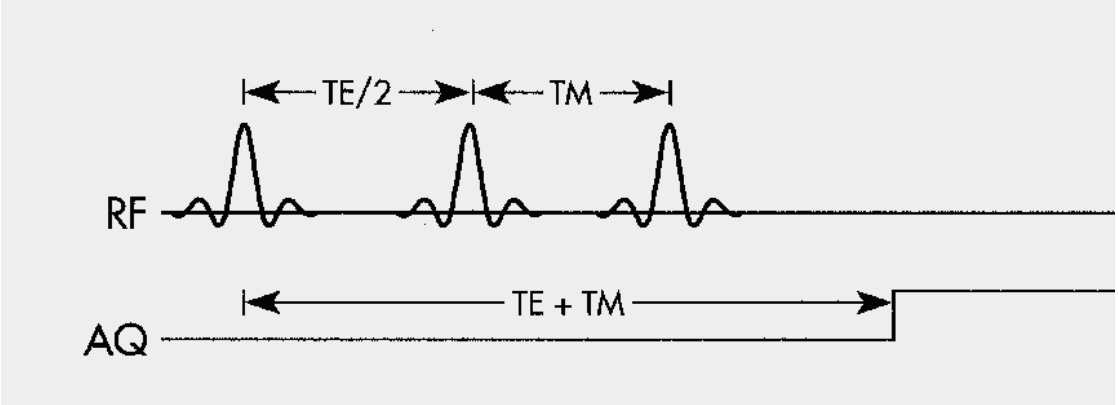

Abbildung 3

Voxelauswahl mit STEAM (stimulated echo acquisition mode)

Drei orthogonale schichtselektive 90-Grad Impulse werden angewandt und führen zu einem stimulierten Echo. Während des Mischungsintervalls (TM), taucht kein T2 bedingter Verfall der Magnetisierung auf, was sich in einer kürzeren Echozeit gegenüber der PRESS-Sequenz bemerkbar macht.

Bei langen Echozeiten (zumeist TE= 135 ms), sind im Allgemeinen drei prominente Resonanzen zu erkennen (Abbildung 4). Diese sind N-Acetylaspartat (NAA), Creatin (Cr) und Cholin (Cho), auf die in Kapitel 2.1.5 näher eingegangen wird. Die Grundlinie bei langen Echozeiten ist glatt, da die zur Grundlinie beitragenden Moleküle mit kürzeren T2-Relaxationszeiten oder Kopplungseigenschaften bei 135 ms bereits relaxiert sind. In der scharf abgegrenzten Grundlinie liegt der deutliche Vorteil von Spektren mit langer Echozeit, wohingegen Signaländerungen nicht ausschließlich Konzentrationsänderungen sondern auch T2-Relaxationseffekten zuzuschreiben sind, was den Nachteil dieser Methode darstellt. Änderungen in der T2-Relaxationszeit müssen in diesem Fall in Betracht gezogen werden. Bei kürzeren Echozeiten (TE= 30 ms oder weniger), können Resonanzen mit kürzerer T2-Relaxationszeit und starkem Kopplungsverhalten zum Signal beitragen. Als solche kommen Myoinositol (Ins) und Glutamin/Glutamat (Glx) in Frage. Eine breite Grundlinie, die unter den Metabolitenresonanzen liegt, leitet sich von Makromolekülen ab und ist bei kurzen Echozeiten sichtbar. Somit fußt die Erfassung und Charakterisierung der Makromoleküle auf kurzen Echozeiten, die in dieser Studie verwendet wurden.

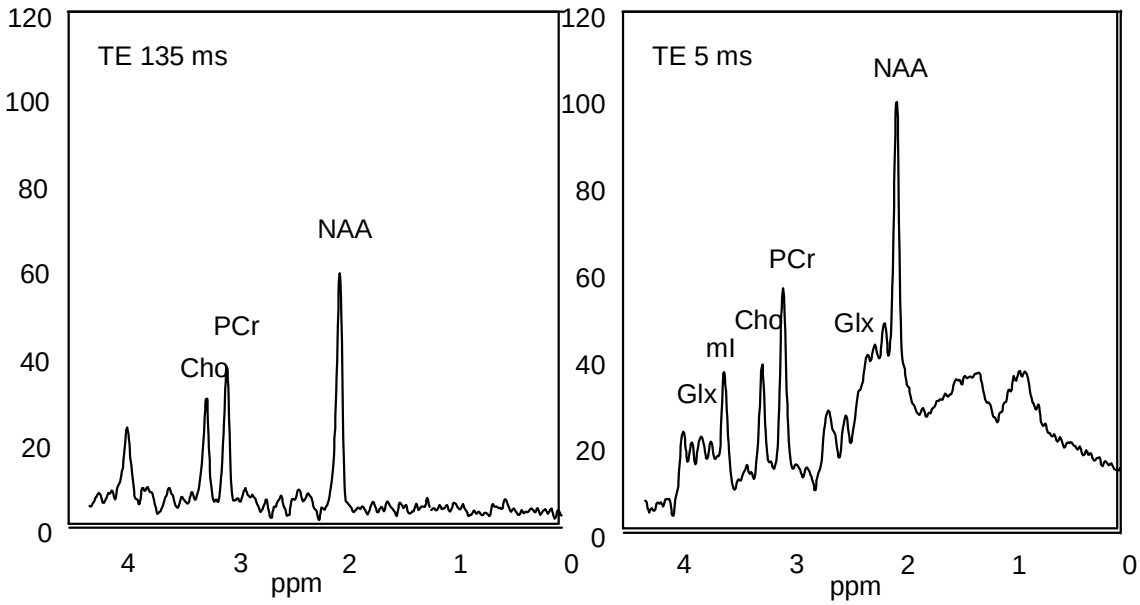

Abbildung 4

Protonenspektrum des gesunden menschlichen Gehirns bei verschiedenen Echozeiten.

Die Auswirkungen unterschiedlicher Echozeiten sind abgebildet. Bei kurzen Echozeiten (TE 5ms, rechts), sind im Vergleich zu langen Echozeiten (TE 135 ms, links) Metaboliten und Makromoleküle im Untergrund sichtbar. TE= Echozeit, NAA= N-Acetylaspartat, Cr= Creatin, Cho= Cholin, mI= Myoinositol, Glx= Glutamin und Glutamat

Zusätzlich zu den Makromolekülen können Lipide unter pathologischen Bedingungen in Spektren mit kurzer Echozeit aufgezeigt werden. Im gesunden Gehirn muss das Auftauchen von Lipiden als Verunreinigung durch Anregung fetthaltiger Strukturen des Schädels und der Galea außerhalb des ausgewählten *volume of interest*, gewertet werden. Diese fälschlicherweise detektierten Lipidresonanzen können durch eine unzureichende Unterdrückung (*spoiling*) unerwünschter Kohärenzen verursacht sein. Jedoch selbst bei ausreichendem *spoiling* kann eine Lipidverunreinigung der Erregung auf einen sehr kleinen Fehler des Anregungspulses zurückgeführt werden (Seeger et al., 2001). Daher muss eine zusätzliche räumliche Vorsättigung der fetthaltigen Bereiche (sogenannte „*outer-volume-saturation*“= OVS) angewandt werden, um

die vollständige Beseitigung der Verunreinigungen zu gewährleisten und gleichzeitig verlässlich reproduzierbare Makromolkülresonanzen sowie unverfälschte Lipide bei pathologischen Befunden im VOI zu erfassen (Seeger et al., 2001). In Abbildung 5 ist der Effekt der OVS bei drei Probanden verdeutlicht.

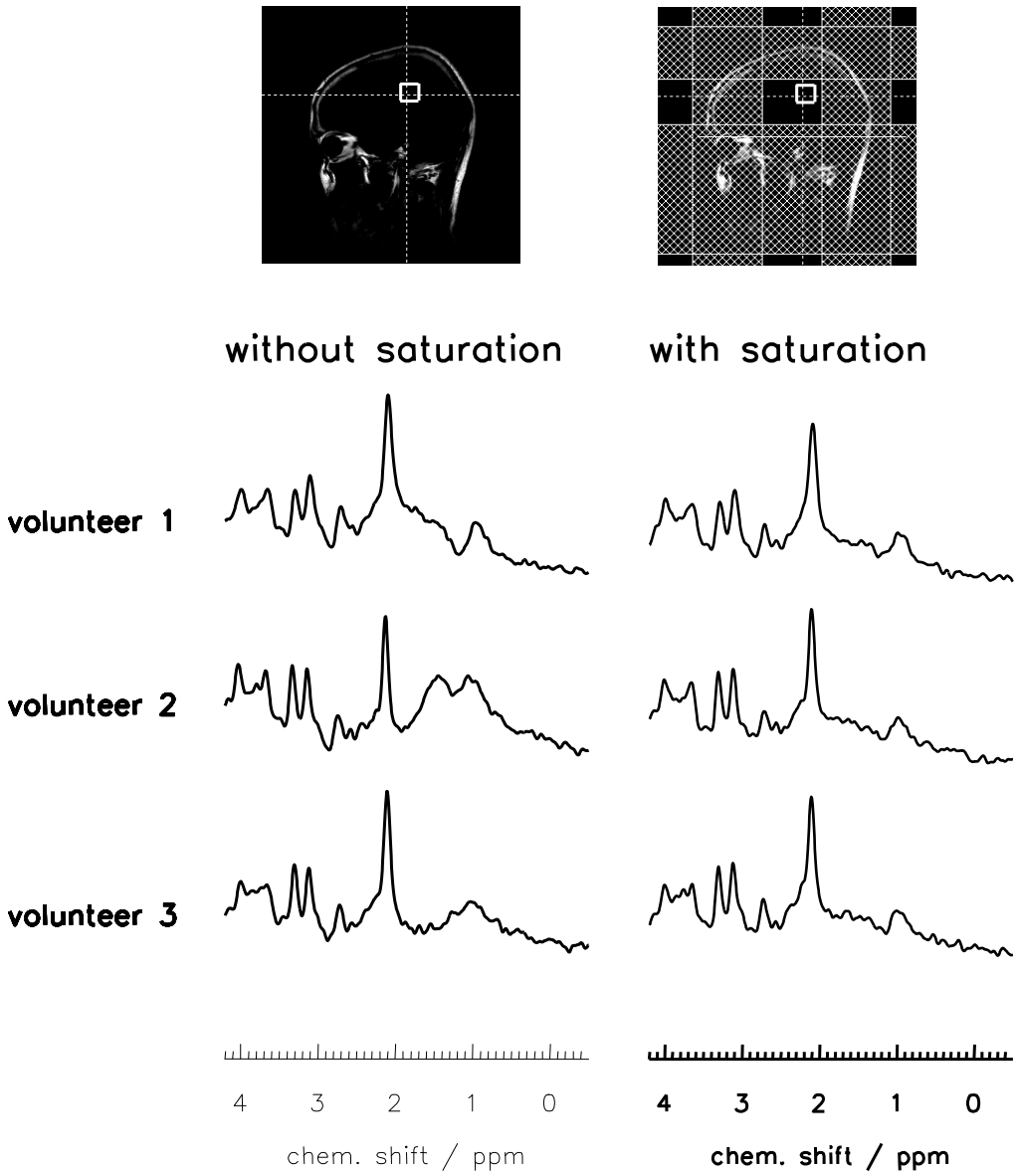

Abbildung 5

Auswirkungen der outer-volume-saturation (Seeger et al., 2001).

STEAM-Spektren (TR 1.5s, TE 15ms, TM 10 ms) dreier Probanden, mit (rechts) und ohne (links) räumliche Vorsättigung fetthaltiger Regionen. Die Spektren ohne Vorsättigung zeigen beträchtliche Schwankungen in der Spektralregion zwischen 0,5 und 2,0 ppm. Die mit Vorsättigung gemessenen Spektren sind in hohem Maße in der gleichen Spektralregion reproduzierbar, was auf verunreinigungsfreie Signale hinweist. Die Lage von vier der sechs Absättigungsschichten ist im oberen rechten Bild zu erkennen, eingeblendet in ein fettselektives Spinechobild.

2.1.5 Metaboliten in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie

2.1.5.1 N-Acetylaspartat

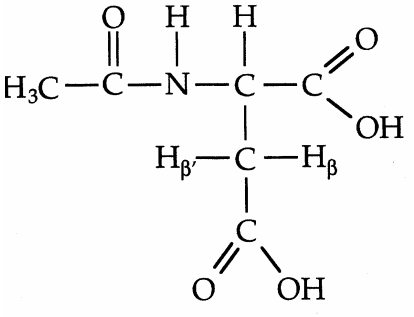

Abbildung 6

Molekülstruktur des N-Acetylaspartats (NAA)

Der N-Acetylaspartatpeak bei 2,02 ppm ist die prominenteste Resonanz im Protonenmagnetresonanzspektrum des gesunden Gehirns. Die übrigen Protonen des Moleküls erscheinen als zwei Doppelpeaks bei 2,49 und 2,69 ppm und als ein Zweifachdoppelpeak bei 4,69 ppm.

Die Einzelpeakresonanz bei 2,02 ppm hat eine verhältnismäßig lange T2-Relaxationszeit. Ihre Position im Spektrum ist bei unterschiedlicher Temperatur und physiologischen pH-Werten konstant. Diese Eigenschaften prädestinieren NAA als eine wertvolle innere Referenz für die *in-vivo* Protonenmagnetresonanzspektroskopie.

NAA stellt einen neuronalen Marker dar, der im reifen Hirn ausschließlich in Neuronen vorkommt (Birken and Oldendorf, 1989; Gill et al., 1989). Hieraus erklärt sich die weitverbreitete Nutzung des NAAs innerhalb der klinischen Protonenmagnetresonanzspektroskopie als Indikator für neuronaler Dysfunktion und Neuronenuntergang sowie der Krankheitsprogression bei zahlreichen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (Baslow, 2003) wie beispielsweise Schlaganfall (Gideon et al., 1992; Graham et al., 2001), Tumoren (Kugel et al., 1992; Mader et al., 1996), Multipler Sklerose (Davie et al., 1995; Inglese et al., 2003; Mader et al., 2001), Alzheimer Demenz (Herminghaus et al., 2003), Multisystematrophie (Watanabe et al., 2004) und SCA (Boesch et al., 2001;

Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Viau et al., 2005), bei denen allesamt Verminderungen des NAAs beschrieben wurden.

NAA und sein Abkömmling N-Acetylaspartylglutamat (NAAG), zusammen als NA abgekürzt, haben zahlreiche Funktionen innerhalb des ZNS. Unter anderem spielen sie eine wichtige Rolle innerhalb der Osmoregulation des Gehirns (Baslow, 2003) und es wird vermutet, dass sie innerhalb der zellulären Signalübertragung und damit bei der Regulation von Wechselwirkungen zwischen Gehirnzellen sowie der Reifung und Unterhaltung des ZNS mitwirken (Baslow, 2000). NAA und NAAG werden hauptsächlich in Neuronen synthetisiert, aber man hat festgestellt, dass sie einen trizellulären interkompartimentellen Kreislauf durchlaufen, während derer sie von Neuronen ausgeschüttet und danach durch katabolische Enzyme innerhalb von Oligodendrozyten und Astrozyten hydrolysiert werden, wie in Abbildung 7 dargestellt (Baslow, 2000). Innerhalb des Neurons kann NAA und NAAG mit Hilfe vorliegender Enzyme aufgebaut werden. Beide Stoffe können in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden. Die NAAG-Peptidase befindet sich auf der Oberfläche der Astrozyten und kann NAAG aufspalten, sowie Glutamat in Glutamin umwandeln. NAA wird vermutlich von den Oligodendrozyten aufgenommen, der einzigen Zelle innerhalb des Gehirns, die über die Enzyme zur gleichzeitigen Aufspaltung und Synthese von NAA verfügt. Weiterhin ist der Oligodendrozyt zum Aufbau von NAAG fähig. In bestimmten Stadien der Hirnentwicklung wird ein NAAG-vermittelter zellulärer Signalweg zwischen den Neuronen und den Astrozyten postuliert, der Verbindungen zwischen Neuronen und Astrozyten initiiert und ein weiterer, diesmal NAA-vermittelter Signalweg zwischen Neuronen und Oligodendrozyten, der die Myelinisierung einleitet (Baslow, 2000).

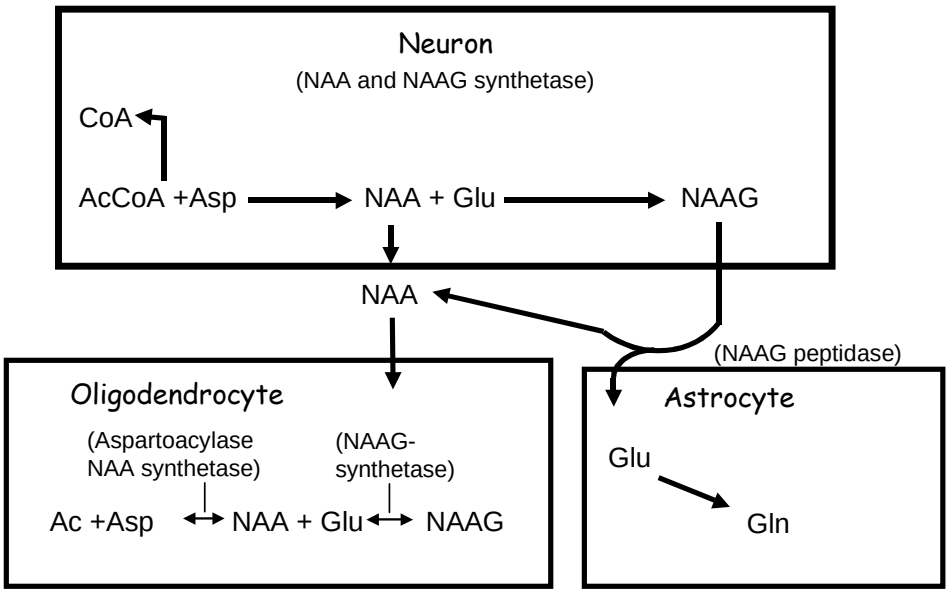

Abbildung 7

Trizellulärer NAA-NAAG-Hirnstoffwechselzyklus, Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten verknüpfend. Modifiziert nach M.H. Baslow (Baslow, 2000). NAA und NAAG sollen zumindest in bestimmten Stadien der Hirnentwicklung zu einem zellulären Signalweg beitragen.

2.1.5.2 Creatin/Phosphocreatin

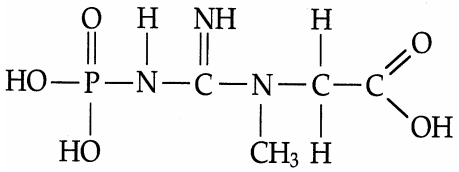

Abbildung 8
Molekülstruktur des Phosphocreatins

Die Resonanzen von Creatin (Cr) und Phosphocreatin (PCr), oft als Gesamtcreatin (tCr) bezeichnet, stellen sich als zwei Einzelpeakresonanzen bei 3,03 ppm und 3,93 ppm dar und sind im *in-vivo* Protonenmagnetresonanzspektrum nicht zu unterscheiden, da ihre chemische Verschiebung im schwachen Magnetfeld nahezu gleich ist.
Cr und PCr dienen als Energiepuffer zur Aufrechterhaltung eines konstanten Adenosintriphosphat(ATP)spiegels über die Creatinkinasereaktion (Kaemmerer et al., 2001). Sie kommen vorwiegend in Geweben mit schnellen Änderungen des Energieverbrauchs, wie Gehirn und Muskel, vor. Bei der Quantifizierung der tCr-Resonanz sollte mit Sorgfalt vorgegangen werden, da der Peak bei 3,93 ppm direkt durch den Wasserabsättigungspuls beeinflusst werden kann. Darüber hinaus kann der Vorsättigungspuls für den Wasserpeak Magnetisierungsübertragungseffekte auf die Creatinpeaks verursachen und damit eine niedrigere Konzentration vortäuschen (de Graaf et al., 1999; Dreher et al., 1994). Klinisch wird tCr oft als innere Referenz zur Erstellung eines Metabolitenverhältnisses herangezogen, da man davon ausgeht, dass seine Konzentration im Erwachsenenalter konstant bleibt. Jedoch wurden regionale Abweichungen bei gesunden Probanden beschrieben (Hennig et al., 1992; Mader et al., 2002b; Michaelis et al., 1993) ebenso wie Konzentrationsschwankungen bei Tumoren (Kugel et al., 1992; Mader et al., 1996), Schlaganfall (Gideon et al., 1992; Graham et al., 2001) Multipler

Sklerose (Inglese et al., 2003), Chorea Huntington (Tabrizi et al., 2005) und SCA (Viau et al., 2005).

2.1.5.3 Myoinositol

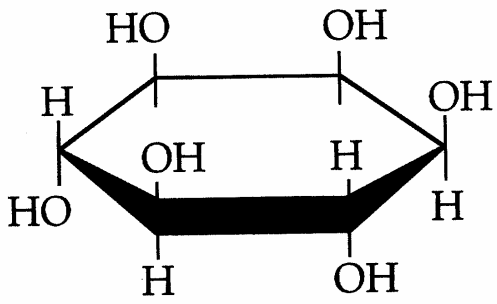

Abbildung 9
Molekülstruktur des Myoinositols

Myoinositol hat eine am stärksten ausgebildete Resonanz bei 3,54 ppm im *in-vivo* Protonenmagnetresonanzspektrum des menschlichen Gehirns, hervorgerufen durch die Protonen an C1 und C3.
Inositol wird als astrozytischer Marker angesehen und fungiert als Osmolyt. Ein hervorragendes klinisches Beispiel seiner osmolytischen Funktion ist die hepatische Encephalopathie, bei der Inositol zum osmotischen Ausgleich bei erhöhten Glutamin- und Glutamatspiegeln fortlaufend reduziert wird (Kreis et al., 1991; Naegele et al., 2000; Ross et al., 1996). Anderweitig sind Inositolmetaboliten von Interesse, da Inositolphosphat in intrazellulären Signalketten eingebettet zu sein scheint.

2.1.5.4 Cholinhaltige Verbindungen

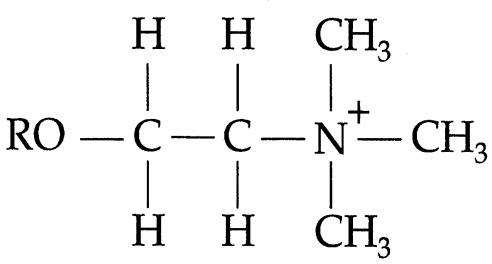

Abbildung 10
Molekülstruktur des Cholins

Die im *in-vivo* Protonenmagnetresonanzspektrum zu beobachtende Resonanz cholinhaltiger Verbindungen (Cho), setzt sich aus Phosphatidylcholin, Glycerophosphocholin und Sphingomyelin zusammen. Sie haben eine relativ große Resonanz bei 3,22 ppm aufgrund ihrer neun magnetisch gleichwertigen Protonen in drei Methylgruppen.
Cholinhaltige Verbindungen sind an der Myelinbiosynthese und dem Lipidtransport über den Methylgruppenstoffwechsel beteiligt. Sie sind Bestandteil wichtiger zellulärer Verbindungen, wie den Phospholipiden, über die sie eine wichtige Rolle im Membranstoffwechsel spielen (Bluml et al., 2003). Klinisch ist Cho unter anderem in Hirntumoren erhöht (Mader et al., 1996; Naegele et al., 2000) sowie bei akuter multipler Sklerose (Inglese et al., 2003; Mader et al., 2000; Mader et al., 2001). Verminderungen wurden bei SCA (Boesch et al., 2001; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998) und kindlicher Ataxie beschrieben (Bluml et al., 2003) .

2.1.5.5 Glutamin und Glutamat

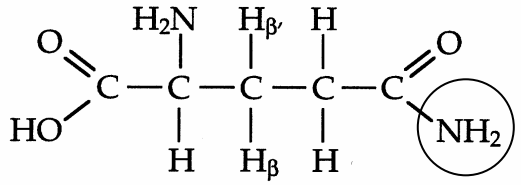

Abbildung 11

Molekülstruktur des Glutamins. Bei Glutamat ist die Aminogruppe (NH_2) durch eine Hydroxylgruppe (OH) ersetzt.

Die Sichtbarkeit der Glutamin- und Glutamatresonanzen im Protonenmagnetresonanzspektrum wird von starken Kopplungseffekten beherrscht. Folglich hängt ihr spektroskopisches Erscheinen von der Echozeit und der Feldstärke ab. Ihre Resonanzen sind in der Spektralregion zwischen 2,1 bis einschließlich 2,5 ppm und 3,6 bis 3,8 ppm (Kreis et al., 1991) zu finden. Da sie sich bei einer Feldstärke von 1,5 T sehr gleichen und daher schwer zu unterscheiden sind, werden sie als Summe von Glutamin und Glutamat (Glx) angezeigt.

Glutamat ist einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter des Zentralnervensystems, der in allen Gehirnzelltypen gefunden werden kann, auch wenn seine höchste Konzentration in Neuronen vorliegt. Das während der neuronalen Erregung in den synaptischen Spalt ausgeschütte Glutamat wird durch den Glutamattransporter GLT-1 bei einer sehr niedrigen Konzentration gehalten, um eine Übererregung zu vermeiden. Weiterhin sind ATP-abhängige Enzyme (Glutaminsynthetase, Glutaminase) innerhalb des Glutamatrücktransports zum präsynaptischen Neuron eingeschaltet, wo es entweder in Vesiceln gespeichert oder in den Citronensäurezyklus zur weiteren Verstoffwechselung eingeschleust werden kann (Bender et al., 2005). Die Glutaminsynthetase, die Glutamat zu Glutamin umwandeln kann, spielt eine zentrale Rolle bei der hepatischen Encephalopathie (Kreis et al., 1991; Naegele et al., 2000; Ross et al., 1996).

Bei Chorea Huntington, wie die SCA auch eine Polyglutaminerkrankung, konnten erhöhte Glx-Werte spektroskopisch festgestellt werden. Als Ursache wurde ein Fehler im zellulären Energiestoffwechsel und ein daraus resultierender Ausfall der ATP-abhängigen Enzyme im Glutamat-Glutamin-Kreislauf vermutet, wodurch Glutamat nicht mehr innerhalb sehr niedriger Konzentrationen gehalten werden kann und ein schleichender Zelltod durch chronische Übererregung eintritt (Bender et al., 2005; Masino et al., 2003; Taylor-Robinson et al., 1996).

2.1.5.6 Lactat

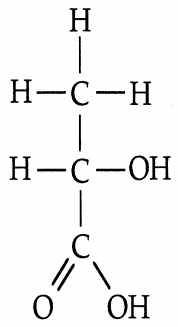

Abbildung 12
Molekülstruktur des Lactats

Das Resonanzspektrum des Lactats in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie setzt sich aus mehreren Anteilen zusammen. Die drei Protonen der Methylgruppe erzeugen ihre stärkste Resonanz als Doppelpeak bei 1.33 ppm, wohingegen das einzelne Methanproton bei 4.11 ppm die maximale Resonanz erreicht.
Lactat ist eng mit dem Glukose- und Mitochondrienstoffwechsel verknüpft und entsteht vor allem unter anaeroben Bedingungen, weswegen es als ein Indikator für Ischämie und Hypoxie angesehen wird und daher vor allem in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie nach Schlaganfällen große Bedeutung erfährt (Boesch et al., 2001; Graham et al., 2001). Darüber hinaus scheint Lactat eine Rolle als Derivat des Energiestoffwechsels im gesunden

Hirngewebe, wie in Abbildung 13 beschrieben, zu spielen, denn es konnte mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanzspektroskopie unter physiologischen Bedingungen ein Anstieg während visueller Stimulation nachgewiesen werden (Merboldt et al., 1992). Weiter wurde eine Lactatproduktion durch aktivierte Makrophagen unter aeroben Bedingungen nachgewiesen, die vor allem in der subakuten Entzündungsphase nach Schlaganfällen von Interesse ist (Graham et al., 2001; Lopez-Villegas et al., 1995).

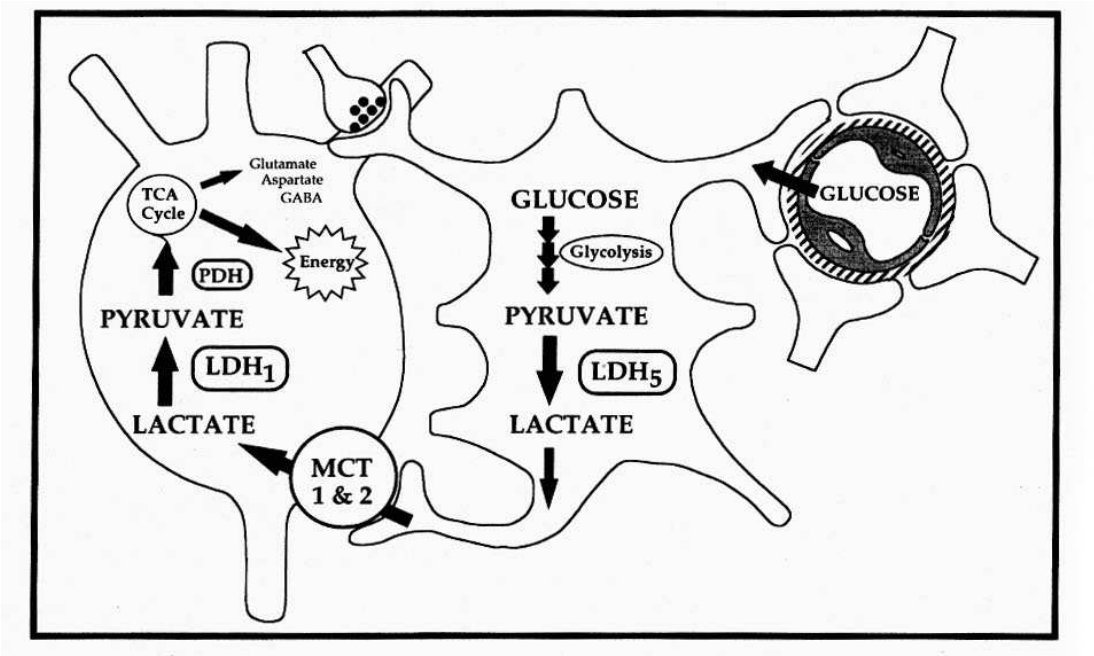

Abbildung 13

Energetische Funktion des Lactats, sogenannter Astrocyten-Neuronen-Lactattransport: Glucose wird aus dem Blutgefäß in den Astrocyten aufgenommen. Im Astrocyten wird Glucose zu Lactat abgebaut, das in das Neuron übertragen wird, wo es zu Pyruvat metabolisiert wird. Übernommen von Magistretti und Pellerin aus „Functional MRI“ (Magistretti and Pellerin, 1999)

2.1.6 Makromoleküle in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie

Protonenmagnetresonanzspektroskopie des Gehirns mit kurzen Echozeiten ermöglicht den Nachweis sogenannter Makromoleküle (MM) mit einem Molekülgewicht über 3500 Dalton, die einen breiten Unterbau unterhalb des Signals der Metaboliten mit geringerem Molekülgewicht bilden (Behar and Ogino, 1993; Hofmann et al., 2001; Hwang et al., 1996; Pfeuffer et al., 1999).
Verschiedene Versuche wurden unternommen, die makromolekularen Beiträge in der Baseline des Spektrums abzuschätzen, um so eine verlässliche Quantifizierung der Metaboliten zu erreichen (Hofmann et al., 2001; Seeger et al., 2003; Soher et al., 2000; Soher et al., 2001).
Andere Studien weisen auf eine möglicherweise pathologische Relevanz erhöhter Makromolekülresonanzen hin, zum Beispiel bei Schlaganfall oder Hirntumoren (Howe et al., 2003; Hwang et al., 1996). Die biochemische Identität der in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie erfassten makromolekularen Resonanzen ist nicht genau bekannt, aber sowohl Proteine als auch Lipide könnten zum MM-Signal beitragen.
Daten einer 2D-Korrelationsspektroskopie (COSY) in einem Rattenhirnschichtmodell nach Trauma und vorübergehendem Verschluss der A. cerebri media lassen darauf schießen, dass die Erhöhung des MM-Signals durch Acylgruppen in Lipiden hervorgerufen wird (Gasparovic and Berghmans, 1998; Gasparovic et al., 2001). Die Autoren diskutierten ihren Befund dahingehend, dass veränderte Makromoleküle bei Schlaganfallpatienten während der nachfolgenden subakuten Phase mobilen Lipiden in Makrophagen und anderen Zellen entsprechen könnten.
Im Gegensatz hierzu regten Behar und Mitarbeiter an, dass viele der im Protonenmagnetresonanzspektrum des gesunden Hirngewebes beobachteten makromolekularen Resonanzen eher von zytosolischen Proteinen als von Lipiden ausgehen (Behar and Ogino, 1993; Behar et al., 1994). In ihren *in-vitro* Studien an Menschen- und Rattenhirnen waren zytosolische Fraktionen und in ihren *in-vivo* Studien gut aufgelöste makromolekulare Resonanzen vorwiegend zwischen 0.9 und 3.0 ppm erfassbar. Die Behandlung der lipidfreien

zytosolischen Makromolekülfraktion mit Proteasen erlaubte die teilweise Zuordnung von Resonanzen des Protonenmagnetresonanzspektrums zu spezifischen Aminosäuren.

Makromoleküle besitzen kürzere T1-Relaxationszeiten als Metaboliten. Die Metaboliten haben T1-Relaxationszeiten von länger als 1200 ms (Wang and Li, 1998), wohingegen die Makromoleküle bei 0.9 ppm etwa T1-Relaxationszeiten von 200 ms aufweisen (Behar et al., 1994; Hofmann et al., 2001; Mader et al., 2001). So können die Metabolitensignale von den Makromolekülsignalen getrennt werden, indem man eine *inversion recovery* (IR)-Technik, die sogenannte *metabolite-nulling*-Methode (Behar et al., 1994), wie in Abbildung 14 gezeigt, verwendet. Ein einzelner Umkehrpuls wird für die Gesamtunterdrückung der Metaboliten benutzt.

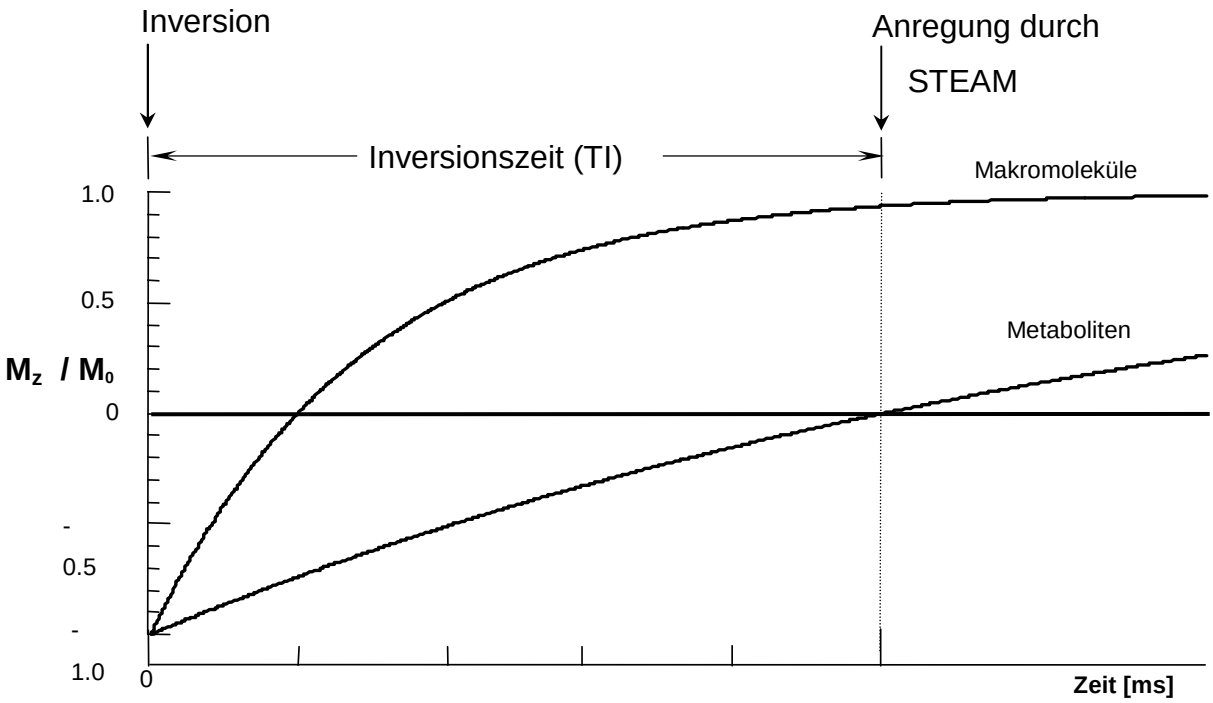

Abbildung 14

Prinzip des metabolite nulling (*Metabolitenunterdrückung*). *Abszisse: Zeit; Ordinate: Magnetisierung. Durch einen vorangehenden Umkehrimpuls wird die longitudinale Magnetisierung um 180° umgekehrt. Auf grund der längeren T1-Relaxationszeit der Metaboliten ist die Längsmagnetisierung der Metaboliten zu Beginn der STEAM-Erregung (Pfeil) gleich null. Zu dieser Zeit ist die longitudinale Magnetisierung der Makromoleküle wieder nahezu vollkommen ausgeprägt, wodurch ein Spektrum entsteht, in dem nur Makromoleküle sichtbar sind.*

Andere Forschungsgruppen entwickelten Verfahren zur optimierten Metabolitenunterdrückung (Hofmann et al., 2001), in denen sie mehrere Impulse vor dem Erregungsimpuls anwenden. Dennoch war die Anwendung eines einzelnen Umkehrimpulses in dieser Studie vollkommen ausreichend, um verlässliche Messungen physiologischer oder pathologischer Makromoleküle durchzuführen (Abbildung 15).

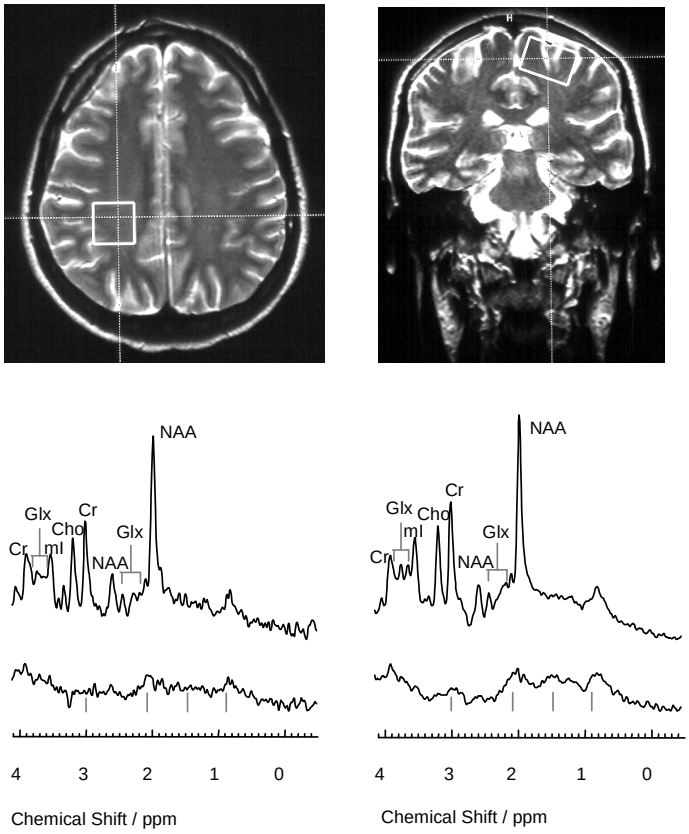

Abbildung 15

Normales Protonenmagnetresonanzspektrum der weißen und grauen Substanz
Obere Spalte: Dargestellt sind die volumes of interest *in weißer (links) und grauer (rechts) Substanz. Die Vorsättigungsregionen wurden zur besseren anatomischen Orientierung nicht eingezeichnet.*
Untere Spalte: Abgebildet sind die STEAM-Spektren (obere Linien) und die metabolitenunterdrückten *Spektren der weißen (links) und grauen (rechts) Substanz. Die Messparameter waren: TR 1,5 s; TE 15 ms; TM 10 ms; 128 Acquisitionen.*

In metabolitenunterdrückten Spektren konnten physiologische Makromoleküle bei 0.9; 1.5; 2.1 und 3.0 ppm reproduzierbar erfasst und bestimmt werden. Das makromolekulare Muster, das dem der Metaboliten im STEAM-Spektrum unterliegt, ist klar abzuschätzen. Unterschiede des Makromolekülgehalts zwischen anatomischen Regionen wurden beschrieben: So ist der

Makromolekülgehalt in supratentorieller grauer Substanz höher als in supratentorieller weißer Substanz (Hofmann et al., 2001; Mader et al., 2002b). Dabei ist er im Cerebellum genauso hoch wie im Motorkortex und supratentorielle weiße Substanz sowie der Pons zeigen ebenfalls gleiche Konzentrationen an Makromolekülen auf (Mader et al., 2002b).

2.2 Methoden

2.2.1 Ausrüstung

Sowohl die Magnetresonanzbildgebung (MRI) als auch die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) wurden an einem 1,5 Tesla Ganzkörpersystem durchgeführt (Magnetom Vision, Siemens AG, Erlangen, Germany). Eine zirkulär polarisierte Standardkopfspule wurde verwandt.

2.2.2 Sequenzen

Die Studie beinhaltete axiale, coronare und sagittale T2-gewichtete Turbospinechosequenzen des gesamten Gehirns mit folgenden Parametern: Repetitionszeit (TR) 5600 ms, effektive Echozeit (TEeff) 119 ms, Länge des Echozuges: 15, Schichtdicke 5mm mit 0,5 mm Zwischenschichtlücke, Auflösung: 210 $\times$ 256 Matrix sowie 3 Meßwiederholungen für die axialen und je einer Messwiederholung für die sagittalen und coronaren Aufnahmen (Mader et al., 2002b). Weiterhin wurden T1-gewichtete *Magnetisation Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo* (MPRAGE)-Sequenzen (TR 9,7 ms, TE 4 ms, Inversionszeit (TI) 39 ms) verwandt, um die spätere Segmentierung des untersuchten *volume of interest* in graue und weiße Substanz sowie Liquor cerebrospinalis (CSF) zu ermöglichen.

Die Spektroskopie wurde unter Verwendung einer von der Physikergruppe der Sektion für experimentelle Kernspinresonanz des ZNS des Universitätsklinikums Tübingen entwickelten Einzelvoxel-STEAM-Sequenz (Abbildung 16) mit folgenden Parametern durchgeführt: Repetitionszeit (TR) 3000 ms; Mixing Intervall (TM) 10 ms; Echozeit (TE) 15 ms; 64 Acquisitionen. Zwei Gauss'sche Pulse mit einer Bandbreite von 60 Hz wurden für die Wasserunterdrückung eingesetzt. Ein hyperbolischer Umkehrimpuls mit einer Inversionszeit (TI) von 750 ms wurde, wie in Abbildung 14 gezeigt, zur Metabolitenunterdrückung angewendet (Behar et al., 1994). Um eine

verlässliche Erfassung der Makromoleküle sicherzustellen, wurde eine optimierte Sequenz mit einer wirkungsvollen Unterdrückung der Lipidverunreinigungen von außerhalb des *volume of interest* verwendet (Seeger et al., 2001). Drei Paare rechtwinklig angeordneter Absättigungsschichten wurden auf jeder Voxelseite für die Vorsättigung fetthaltiger Regionen verwendet. Für jede Region erhielt man Spektren mit und ohne Metabolitenunterdrückung.

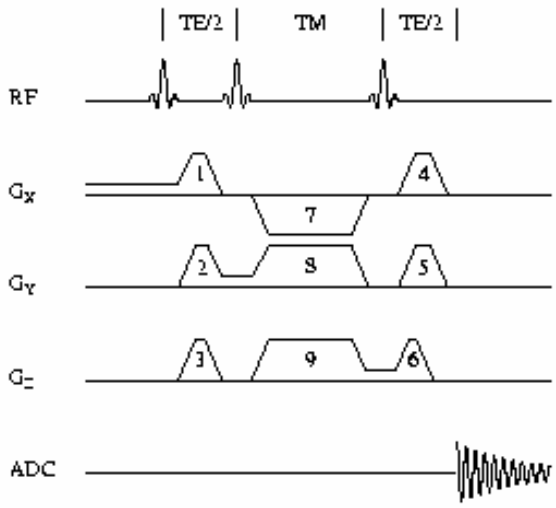

Abbildung 16
STEAM Sequenz bei lokalisierter Protonenmagnetresonanzspektroskopie (TE= 15ms). Die Gradienten 1 bis 9 zur Dephasierung unerwünschter Signale haben notwendigerweise eine hohe Amplitude um eine kurze Echozeit zu erhalten (Seeger et al.*,1999).*

Die beiden *volumes of interest* wurden innerhalb der Hirnregionen positioniert, in denen ein Neuronenuntergang bei spinocerebellarer Ataxie nachgewiesen wurde (Gilman et al., 1996; Guerrini et al., 2004). Weiterhin lag in diesen Regionen eine in der Magnetresonanzbildgebung signifikante Atrophie gegenüber Gesunden vor (Brenneis et al., 2003; Bürk et al., 1996; Mascalchi et al., 1998) und sie wurden bereits in vorangehenden Studien als Ort der VOI-

Positionierung gewählt (Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Viau et al., 2005).

Im Pons wurde das *volume of interest* auf Höhe des vierten Ventrikels positioniert und umfasste ein Volumen von 15 x 20 x 20 mm. Eine transversal zu coronare Kippung wurde angewandt, um nur ein Minimum an Liquor cerebrospinalis einzubeziehen und eine Beteiligung des angrenzenden fetthaltigen Knochenmarks der Schädelbasis zu vermeiden (Mader et al., 2002b) (siehe Abbildung 17).

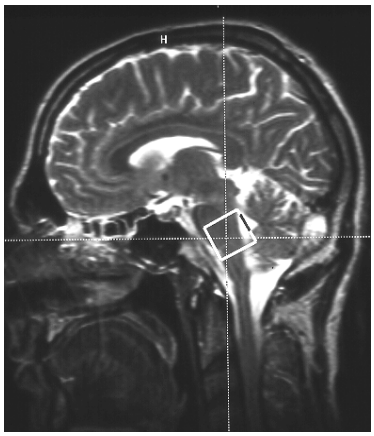

Abbildung 17

Position des volume of interest *im Pons*

Im Kleinhirn wurde das *volume of interest* in der linken Hemisphäre positioniert. Das Volumen von 20 x 20 x 20 mm enthielt weiße und graue Substanz, wobei nur minimale Beteiligungen von Liquor cerebrospinalis beabsichtigt waren (Mader et al., 2002b) (siehe Abbildung 18).

Abbildung 18

Position des volume of interest *im Cerebellum*

2.2.3 Absolute Quantifizierung

Zur Quantifizierung der Metaboliten- und Makromolekülresonanzen, wurde das kommerziell erhältliche, benutzerunabhängige Programm *LCModel* (Version 5.2.-2) (Provencher, 1993), das in der Frequenzdomäne arbeitet, erweitert (Seeger et al., 2003; Seeger et al., 2001).

LCModel analysiert ein *in vivo* Spektrum als lineare Kombination einer Basisreihe von Modellspektren. Diese Modellspektren wurden mit Hilfe von Metabolitenmodellösungen aufgenommen. Die anfängliche Basisreihe bestand aus Modellspektren von 15 Hirnmetaboliten, die üblicherweise zur Auswertung von *in vivo* Hirnspektren mit LCModel benutzt werden, wie in Abbildung 19 dargestellt.

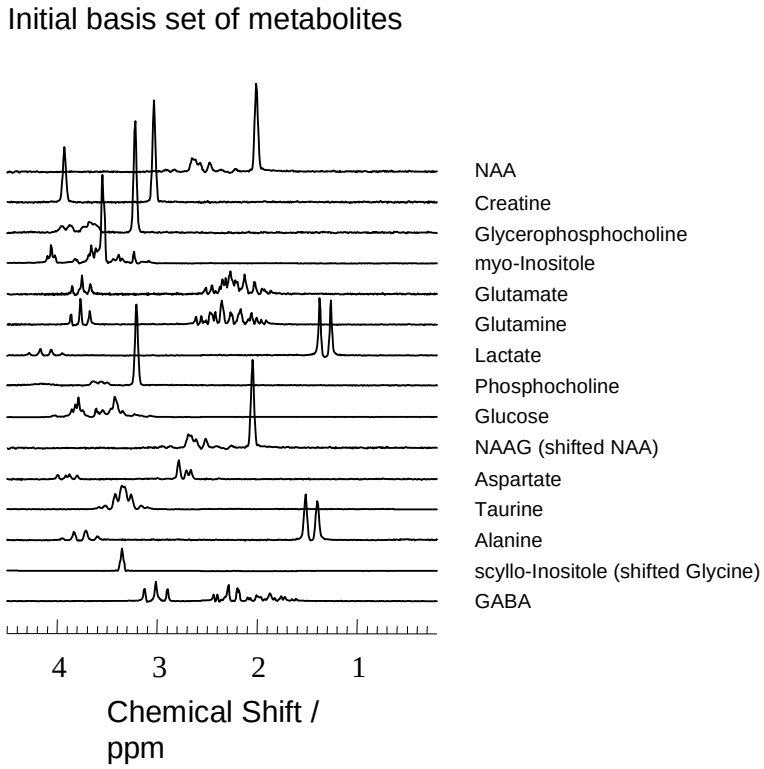

Abbildung 19

Anfängliche Basisreihe der Metabolitenmodellspektren

Die Anpassungsautomatik des LCModel analysiert ein in vivo Spektrum als lineare Kombination einer Basisreihe von Modellspektren. Die Basisreihe aus 15 Metabolitenspektren der Modelllösungen ist hier verdeutlicht.

Diese Basisreihe war im Rahmen von Vorarbeiten (Mader et al., 2002b; Mader et al., 2001; Seeger et al., 2003; Seeger et al., 2001) um Komponenten für Makromoleküle und Lipide erweitert worden. Allerdings konnten Modellösungen für Makromoleküle und Lipide *in vitro* nicht hergestellt werden, so dass die Modellkomponenten von parametrisierten *in vivo* Spektren abgeleitet wurden. Zu diesem Zweck zog man metabolitenunterdrückte Spektren heran, um Metabolitenbeteiligungen zu vermeiden, welche die Parametrisierung beeinflussen könnten. Das physiologische Makromolekülmuster des gesunden Gehirns stellte sich in metabolitenunterdrückten Spektren zuverlässig dar und wurde in vier breite Linien parametrisiert (siehe Abbildung 20). Diese vier

Kurven beinhalteten hervortretende Resonanzen, die bereits in einer Vorstudie Aminosäuren innerhalb von Proteinen zugeordnet wurden (Behar et al., 1994).

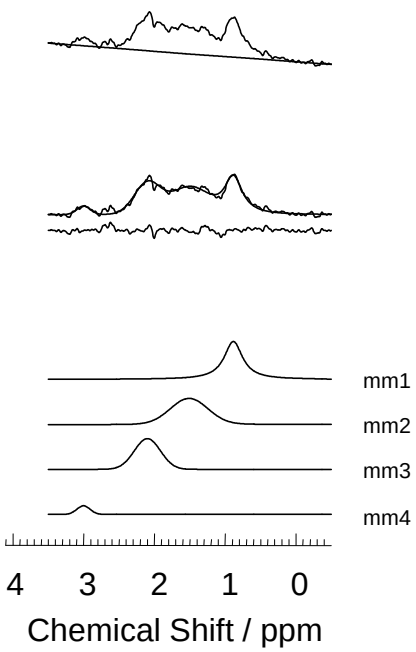

Abbildung 20

Parametrisierung der Makromoleküle in metabolitenunterdrückten Spektren Nach Subtraktion der flachen Modellkurve des Restwassers (obere Linie), wurden die Spektren parametrisiert, indem man sie an vier breite Linien anpasste. Die Gesamtanpassung der Spektren ist in der Mitte zu erkennen, zusammen mit den Anpassungsresten. Die bei der Anpassung verwendeten Modelllinien sind in den unteren vier Linien dargestellt.

Da die Makromolekülresonanz mm1 bei 0.9 ppm an der gleichen Stelle wie die Lipidresonanz der CH_3-Gruppen der Lipide auftritt, wurde nur eine Komponente in der Basisreihe benutzt, um beide Resonanzen darzustellen, da Beiträge von beiden in Spektren mit Lipidbeteiligung bei 1,5 T nicht zu trennen sind. Diese gemeinsame Linie, die in die Basisreihe aufgenommen wurde, erhielt die Bezeichnung lipmm1. Weiterhin wurde eine Verknüpfung der Lipidkurven lip2, lip3, lip4 und lip5 zu einem Grundmuster (lip_c) vorgenommen, wodurch man die verlässlichste Trennung der Lipide und Makromoleküle erreichte. Mit dieser Kombination konnte eine augenscheinlich falsche Zuordnung zwischen

Makromolekülen und Lipiden in der Spektralregion zwischen 1.8 und 2.4 ppm vermieden werden.

Tabelle 3

Ergebnisse der Makromolekül- und Lipidparametrisierung

§ Die Basiskomponente lipmm1 stellt die mm1- und lip1-Kurven dar. Die vier Lipidkurven lip2 bis lip5 wurden zu dem Grundmuster lip_c zusammengefügt.

** Die chemische Verschiebung bezieht sich auf Cholin bei 3.22 ppm*

+ Diese Parameter wurden während der Parametrisierung festgesetzt

Angepasste Kurve	Basis-komponente §	Position *	Line shape
lip1	lipmm1	0.89 ppm	Lorentzian
lip2	lip_c	1.30 ppm	Lorentzian
lip3	lip_c	2.05 ppm	Gaussian
lip4	lip_c	2.24 ppm	Gaussian
lip5	lip_c	2.81 ppm	Gaussian
mm1	lipmm1	0.89 ppm+	Lorentzian
mm2	mm2	1.51 ppm	Gaussian
mm3	mm3	2.10 ppm	Gaussian
mm4	mm4	3.00 ppm+	Gaussian

Insgesamt wurden fünf unabhängige Komponenten für Makromoleküle und Lipide zur anfänglichen Standardbasisreihe des LCModel hinzugefügt. Hierbei handelt es sich um die Kurve lipmm1 (mögliche Makromolekül- und Lipidbeiträge bei 0.9 ppm darstellend), die Kurve lip_c (festgelegte Kombination anderer Lipidkurven) und mm2 bis mm4 (drei weitere Makromolekülkomponenten bei 1.5 ppm [mm2], bei 2.1 ppm [mm3] und 3.0 ppm [mm4]). Somit bestand die erweiterte Basisreihe aus 15 Metabolitenspektren und 5 unabhängigen Komponenten für Makromoleküle und

Lipide, wie in Tabelle 3 zusammengefasst und in Abbildung 21 dargestellt. Die erweiterte Basisreihe wurde zur Anpassung aller *in vivo* Spektren bei der endgültigen Auswertung verwendet.

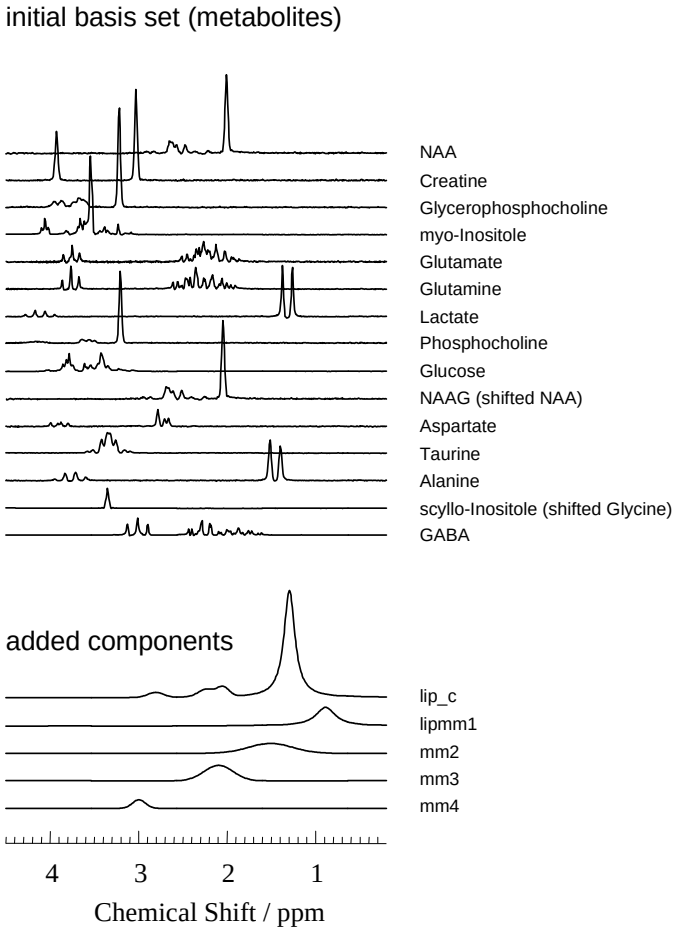

Abbildung 21

Vollständige erweiterte Modellreihe für die Anpassungsroutine LCModel. Die anfängliche Basisreihe aus 15 Metabolitenspektren aus Modellösungen (oberer Teil) wurde durch Hinzufügung von 5 Basiskomponenten für Lipide und Makromoleküle (unterer Teil), erweitert. Vier der fünf parametrisierten Kurven (lip2 bis lip5) wurden zu dem festgelegten Grundmuster lip_c verknüpft. Die Basiskomponente lipmm1 stellt die beiden parametrisierten Kurven lip1 und mm1 dar, die Lipid- und Makromolekülanteile bei 0.9 ppm wiederspiegeln.

Effekte der Repetitions (TR)- und Inversionszeiten (TI) wurden nicht korrigiert. Da die gewählte TR und TI deutlich länger als die dreifache T1-Zeit der Makromoleküle war, ist davon auszugehen, dass Sättigungseffekte in einem Ausmaß von unter 3 % vorliegen. Die Summe aus N-Acetylaspartat und N-Acetylaspartylglutamat (NA), Creatin (Cr), Cholin (Cho), Myoinositol (Ins) und die Summe aus Glutamin und Glutamat (Glx) wurden unter Verwendung der erweiterten Basisreihe, aus den Spektren ohne Metabolitenunterdrückung absolut quantifiziert. Die Makromoleküle wurden aus den metabolitenunterdrückten Spektren quantifiziert.

2.2.4 Segmentierung

Die gemessenen Metaboliten und Makromoleküle liegen mit Ausnahme des Lactats ausschließlich in der grauen und weißen Substanz und nicht im Liquor cerebrospinalis vor. Aufgrund der mit der SCA einhergehenden Pons-, Medulla- und Kleinhirnatrophie ist der Anteil an Liquor erhöht, was zu einer deutlichen Verfälschung der Konzentrationsangaben führt. Um die Konzentration der Metaboliten und Makromoleküle im *volume of interest* (VOI) genau zu bestimmen, muss dieses in die Anteile an grauer und weißer Substanz bzw. Liquor segmentiert werden. Über das resultierende tatsächliche Messvolumen kann dann eine entsprechende Korrektur der durch LCModel erhaltenen Werte durchgeführt werden.

Zur Segmentierung wurde ein durch Dr. rer. nat. Dipl. phys. Michael Erb (Sektion für experimentelle Kernspinresonanz des ZNS, Universitätsklinikum Tübingen) weiterentwickeltes Programm auf der Basis von spm99 (statistical parametrics maps; Wellcome Department of Cognitive Neurology) verwendet, das die Partialvolumina an grauer und weißer Substanz sowie an Liquor des *volume of interest* bestimmte.

Da die Spektroskopie anhand von T2-gewichteten Turbospinechosequenzen (2D-Datensätze), bestehend aus 20 Schichten mit 5mm Schichtdicke und 0,5 mm Zwischenschichtlücke durchgeführt wurde, stellte sich das Problem der für

die Segmentierung zu geringen Auflösung. Daher wurden hochauflösende T1-gewichtete *Magnetisation Prepared Rapid Acquisition Gradient Echo* (MPRAGE)-Sequenzen (3D-Datensätze) mit 160 Schichten angefertigt.

Die vorliegenden 3D-Datensätze waren in einem Scanner-Koordinatensystem orientiert. Um eine Verarbeitung der Sequenzen in spm99 zu ermöglichen, mussten sie zunächst in ein von spm99 lesbares Format konvertiert werden, das sogenannte ANALYZE 7 Format. Dabei wurden die Sequenzen von einem, an Millimeter-Koordinaten ausgerichteten Format in ein an Voxel-Koordinaten ausgerichtetes transformiert. Dieses besteht aus 4 Dateien:

Die Image-Datei (*.img*) besteht aus einem Vektor von Voxelwerten, welche die Helligkeitswerte des Bildes wiedergeben.

Die Header-Datei (*.hdr*) enthält Informationen über Bildgröße (DIM), Voxelgröße (VOX), Datentyp (TYPE), Skalierunskoeffizient (SCALE), Verschiebung der Voxelwerte in *.img (OFFSET), Ursprung der Kopf-Koordinaten (ORIGIN) und eine kurze Beschreibung (DESCRIP). Die Sequenzen waren normalisiert und somit in einem rechtshändigen Koordinatensystem orientiert (x-Achse: von links nach rechts; y-Achse: von dorsal nach rostral; z-Achse: von caudal nach cranial).

Die Matrix-Datei (*.mat) enthält eine Zuordnung der Voxel-Koordinaten (x_0, y_0, z_0) zu den Kopfkoordinaten (x_1, y_1, z_1), die in der Header-Datei als VOX und ORIGIN vorliegen. Die entstehende Matrix stellt eine affine Transformation zwischen den Koordinaten mit folgender Form dar:

$$\left\{\begin{aligned} x_1 &= M_{1,1}x_0 + M_{1,2}y_0 + M_{1,3}z_0 + M_{1,4} \\ y_1 &= M_{2,1}x_0 + M_{2,2}y_0 + M_{2,3}z_0 + M_{2,4} \\ z_1 &= M_{3,1}x_0 + M_{3,2}y_0 + M_{3,3}z_0 + M_{3,4} \end{aligned}\right\}$$

Entspricht Bild 1 eine Matrix M_1 und Bild 2 eine Matrix M_2, so ist die Verbindung beider Bilder M_2/ M_1.

Die Position-Datei (*.pos) enthält die Verbindung zwischen Voxel- und Scanner-Koordinatensystem. Diese Beziehung ist wie in der vorherigen Datei in einer Matrix gespeichert (Valsasina, 2001).

Nachdem die 2D- und 3D-Datensätze aus zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessenen Sequenzen bestehen, war es nötig, die Aufnahmen auf ein gemeinsames Koordinatensystem zu beziehen, da die Position des Kopfes sich verändern konnte und das Voxel-Koordinatensystem folglich unterschiedliche Bezugspunkte hatte. Es musste gewährleistet sein, dass das in den T2-Bildern festgelegte VOI der entsprechenden Region in den T1-gewichteten Bildern genau entsprach.
Als Ursprungspunkt des neuen Kopfkoordinatensystems wählte man die *Commissura anterior*, da sie in sagittalen Aufnahmen meist als gut abgrenzbare Struktur zwischen dem *Rostrum* des *Corpus callosum* und der *Fornix* zu erkennen ist. Sie wurde in den Datensätzen als Nullpunkt innerhalb der sagittalen, axialen und coronaren Schnitte festgelegt, sodass ein einheitliches Millimeter-Koordinatensystem für alle Aufnahmen jedes einzelnen Patienten und Probanden vorlag (Valsasina, 2001).

Die unterschiedlichen Relaxationszeiten grauer und weißer Substanz bzw. des Liquor cerebrospinalis erlauben eine Zuordnung bestimmter Helligkeitsbereiche zu bestimmten Gewebearten. Bei der gebietsorientierten Segmentierung wird nicht nur der aktuelle Pixel, sondern auch die Umgebenden zu der Entscheidung herangezogen, welcher Gewebeart der Pixel zugeordnet wird.
Der zur Segmentierung implementierte Algorithmus besteht aus drei Teilen:
Zuerst wurde das aufgenommene Bild über eine affine Transformation auf eine Vorlage bezogen. Dieser Vorgang wird als *template* bezeichnet.
Danach wurde eine *cluster analysis* durchgeführt, um die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit jedes Pixels zu jeder Gewebeart abzuschätzen und zu optimieren. Die entsprechende Wahrscheinlichkeit wurde über eine modifizierte Form des Algorithmus *mixture model* berechnet.
Abschließend wurden die Ergebnisse der Segmentierung in Form von drei Bildern dargestellt (siehe Abbildung 22), die jeweils nur den Anteil an grauer oder weißer Substanz bzw. an Liquor des segmentierten Bildes darstellen. Der Helligkeitswert der einzelnen Pixel gibt dabei die Wahrscheinlichkeit wieder, dass der Pixel grauer oder weißer Substanz bzw. Liquor angehört. Die

einzelnen Bilder tragen die Endungen _seg1.img für graue Substanz (GM), _seg2.img für weiße Substanz (WM) und _seg3.img für Liquor (CSF) (Valsasina, 2001).

Die Inhomogenitäten der MRI-Bilder wurden mit Hilfe eines multiplikativen Modells korrigiert. Ziel dieser Korrektur war es, ein Unregelmäßigkeitfeld U zu bestimmen und dieses zu eliminieren.

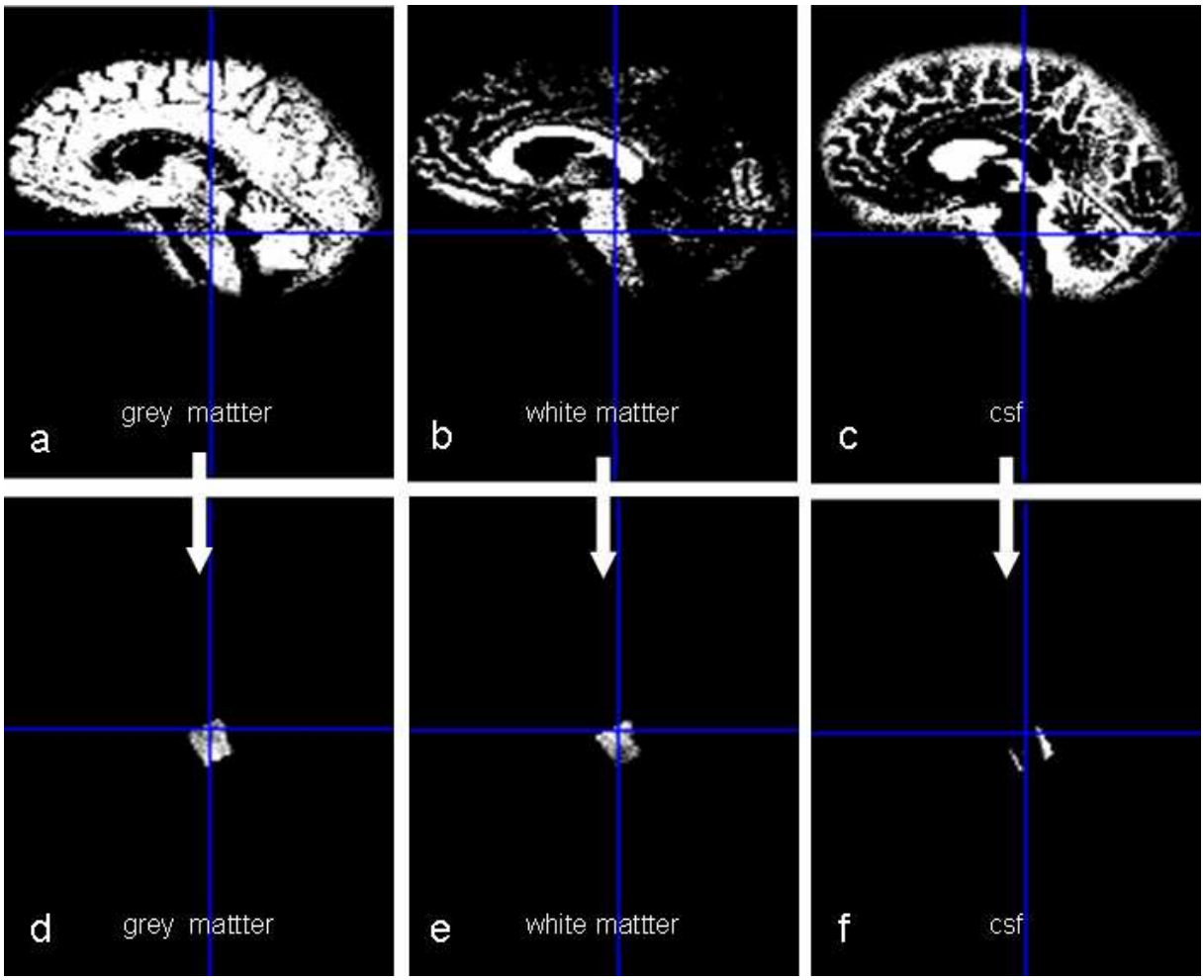

Abbildung 22

Segmentierte MPRAGE-Aufnahme: Die drei oberen Einzelbilder verdeutlichen den jeweiligen Anteil an grauer und weißer Substanz bzw. Liquor der zuvor segmentierten Aufnahme sowie darunter den jeweiligen Anteil auf das volume of interest *bezogen. Der Liquoranteil wurde zur nachfolgenden Messwertekorrektur eingesetzt.*

Da in einigen Fällen Bilder aus Messungen an unterschiedlichen Tagen vorlagen, wurde eine *between modality coregistration* durchgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Bilder zu erreichen. Ziel dieses Vorgangs ist, eine Matrix zu berechnen, die eine affine Transformation enthält, welche die Koordinaten des *object*-Bildes (in dem das VOI ausgerichtet wurde) mit den Koordinaten des *target*-Bildes (auf das das VOI übertragen werden soll) verbindet.
Zur Koregistrierung wurden zwei Vorlagen ($\mathbf{t_f}$ und $\mathbf{t_g}$) der beiden zu vergleichende Bilder **f** und **g** verwendet.
Zuerst wurde eine affine Transformation zwischen den Vorlagen und den Bildern bestimmt. Danach wurden die Bilder, wie zuvor beschrieben, segmentiert. Zuletzt koregistrierte man die segmentierten Bilder, indem man eine Matrix fand, welche die zuvor segmentierten Bilder über eine affine Transformation zwischen den Koordinaten verbindet, wodurch die Konvergenz beider Bilder erreicht wurde (Valsasina, 2001).

Bis zu diesem Punkt wurde das gesamte 3D-Bild segmentiert und die affine Transformation bezog sich auf die Raumkoordinaten des segmentierten Bildes und des Bildes, indem das VOI ausgewählt wurde.
Um nun das VOI korrekt in das segmentierte Bild zu überlagern, wurde ein *Reslice* des VOI auf das segmentierte Bild vorgenommen. Hierbei entstehen vier Bilder:
Im ersten ist das in das segmentierte Bild überlagerte VOI wiedergegeben. Die restlichen drei enthalten die segmentierten Anteile des VOI (siehe Abbildung 22). Aus ihnen wurde zum Abschluss der prozentuale Anteil an grauer und weißer Substanz bzw. Liquor des VOI berechnet (Valsasina, 2001). Über den resultierenden Liquoranteil konnte dann eine Korrektur der Messwertkonzentrationen erfolgen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Für die Berechnungen zur Beschreibung der Versuchspersonen wurde eine SPSS-Software, Version 10.0, benutzt.
Die deskriptive Statistik der Metaboliten- und Makromolekülkonzentrationen wurde unter Bearbeitung mit einer Excel Microsoft Office 2000 Professional Software, Version 9.00.2816 (Microsoft Corporation, 2000) sowie einer SPSS-Software, Version 10.0 erstellt.
Die statistischen Berechnungen wurden unter Verwendung der JMP Software Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary NC, USA, 2002) im Institut für medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen durchgeführt.
Die Metaboliten- und Makromolekülkonzentrationen in den beiden Untersuchungsregionen der Patienten- und Probandengruppe wurden auf Normalverteilung und Varianzgleichheit überprüft.
Zur Überprüfung der Altersgleichverteilung wurde ein t-Test unter Annahme gleicher Varianzen angewandt. Für den Nachweis der Gleichverteilung des Geschlechts wurde eine Kontingenzanalyse nach Patienten-/Probandengruppe durchgeführt.
Die Ponsregion betreffend, wurde bei nachgewiesener Normalverteilung und Gleichheit der Varianzen für die Metaboliten NA, Cho und Glx ein t-Test durchgeführt. Beim Vergleich der Konzentrationen der Metaboliten Cr, Ins und der Makromolekülanteile lipmm1, mm2, mm3, mm4 kam ein Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test (Rangsummentest) zur Anwendung, da eine Normalverteilung nicht gegeben war (siehe Tabelle 4).
Für Ins, das im Pons pathologische Konzentrationen aufwies, wurde ein Korrelationskoeffizient mit der Erkrankungsdauer berechnet (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4

Durchgeführte statistische Tests für die Untersuchungsregion Pons

Getestete Größe	Normalverteilung	Varianzgleichheit	angewandter statistischer Test
NA	ja	ja	t-Test
Cr	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
Cho	ja	ja	t-Test
Ins	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
Glx	ja	nein	Welch Test (t-Test für ungleiche Varianzen)
Lipmm1	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm2	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm3	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm4	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
Ins mit Erkrankungsdauer	nein	entfällt	Korrelationskoeffizient

Für das Cerebellum wurden die Metaboliten NA, Cr und Glx nach Nachweis der Normalverteilung und gleicher Varianzen, mittels eines t-Tests untersucht. Die Konzentrationen der Metaboliten Ins und Cho sowie der Makromolekülanteile lipmm1, mm2, mm3, mm4 wurden mit Hilfe eines Wilcoxon/Kruskal-Wallis Tests (Rangsummentest) verglichen, da keine Normalverteilung vorlag (siehe Tabelle 5).

Für die Metaboliten NA, Cr die im Cerebellum pathologische Konzentrationen aufwiesen, wurden Korrelationskoeffizienten mit der Erkrankungsdauer berechnet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5

Durchgeführte statistische Tests für die Untersuchungsregion Cerebellum

Getestete Größe	Normalverteilung	Varianzgleichheit	angewandter statistischer Test
NA	ja	nein	Welch Test (t-Test für ungleiche Varianzen)
Cr	ja	ja	t-Test
Cho	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
Ins	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
Glx	ja	nein	Welch Test (t-Test für ungleiche Varianzen)
lipmm1	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm2	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm3	nein	nein	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
mm4	nein	ja	Wilcoxon/Kruskal-Wallis Test
NA mit Erkrankungsdauer	ja	entfällt	Korrelationskoeffizient
Cr mit Erkrankungsdauer	ja	entfällt	Korrelationskoeffizient

Um weitere Effekte der Krankheit auf Metaboliten und Makromolekülanteile zu berechnen, wurden aufgrund fehlender Normalverteilung beim Makromolekülanteil mm3, Rangkorrelationen nach Spearman's Rho errechnet, wobei nach der Region stratifiziert wurde. Untersucht wurden die Rangkorrelationen von NA zur Anzahl der CAG-Repeats, Glx zur Anzahl der CAG-Repeats und mm3 zur Anzahl der CAG-Repeats (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6

Durchgeführte statistische Tests für die Untersuchungsregionen Pons und Cerebellum

Getestete Größe	Normalverteilung	Varianzgleichheit	angewandter statistischer Test
NA mit CAG-Repeatanzahl	ja	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho
Glx mit CAG-Repeatanzahl	ja	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho
mm3 mit CAG-Repeatanzahl	nein	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho
Glx mit NA	ja	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho
mm3 mit NA	nein	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho
mm3 mit Glx	nein	entfällt	Rangkorrelation nach Spearman's Rho

Eine weitere Stratifizierung nach der Region und dem SCA-Subtypen wurde nach Spearman's Rho für Glx zu NA, mm3 zu NA und mm3 zu Glx durchgeführt (siehe Tabelle 6).

Eine Korrektur für multiples Testen wurde nach Bonferroni/Holm jeweils für die Untersuchungsregionen Pons bzw. Cerebellum durchgeführt (siehe Tabelle 7 und Tabelle 8). Eine Korrektur der für beide Untersuchungsregionen durchgeführten Tests war aufgrund fehlender Signifikanz nicht nötig.

Tabelle 7

Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni/Holm für die Untersuchungsregion Pons

Metabolit/ Makromolekülanteil	Unkorrigierter p-Wert	Faktor	Korrigierter p-Wert
Ins	0.002	10	0.02
NA	0.014	9	0.126
Glx	0.078	8	nicht signifikant
mm4	0.160	7	nicht signifikant
Cr	0.274	6	nicht signifikant
mm2	0.397	5	nicht signifikant
mm3	0.635	4	nicht signifikant
lipmm1	0.635	3	nicht signifikant
Cho	0.649	2	nicht signifikant
Ins mit Erkrank-ungsdauer	0.777	1	nicht signifikant

Tabelle 8

Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni/Holm für die Untersuchungsregion Cerebellum

	Unkorrigierter p-Wert	Faktor	Korrigierter p-Wert
NA	0.0004	11	0.0044
Cr	0.004	10	0.04
Cho	0.048	9	0.432
Ins	0.131	8	nicht signifikant
mm4	0.227	7	nicht signifikant
mm3	0.246	6	nicht signifikant
Lipmm1	0.486	5	nicht signifikant
Cr mit Erkrank-ungsdauer	0.601	4	nicht signifikant
mm2	0.693	3	nicht signifikant
Glx	0.894	2	nicht signifikant
NA mit Erkrank-ungsdauer	0.901	1	nicht signifikant

2.3 Versuchspersonen

2.3.1 Patienten

Bei den an spinocerebellarer Ataxie erkrankten Patienten wurden zwei verschiedene anatomische Regionen untersucht, in denen nach heutiger Vorstellung der Fokus der Erkrankung zu suchen ist: Der Pons und das Cerebellum (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18).

2.3.1.1 Untersuchungsregion Pons

Für die Ponsregion wurden 11 Patienten untersucht, davon 7 männliche und 4 weibliche (siehe Tabelle 9). Der Altersmedian betrug 43 Jahre mit einer Altersspanne von 29 – 62 Jahren (siehe Tabelle 10).

Tabelle 9
Geschlechtsverteilung der Patienten für die Untersuchungsregion Pons

Geschlecht Patienten	Anzahl Patienten
Männlich	7
Weiblich	4
Gesamt	11

Tabelle 10
Altersmedian und Alterspanne der Patienten für die Untersuchungsregion Pons

Anzahl Patienten	Altersmedian [Jahre]	Altersspanne [Jahre]
11	43	29 - 62

5 Patienten waren am SCA-Subtyp 1 erkrankt, 4 am Subtyp 2 und 2 am Subtyp 3 (siehe Tabelle 11). Bei den 5 SCA1-Patienten betrug die Erkrankungsdauer 2

bis 12 Jahre, das Alter bei der Erstmanifestation lag zwischen 33 und 42 Jahren und die Anzahl der CAG-Trinukleotidrepeats betrug zwischen 43 und 49 (siehe Tabelle 12). 2 Patienten waren männlich und 3 weiblich (siehe Tabelle 11).
Die 4 SCA2-Patienten waren zwischen 5 und 12 Jahren lang erkrankt. Das Erstmanifestationsalter bewegte sich zwischen 18 und 57 Jahren und die Anzahl der CAG-Repeats lag zwischen 35 und 44 (siehe Tabelle 12). Es handelte sich um 3 männliche Patienten und eine weibliche Patientin (siehe Tabelle 11).
Die 2 SCA3-Patienten litten seit 13 beziehungsweise 14 Jahren an ihrer Erkrankung. Sie trat zum ersten Mal mit 33 und 39 Jahren auf und es fand sich bei ihnen jeweils eine CAG-Repeatanzahl von 73 (siehe Tabelle 12). Beide waren männlich (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11
Geschlechtsverteilung der Patienten für die Untersuchungsregion Pons

Geschlecht Patienten	SCA1 Anzahl Patienten	SCA2 Anzahl Patienten	SCA3 Anzahl Patienten
Männlich	2	3	2
Weiblich	3	1	0
Gesamt	5	4	2

Tabelle 12
Erkrankungsdauer, Alter bei Erstmanifestation und Anzahl der CAG-Repeats der Patienten für die Untersuchungsregion Pons

SCA-Subtyp	Erkrankungs-Dauer [Jahre]	Alter bei Erstmani-festation [Jahre]	Anzahl der CAG-Repeats
1	2 - 12	33 - 42	43 - 49
2	5 - 12	18 - 57	35 - 44
3	13 - 14	33 - 39	73

2.3.1.2 Untersuchungsregion Cerebellum

Für die Cerebellumregion wurden 12 Patienten untersucht, davon 7 männliche und 5 weibliche mit einem Altersmedian von 43 Jahren und einer Altersspanne von 29 – 62 Jahren (siehe Tabelle 13 und Tabelle 14).

Tabelle 13
Geschlechtsverteilung der Patienten für die Untersuchungsregion Cerebellum

Geschlecht Patienten	Anzahl Patienten
Männlich	7
Weiblich	5
Gesamt	12

Tabelle 14
Altersmedian und Alterspanne der Patienten für die Untersuchungsregion Cerebellum

Anzahl Patienten	Altersmedian [Jahre]	Altersspanne [Jahre]
12	43	29 - 62

5 Patienten waren am SCA-Subtyp 1 erkrankt, 5 am Subtyp 2 und 2 am Subtyp 3 (siehe Tabelle 15).
Die Erkrankung dauerte bei den 5 SCA1-Patienten zwischen 2 und 12 Jahren an und trat im Alter zwischen 33 und 42 Jahren auf. Die Anzahl der CAG-Trinucleotidrepeats betrug zwischen 43 und 49 (siehe Tabelle 16). 2 Patienten waren männlich, 3 weiblich (siehe Tabelle 15).
Bei den 5 SCA2-Patienten lag die Erkrankungsdauer zwischen 5 und 12 Jahren. Das Alter der Erstmanifestation bewegte sich zwischen 18 und 57 Jahren und die Anzahl der CAG-Repeats lag zwischen 35 und 44 (siehe

Tabelle 16). Es handelte sich um 3 männliche und 2 weibliche Patienten (siehe Tabelle 15).

Die 2 SCA3-Patienten litten 13 beziehungsweise 14 Jahre an ihrer Erkrankung, die im Alter von 33 und 39 Jahren auftrat. Die Anzahl der CAG-Repeats betrug bei beiden 73 und beide waren männlich (siehe Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15

Geschlechtsverteilung der Patienten für die Untersuchungsregion Cerebellum

Geschlecht Patienten	SCA1 Anzahl Patienten	SCA2 Anzahl Patienten	SCA3 Anzahl Patienten
Männlich	2	3	2
Weiblich	3	2	0
Gesamt	5	5	2

Tabelle 16

Erkrankungsdauer, Alter bei Erstmanifestation und Anzahl der CAG-Repeats der Patienten für die Untersuchungsregion Cerebellum

SCA-Subtyp	Erkrankungs-Dauer [Jahre]	Alter bei Erstmani-festation [Jahre]	Anzahl der CAG-Repeats
1	2 - 12	33 - 42	43 - 49
2	5 - 12	18 - 57	35 - 44
3	13 - 14	33 - 39	73

2.3.2 Probanden

Bei den nach Alter und Geschlecht gematchten gesunden Probanden wurden ebenfalls die Regionen Pons und Cerebellum untersucht (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18).

2.3.2.1 Untersuchungsregion Pons

Für die Ponsregion wurden 20 Probanden mit einem Altersmedian von 40 Jahren und einer Altersspanne von 27 – 62 Jahren untersucht (siehe Tabelle 18). 13 der Probanden waren männlich und 7 weiblich (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17
Geschlechtsverteilung der Probanden für die Untersuchungsregion Pons

Geschlecht Probanden	Anzahl Probanden
Männlich	13
Weiblich	7
Gesamt	20

Tabelle 18
Altersmedian und Alterspanne der Probanden für die Untersuchungsregion Pons

Anzahl Patienten	Altersmedian [Jahre]	Altersspanne [Jahre]
20	40	27 - 62

2.3.2.2 Untersuchungsregion Cerebellum

Die Untersuchung des Cerebellums wurde bei 16 Probanden durchgeführt, deren Altersmedian 43 Jahre betrug und deren Altersspanne sich von 31 – 63 Jahren erstreckte (siehe Tabelle 20). 10 der Probanden waren männlich und 6 weiblich (siehe Tabelle 19).

Tabelle 19

Geschlechtsverteilung der Probanden für die Untersuchungsregion Cerebellum

Geschlecht Probanden	Anzahl Probanden
Männlich	10
Weiblich	6
Gesamt	16

Tabelle 20

Altersmedian und Alterspanne der Probanden für die Untersuchungsregion Cerebellum

Anzahl Patienten	Altersmedian [Jahre]	Altersspanne [Jahre]
16	43	31 - 63

3 Ergebnisse

3.1 Metaboliten

Nachdem Lactat beim überwiegenden Teil der Messungen unter der Nachweisgrenze lag, wurde es in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Es wurden lediglich die Konzentrationen von N-Acetylaspartat und N-Acetylaspartylglutamat (NA); Creatin (Cr), Cholin (Cho), Glutamin und Glutamat (Glx) sowie Myoinositol (Ins) ausgewertet.

3.1.1 Untersuchungsregion Pons

Im Pons der Patienten war die Myoinositolkonzentration im Vergleich zu den Probanden signifikant erhöht (p_{korr}= 0.02) (siehe Abbildung 23). Die Konzentration des N-Acetylaspartats/N-Acetylaspartylglutamats war bei den Patienten gegenüber den Probanden nach Korrektur für multiples Testen nicht signifikant verändert (p_{korr}= 0.126). Der unkorrigierte p-Wert lag hier bei p_{unkorr}= 0.014 (siehe Abbildung 24). Für Glutamin/Glutamat konnte lediglich eine verminderte Varianz der Konzentrationen bei den Patienten im Vergleich zu den Probanden, nicht aber ein signifikanter Unterschied beobachtet werden (siehe Abbildung 25). Für Creatin und Cholin ließen sich keine signifikanten Veränderungen nachweisen. In Tabelle 21 wird eine Übersicht der Metabolitenkonzentrationen im Pons gegeben.

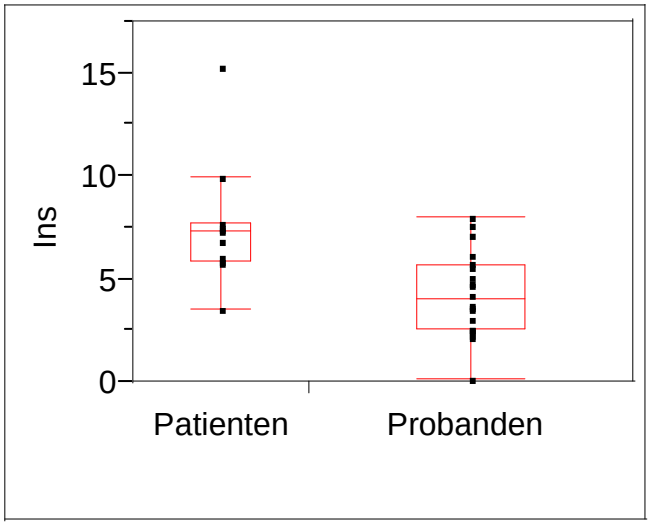

Abbildung 23

Vergleich der absoluten Myoinositolkonzentration im Pons;

p_{korr}= 0.02/ p_{unkorr}= 0.002

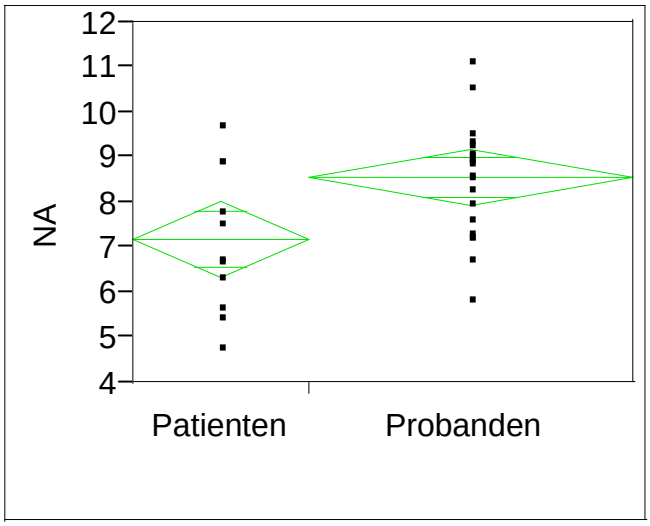

Abbildung 24

Vergleich der absoluten N-Acetylaspartat/N-Acetylaspartylglutamat-konzentration im Pons; p_{korr}= 0.126/ p_{unkorr}= 0.014

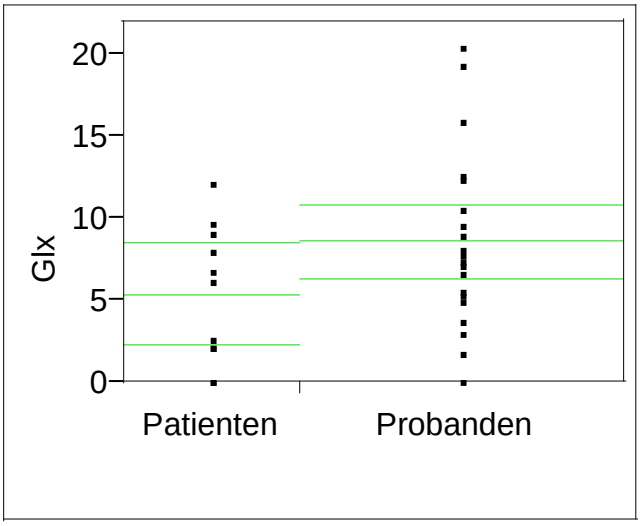

Abbildung 25

Vergleich der absoluten Glutamin/Glutamatkonzentration im Pons;

p_{korr}= 0.624/ p_{unkorr}= 0.078.

Auffällig ist die verminderte Varianz der Glutamin/Glutamatkonzentration bei den Patienten.

Tabelle 21

Liquorkorrigierte absolute Konzentrationen der Metaboliten in der Ponsregion

Signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Probanden: $^{*}p_{korr}<0.05$

Metabolit	Patienten			Probanden		
[mMol/l]	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall
NA	7,18	5,62	4,87 - 6,40	8,55	7,34	6,81 - 8,00
Cr	5,52	4,38	3,37 - 5,31	5,03	4,09	3,94 - 4,73
Cho	1,84	1,47	1,29 - 1,61	1,91	1,56	1,48 - 1,81
Ins	7,59*	5,89*	4,34 - 7,61	4,27*	3,66*	2,82 - 4,55
Glx	5,34	4,49	2,02 - 6,42	8,56	6,66	5,18 - 9,35

3.1.2 Untersuchungsregion Cerebellum

Das Cerebellum betreffend, zeigte sich bei den Patienten eine signifikante Erniedrigung der N-Acetylaspartat/N-Acetylaspartylglutamatkonzentration im Vergleich zu den Probanden (p_{korr}= 0.0044) (siehe Abbildung 26). Die Creatinkonzentration im Cerebellum der Patienten war gegenüber den Probanden signifikant erhöht (p_{korr}= 0,04) (siehe Abbildung 27). Bei Cholin, Myoinositol und Glutamin/Glutamat wurden keine signifikanten Konzentrationsunterschiede beobachtet.
Die Metabolitenkonzentrationen im Cerebellum sind in Tabelle 22 dargestellt.

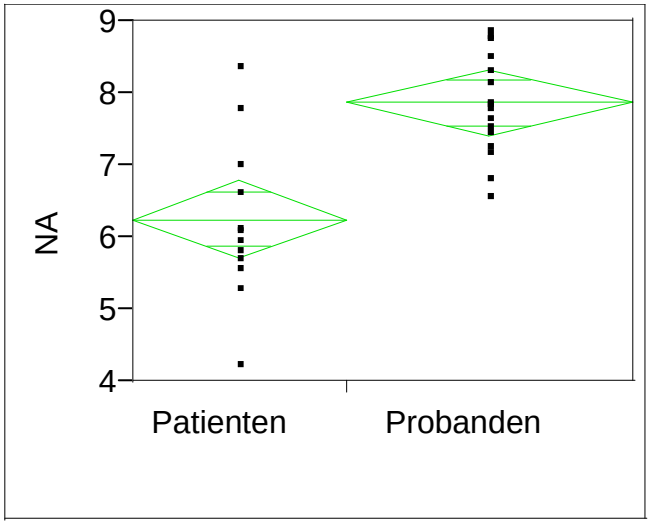

Abbildung 26

Vergleich der absoluten N-Acetylaspartat/N-Acetylaspartylglutamat-konzentration im Cerebellum; p_{korr}= 0.0044/ p_{unkorr}= 0.0004.

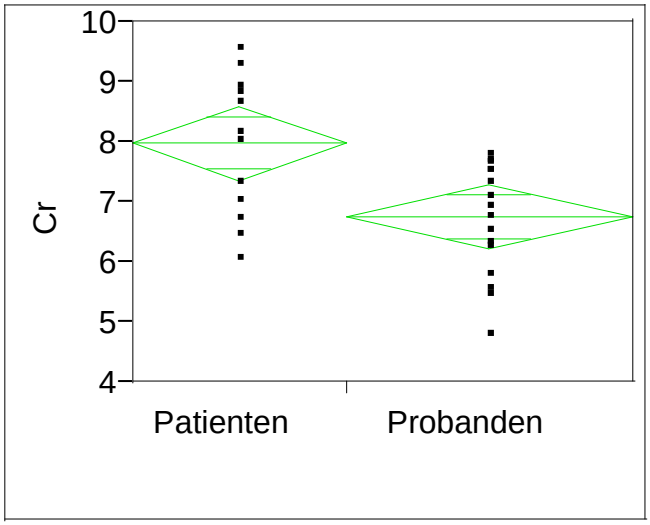

Abbildung 27

Vergleich der absoluten Creatinkonzentration im Cerebellum;

p_{korr}= 0.04/ p_{unkorr}= 0.004.

Tabelle 22

Liquorkorrigierte absolute Konzentrationen der Metaboliten in der Cerebellumregion

Signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Probanden: ** *p_{korr} <0.005*

* *p_{korr} <0,05*

Metabolit	Patienten			Probanden		
[mMol/l]	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall
NA	6,25**	5,50**	4,93 - 6,55	7,86**	7,72**	7,39 - 8,14
Cr	7,98*	7,39*	6,53 - 8,08	6,74*	6,86*	6,20 - 7,14
Cho	1,58	1,42	1,20 - 1,66	1,70	1,66	1,55 - 1,80
Ins	5,47	4,62	3,90 - 5,98	4,80	4,65	3,95 - 5,53
Glx	9,63	8,99	6,73 - 11,00	9,43	8,52	7,15 - 11,49

3.2 Makromoleküle

Der Lipidanteil lip_c lag beim überwiegenden Teil der Messungen unter der Nachweisgrenze und wurde deshalb in der statistischen Auswertung nicht berücksichtigt. Ausgewertet wurden hingegen die Konzentrationen der Makromolekülanteile lipmm1, mm2, mm3 und mm 4.

3.2.1 Untersuchungsregion Pons

Im Bereich des Pons gab es keinen signifikanten Unterschied der Makromolekülanteile lipmm1, mm2, mm3 und mm 4 zwischen Patienten und Probanden. Darüber hinaus wurde auch keine Tendenz zu einem nichtsignifikanten Unterschied sichtbar. Tabelle 23 verdeutlicht die Makromolekülkonzentrationen im Pons.

Tabelle 23
Liquorkorrigierte absolute Makromolekülkonzentrationen (magnetresonanzspektroskopisch erfassbare Proteine in [mMol/l]) in der Ponsregion

Makro-moleküle	Patienten			Probanden		
[mMol/l]	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall
lipmm1	4,62	4,18	2,19 - 4,99	5,13	4,33	3,56 -5,29
mm2	4,19	3,31	1,48 - 5,32	5,41	5,10	3,46 - 5,93
mm3	5,07	4,66	3,04 - 5,01	5,70	4,69	4,35 - 5,52
mm4	1,43	1,30	0,79 - 1,50	1,06	0,86	0,70 - 1,14

3.2.2 Untersuchungsregion Cerebellum

Im Cerebellum konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Makromolekülanteile lipmm1, mm2, mm3 und mm 4 zwischen Patienten und Probanden nachgewiesen werden. Des weiteren zeichneten sich auch hier keine Tendenzen zu einem nichtsignifikanten Unterschied ab. Die Makromolekülkonzentrationen im Cerebellum sind in Tabelle 24 abgebildet.

Tabelle 24
Liquorkorrigierte absolute Makromolekülkonzentrationen (magnetresonanzspektroskopisch erfassbare Proteine in [mMol/l]) in der Cerebellumregion

Makro-moleküle	Patienten			Probanden		
[mMol/l]	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall	Mittelwert	Median	95% Konfidenz-intervall
Lipmm1	4,90	4,12	2,94 - 5,93	5,77	5,73	4,70 - 6,69
mm2	8,40	8,63	5,73 - 9,58	9,45	9,37	8,12 - 10,56
mm3	8,59	7,72	6,17 - 9,61	7,63	7,26	6,96 - 8,12
mm4	1,78	1,61	1,34 - 1,89	1,55	1,44	1,26 - 1,80

3.3 Abhängigkeit von der Erkrankungsdauer

Für die Metaboliten Na, Cr und Ins, die im Cerebellum bzw. Pons pathologische Konzentrationen gezeigt hatten, wurden keine Korrelationen mit der Erkrankungsdauer gefunden.

3.4 Abhängigkeit von der Anzahl der CAG-Repeats

Beim Vergleich von NA, Glx und mm3 mit der Anzahl der CAG-Repeats, stratifiziert nach den beiden Untersuchungsregionen, konnten keine Korrelationen nachgewiesen werden.

3.5 Abhängigkeit vom SCA-Subtyp

Eine weitere Stratifizierung nach Region und SCA-Subtyp ergab für NA mit Glx, mm3 mit NA und mm3 mit Glx ebenfalls keine Korrelationen.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wir stellten eine signifikante Erhöhung der Inositolkonzentration ($p < 0.05$) bei den an SCA erkrankten Patienten innerhalb des Pons fest.
Im Cerebellum wiesen wir eine signifikante Verringerung der N-Acetylaspartatkonzentration ($p < 0.005$) und eine signifikant erhöhte Creatinkonzentration ($p < 0.05$) bei den SCA Patienten nach.
Bei den übrigen Metaboliten konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb beider Untersuchungsregionen festgestellt werden.
Hervorzuheben ist dabei, das sich bei den Glutamin/Glutamatkonzentrationen keine Unterschiede ergaben, abgesehen von einer auffällig verminderten Varianz der Konzentrationen bei den SCA Patienten innerhalb des Pons. Ebenso waren die Makromolekülkonzentrationen, welche das proteingebundene Glutamin/Glutamat wiederspiegeln könnten, zwischen der Patienten- und Probandengruppe unverändert.

Abschließend wurde kein Zusammenhang der Metaboliten- und Makromolekülkonzentrationen mit der Erkrankungsdauer, der Anzahl der CAG-Repeats bzw. dem SCA-Subtyp der Patienten gefunden.

4 Diskussion

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit richtete sich auf die Frage nach der spektroskopischen Erfassbarkeit der bei spinocerebellarer Ataxie entstehenden veränderten intrazellulären Proteine. Ursächlich hierfür sind verlängerte CAG-Repeats der betreffenden Genloci auf Chromosom 6p22-p24 für SCA1, Chromosom 12q23-24.1 für SCA2 und Chromosom 14q32.1 für SCA3 verantwortlich (Kawaguchi et al., 1994; Martin, 1999; Robitaille et al., 1997). Diese codieren auch beim Gesunden für die Ataxin 1, Ataxin 2 und Ataxin 3 genannten Proteine. Bei den an SCA Erkrankten entstehen aufgrund der verlängerten CAG-Repeats Polyglutaminstränge, da die Basenabfolge CAG für Glutamin codiert (Klockgether et al., 2000; Paulson, 2000; Rüb et al., 2003a). Diese Polyglutaminstränge verursachen eine Proteinaggregation und die Bildung neuronaler intranuclearer Einschlüsse (*nuclear inclusions;* NIs*)*, einem Hauptmerkmal der Polyglutaminerkrankungen (Cummings and Zoghbi, 2000; Zoghbi and Orr, 1999). Es wird vermutet, dass die aufgrund der Polyglutaminstränge fehlgefalteten Ataxine durch Proteasome nicht abgebaut werden können. So kommt es zu einer ubiquitinvermittelten Aggregation der Proteine innerhalb der NIs. Eine experimentelle Hemmung der Ubiquitinierung führte eine geringere Anzahl an NIs unter gleichzeitiger Zunahme des Zelluntergangs mit sich. Dies legt nahe, dass die mutierten Ataxine toxischer sind, wenn sie nicht ubiquitiniert und innerhalb der NIs abgelagert werden und somit die Bildung der NIs als zellprotektiv anzusehen ist (Colomer Gould, 2005; Cummings et al., 1999; Cummings and Zoghbi, 2000; Saudou et al., 1998).

4.1 Makromoleküle

Glutamin- und glutamathaltige Makromoleküle können mit Hilfe der Protonenmagnetresonanzspektroskopie nachgewiesen werden (Behar and Ogino, 1993). Unter Anwendung der *metabolite-nulling*-Methode konnten Resonanzen für an Makromoleküle gebundenes Glutamin und Glutamat bei

2.05 und 2.29 ppm innerhalb einer cytosolischen Hirngewebslösung bei 8.4 Tesla zugeordnet werden (Behar et al., 1994). Eine entsprechende Makromolekülresonanz bei 2.1 ppm konnte auch bei 1.5 Tesla entdeckt werden und wurde in das zur unserer Datenauswertung benutzte erweiterte Quantifizierungsprogramm LCModel eingearbeitet (Seeger et al., 2003).

In vitro konnten die Polyglutaminstränge in Ataxin 3 durch Protonen- bzw. ^{15}N-Magnetresonanzspektroskopie sichtbar gemacht werden. Hierbei wurde nachgewiesen, dass die Glutaminseitenstränge der Polyglutaminregion zu den scharfen Resonanzpeaks in menschlichem Ataxin 3 bei 7.49 und 6.83 ppm beitragen (Masino et al., 2003). Bei der X-chromosomalen spino-bulbären Muskelatrophie, nach ihrem Erstbeschreiber auch Kennedy-Krankheit genannt, handelt es sich um eine weitere Polyglutaminerkrankung (Cummings and Zoghbi, 2000; Mader et al., 2002a). Hier fanden sich erhöhte Makromolekülkonzentrationen bei 0.9 ppm in der Protonenmagnetresonanzspektroskopie, die allerdings nicht makromolekülgebundenem Glutamat und Glutamin zugeordnet werden konnten, sondern ihren Ursprung vermutlich in einem anderen bei der Erkrankung entstehenden pathologischen Protein haben (Mader et al., 2002a).

In dieser Untersuchung konnten wir keinerlei signifikante Unterschiede der Makromolekülkonzentrationen zwischen an SCA Erkrankten und Gesunden feststellen, noch zeigten sich nichtsignifikante Tendenzen zu Konzentrationsunterschieden ab.

Die bei an SCA Erkrankten zu findenden polyglutaminstranghaltigen Ataxine sowie ihre Aufspaltungsprodukte scheinen bei der *in vivo* Spektroskopie nicht direkt sichtbar zu sein. Dies mag einerseits durch die polyglutaminregionvermittelte partielle Proteinaggregation zu ß-Faltblattstrukturen bedingt sein, wie sie für Ataxin 3 gezeigt wurde (Bevivino and Loll, 2001). So wird vermutet, dass die verlängerte Glutaminsequenz einerseits zu einer Instabilität des Ataxins und somit zum *domain-swapping*, einem Trennen und Vertauschen der verschiedenen Proteindomänen führt. Weiterhin zeigen die aufgebrochenen Polyglutaminsequenzen eine starke Tendenz zur Aggregation der Proteindomänen in Form von ß-Faltblattstrukturen

(Bevivino and Loll, 2001). Andererseits könnte ein Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten auch zu einer kompakteren Molekülstruktur führen (Masino et al., 2003). Erst kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass nichtpathologisches Ataxin 3 als ein deubiquitinierendes Enzym im Ubiquitin-Proteasom Signalweg fungiert und über Bindung und Einkürzung von Ubiquitinketten an der Proteinaggregatbildung selbst beteiligt ist (Burnett and Pittman, 2005). Weitere Bindungspartner innerhalb zellulärer Signalketten, wie z.B. das *valosin-containing protein* (VCP), einem Chaperonmolekül mit vielfältiger intrazellulärer Wirkung, sind bekannt (Albrecht et al., 2004; Masino et al., 2003). Beide Annahmen, das Vorliegen als ß-Faltblatt oder die Bindung an zelluläre Komponenten würden die Abschirmung der pathologischen Genprodukte erklären und damit die Tatsache, dass sie *in vivo* spektroskopisch nicht nachweisbar sind.

4.2 Metaboliten

Grundsätzlich stellt sich bei neurologischen Erkrankungen, die mit einer Atrophie der untersuchten Hirnregion einhergehen, das Problem der Metabolitenkonzentrationsverfälschung aufgrund des gesteigerten Anteils an Liquor cerebrospinalis innerhalb des *volume of interest*. In Vorstudien wurde diesem Problem mit dem Versuch bei der Voxelpositionierung möglichst wenig Liquor einzubeziehen und der Bildung von Metabolitenverhältnissen begegnet (Boesch et al., 2001; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998), obwohl durchaus volumetrische Daten an Pons und Cerebellum erhoben wurden (Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998). Metabolitenverhältnisse sind innerhalb von Studien zwar besser zu vergleichen, da sie paremeterunabhängig sind. Allerdings sind in der Angabe absoluter Konzentrationen zusätzliche Informationen enthalten und es besteht nicht das Problem der Verhälnisnormalisierung, wobei zum Beispiel eine Veränderung im Nenner ohne Veränderung des Zählers einen Unterschied der Untersuchungsgruppen vortäuschen könnte oder im umgekehrten Fall einen

Gruppenunterschied verbirgt (Viau et al., 2005). Bei Guerrini *et al.* finden sich absolute Konzentrationen, die jedoch weder einer Partialvolumenkorrektur unterzogen, noch mit dem gleichen Quantifizierungsprogramm errechnet wurden (Guerrini et al., 2004). Andere Forschungsgruppen führten eine gemittelte Partialisierung nach grauer Substanz, weißer Substanz und Liquor für die komplette Untersuchungsgruppe durch (Bartha et al., 2000).

In dieser Studie wurde mit Hilfe des jeweiligen dreidimensionalen MPRAGE-Datensatzes eine Segmentierung des *volume of interest* bei jedem Untersuchten für beide Untersuchungsregionen durchgeführt, wodurch eine nachfolgende Partialvolumenkorrektur der Metabolitenkonzentrationen für den Anteil an Liquor durchgeführt werden konnte. Hierdurch wurde eine deutlich verbesserte Erfassung pathologisch veränderter Metabolite in dieser Studie ermöglicht. Viau *et al.* haben in ihrer kürzlich erschienene Studie ebenfalls eine Segmentierung des VOI zur Erfassung des Liquoranteils und anschließender Partialvolumenkorrektur der Metabolitenkonzentrationen durchgeführt. Dabei nutzten sie die zur Voxelpositionierung erstellten T2-gewichteten Turbospinechobilder. Die Metabolitenquantifizierung wurde wie in dieser Studie mit Hilfe von LCModel durchgeführt, so dass in diesem Fall ein direkter Vergleich der Konzentrationen in Erwägung gezogen werden könnte. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Repetitionszeiten (TR) zur absoluten Quantifizierung erscheint ein direkter Vergleich der absoluten Konzentrationen allerdings weiterhin schwierig und nur bedingt sinnvoll.

Nichtsdestotrotz können die in unserer Studie entdeckten Unterschiede zwischen SCA Patienten und Probanden durchaus mit den Daten der vorherigen Studien verglichen werden (Viau et al., 2005).

4.2.1 Freies Glutamin und Glutamat

Beim Abbau der polyglutaminhaltigen Ataxine durch Proteasome könnte ungebundenes Glutamin freigesetzt werden, eingedenk der Tatsache, dass die verlängerte Polyglutaminsequenz die Ataxine an eben dieser Stelle destabilisiert (Burnett and Pittman, 2005; Griffin et al., 2004). In einer SCA3 Modellstudie an transgenen Mäusen konnte Grifffin *et al* erhöhtes Glutamin in Hirngewebslösungen sowie erhaltenem Cerebellumgewebe nachweisen (Griffin et al., 2004). Wir wiesen in unserer Untersuchung keine signifikanten Glutamin/Glutamat (Glx)-Unterschiede nach. Lediglich war eine verminderte Varianz der Glx-Konzentrationen innerhalb des Pons bei den an SCA Erkrankten auffällig (siehe Abbildung 25). Die unterschiedlichen Ergebnisse können wohl dadurch erklärt werden, dass Griffin *et al* das Verfahren der *Magic Angle Spinning* (MAS)-Protonenmagnetresonanzspektroskopie angewendet hat, wodurch die unter 2.1.3 beschriebenen Kopplungseffekte für diese Metaboliten vermieden werden.
Eine verminderte Varianz der Glx-Konzentrationen wurde bei der Kennedy Krankheit, einer weiteren Polyglutaminerkrankung beobachtet, wobei ähnlich wie bei den nachfolgend erwähnten Arbeiten zu Chorea Huntington, Störungen des intrazellulären Energiestoffwechsels vermutet wurden (Mader et al., 2002a). Bei Chorea Huntington, die ebenfalls zu den Polyglutaminerkrankungen zählt, konnten spektroskopisch erhöhte Glx(Glutamin/Glutamat)-Werte festgestellt werden. Allerdings wurde hierbei ein Fehler im zellulären Energiestoffwechsel und ein daraus resultierender Enzymausfall im Glutamat-Glutamin-Kreislauf für das erhöhte Glx-Niveau verantwortlich gemacht. Dabei leitet ein Anstieg des normalerweise streng bei sehr niedrigen Konzentrationen eingestellten Glx einen schleichenden Zelltod durch chronische Übererregung ein (Bender et al., 2005; Masino et al., 2003; Taylor-Robinson et al., 1996). Weiterhin konnte ein Abfall des erhöhten Glx-Niveaus bei an Chorea Huntington Erkrankten nach zehnwöchiger oraler Creatinergänzung aufgezeigt werden, nachdem in Mäusemodellen bereits ein neuroprotektiver Effekt des Creatins bewiesen

wurde, der sich beim Menschen jedoch nicht einstellte (Bender et al., 2005; Tabrizi et al., 2005).

4.2.2 N-Acetylaspartat

N-Acetylaspartat kommt im reifen Gehirn fast ausschließlich in Neuronen vor und gilt als ein Marker für neuronale Integrität. Er weißt bei pathologischen Veränderungen auf neuronale Dysfunktion und neurodegenerative Prozesse hin (Birken and Oldendorf, 1989; Gill et al., 1989), jedoch nicht auf Neuronenuntergang (Tedeschi et al., 1996). Verminderte NAA-Gehalte wurden bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen entdeckt. So zum Beispiel bei multipler Sklerose (Inglese et al., 2003; Mader et al., 2001), Alzheimer Demenz (Herminghaus et al., 2003), Schlaganfall (Gideon et al., 1992; Graham et al., 2001) Multisystematrophie (Watanabe et al., 2004) und der Kennedy Krankheit (Mader et al., 2002a).

Bei der spinocerebellaren Ataxie konnte ein verringertes NAA/Cr-Verhältnis bzw. eine Verringerung des absoluten NAAs mehrfach für das Cerebellum (Boesch et al., 2001; Davie et al., 1995; Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005) sowie für den Pons (Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998) nachgewiesen werden.

Wir konnten in unserer Studie ein signifikant verringertes NA im Cerebellum bestätigen, im Pons allerdings nicht. Dies mag an der Ermittlung absoluter Konzentrationen liegen sowie der durchgeführten Partialvolumenkorrektur. So wiesen Viau *et al.* in ihrer ähnlich durchgeführten Studie eine Erniedrigung des NAAs ebenfalls nur im Cerebellum nach (Viau et al., 2005). Auch wurde in einer kürzlich durchgeführten postmortem Studie an SCA1, SCA2 und SCA3 Patienten ein sehr uneinheitlicher Grad des Neuronenuntergangs im reticulotegmentalen Nucleus (Nucleus Bechterew) des Pons beobachtet, so konnte bei 3 von 10 Patienten keinerlei Neuronenverlust aufgezeigt werden

(Rüb et al., 2004). Dies könnte erklären, weshalb wir keine signifikante Konzentrationsverminderung im Pons entdeckten.

4.2.3 Creatin

Creatin dient als Substrat der Creatinkinase zur Regeneration von ATP aus ADP und daher als Energiepuffer und -vorrat innerhalb von Zellen (Kaemmerer et al., 2001).

Bei transgenen SCA3-Mäusen wurde eine Erhöhung des Creatins in Kleinhirngewebslösungen beschrieben (Griffin et al., 2004). Weiterhin fanden Viau *et al.* signifikant erhöhte Creatinkonzentrationen bei an SCA Erkrankten im Pons und Cerebellum (Viau et al., 2005). Diese Ergebnisse konnten wir für das Cerebellum in unserer Studie bestätigen.

Sie könnten auf unterschiedliche Vorkommen mitochondrialer und cytosolischer Creatinkinasesubtypen vom Muskeltyp innerhalb der Purkinje- und Körnerzellen des Kleinhirns zurückzuführen sein (Kaldis et al., 1996). Während sich in Purkinjezellen ein mitochondrialer und ein cytosolischer Subtyp fanden, konnte in Körnerzellen nur ein mitochondrialer festgestellt werden. Die Autoren vermuteten hierbei einen außergewöhnlichen Energiebedarf der Purkinjezellen zur Aufrechterhaltung des ausgeprägten Ca^{2+}-Transports innerhalb der Zellen als Ursache dieser Besonderheit (Kaldis et al., 1996). Vig *et al.* wiesen des weiteren eine Verminderung Ca^{2+}-bindender Proteine innerhalb von Purkinjezellen bei transgenen SCA1-Mäusen nach, die unter anderem über eine beeinträchtigte Ca^{2+}-Pufferung zu zellulärer Fehlfunktionen führen könnte (Vig et al., 2000). So könnte ein Ungleichgewicht im Ca^{2+}-Stoffwechsel und dem verbundenen Energiekreislauf bei SCA Patienten zum veränderten Creatingehalt innerhalb des Cerebellums führen. Viau *et al.* warfen die Vermutung einer vermehrten Gliose als Ursache der erhöhten Creatinwerte auf, nachdem der Creatingehalt und vor allem der Myoinositolgehalt innerhalb von Astrocyten höher als in Neuronen ist (Urenjak et al., 1993). Diese Vermutung war daher naheliegend, da sie gleichzeitig zu den erhöhten

Creatinkonzentrationen auch erhöhte Myoinositolkonzentrationen in Pons und Cerebellum nachweisen konnten (Viau et al., 2005).
Allerdings wurden auch Erniedrigungen des Creatins in Pons und Cerebellum bei an SCA Erkrankten beschrieben, die jedoch nicht statistische Signifikanz erreichten (Guerrini et al., 2004). In Ergänzung hierzu konnte im Tiermodell an SCA1 transgenen Mäusen eine Erhöhung der Purkinjezellüberlebensrate durch orale Creatinergänzung erreicht werden (Kaemmerer et al., 2001), nachdem bei den unsubstituierten SCA1 Mäusen deutlich verminderte Creatinwerte im Vergleich zu den Wildtypmäusen gemessen wurden. Im Gegensatz zu ähnlichen Versuchen bei Chorea Huntington stellte sich allerdings keine Besserung des klinischen Krankheitsbildes bei den Mäusen ein (Bender et al., 2005; Kaemmerer et al., 2001), was die Vermutung nahe legt, dass die Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels nicht zu den primären Pathomechanismen der Polyglutaminerkrankungen zählt. Vielmehr könnte das vermehrte Vorliegen von Creatin zu einer verbesserten präsynaptischen Glutamataufnahme führen und somit die Wahrscheinlichkeit des Purkinjezelluntergangs aufgrund erhöhter und daher neurotoxischer Glutamatspiegel verringern (Kaemmerer et al., 2001).

4.2.4 Myoinositol

Myoinositol gilt im Gehirn als ein astrocytärer Marker, nachdem sein Gehalt in Astrocyten deutlich höher als in Neuronen ist (Urenjak et al., 1993; Viau et al., 2005).
Der Nachweis einer signifikant erhöhten Myoinositolkonzentration im Pons in dieser Studie steht im Einklang mit den Ergebnissen von Viau *et al.*, die einen erhöhten Gehalt im Pons und Cerebellum bei an SCA Erkrankten aufzeigten (Viau et al., 2005). Innerhalb einer postmortem durchgeführten Studie an den Gehirnen von 10 SCA1, SCA2 und SCA3 Patienten konnte bei Untersuchung des retuculotegmentalen Nucleus im Pons bei allen Patienten eine milde bis offensichtliche *Glial Fibrillary Acidic Protein* (GFAP)-positive Astrogliose

festgestellt werden (Rüb et al., 2004), die den erhöhten Myoinositolgehalt erklären kann.
In vorausgegangenen Studien konnte keine Erhöhung der Myoinositolkonzentrationen nachgewiesen werden (Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998). Eine Erklärungsmöglichkeit mag die erstmalig durch uns und zuvor Viau *et al.* durchgeführte Partialvolumenkorrektur für den Liquoranteil darstellen (Viau et al., 2005).

4.2.5 Cholinhaltige Verbindungen

Cholinhaltige Verbindungen sind Bestandteil zahlreicher zellulärer Prozesse, wie der Myelinbiosynthese, dem Membranstoffwechsel und dem Lipidtransport (Bluml et al., 2003).
Unveränderte Cholinwerte wurden in mehreren Protonenmagnetresonanz-spektroskopiestudien beschrieben (Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005), was wir in unserer Studie bestätigen konnten.
Im Gegensatz hierzu wurde bei transgenen SCA3 Mäusen eine Verminderung der Cholinwerte beschrieben (Griffin et al., 2004). Dies konnte recht uneinheitlich für SCA Patienten bestätigt werden: Mascalchi *et al.* beobachtete eine Cholinreduktion bei SCA1 Patienten (Mascalchi et al., 1998) und in einer späteren Studie nur für Patienten, die an olivopontocerebellärer Ataxie (OPCA) litten (Mascalchi et al., 2002). Boesch *et al*. wies eine Verminderung für SCA2 Patienten, nicht aber für SCA6 Patienten nach (Boesch et al., 2001) und Davie *et al.* für Patienten mit autosomal dominanter cerebellärer Ataxie (ADCA) (Davie et al., 1995). Guerrini *et al.* konnte lediglich eine nichtsignifikante Erniedrigung der Cholinkonzentrationen bei SCA1 und SCA2 Patienten feststellen (Guerrini et al., 2004). Als Ursache wurde ein verminderter Zellstoffwechsel vermutet, der zu einem geringeren Umbau der Zellmembranen, einer reduzierten enzymatischen Synthese des Neurotransmitters Acetylcholin aus der Vorstufe Phosphatidylcholin und Störungen der Myelinbiosynthese führt (Boesch et al., 2001; Mascalchi et al., 1998).

Weiterhin ist als Ursache aller Metabolitenveränderungen ein Zelluntergang und eine daraus resultierende bessere spektroskopische Erfassbarkeit aufgrund des extrazellulären Vorliegens derselben aufgrund der unveränderten oder erniedrigten Cholinkonzentrationen unwahrscheinlich, da der Zelltod immer mit einer Dilution der unter anderem cholinhaltigen Membranbausteine in den Extrazellularraum verbunden wäre (Griffin et al., 2004).

4.2.6 Lactat

Lactat ist eng mit dem Glukose- und Mitochondrienstoffwechsel verknüpft und entsteht vor allem unter anaeroben Bedingungen. Makrophagen produzieren im aktivierten Zustand Lactat auch unter aeroben Bedingungen (Boesch et al., 2001; Graham et al., 2001). Bei Schlaganfallpatienten wurde der Versuch unternommen, zwischen ischämisch entstandenem Lactat und durch Macrophagen produziertem anhand von zusätzlich entstehenden Makromolekülen zu unterscheiden, um Aussagen über das Ausmaß der Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall zur Anpassung der Therapiemaßnahmen machen zu können (Graham et al., 2001).
Lactat konnte mehrfach weder bei SCA Patienten noch Probanden in Studien nachgewiesen werden, nachdem die vorliegenden Konzentrationen unterhalb der spektroskopischen Nachweisgrenze lagen (Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005). In dieser Studie lagen die bei den Patienten und Probanden gemessenen Lactatkonzentrationen ebenfalls zum Großteil unterhalb der Nachweisgrenze, weswegen wir auf eine weitere statische Auswertung verzichteten.
Hingegen konnten verminderte Lactatkonzentrationen in Hirngewebslösungen und Kleinhirngewebe transgener SCA3 Mäuse nachgewiesen werden, die über eine verminderte Glykolysekapazität gegenüber den gesunden Wildtypmäusen erklärt werden könnte (Griffin et al., 2004). Für diese These spricht auch, dass im Vergleich von SCA2 und SCA6 Patienten lediglich bei den an SCA2 Erkrankten geringe Mengen an Lactat nachzuweisen waren, was durch eine

unterschiedliche Glykolysekapazität der beiden SCA-Subtypen zu erklären wäre (Boesch et al., 2001; Griffin et al., 2004).

4.3 Abhängigkeit von Erkrankungsdauer, Anzahl der CAG-Repeats und dem SCA-Subtyp

Viau *et al* konnten für das NAA/Cr- und Cho/Cr-Verhältnis im Pons eine Korrelation mit die Erkrankungsdauer bei SCA2 Patienten nachweisen (Viau et al., 2005), die in einer vorangegangenen Studie für Cholin bei ADCA Patienten nicht aufgezeigt wurde (Davie et al., 1995). Wir konnten keinerlei Abhängigkeit der signifikant erhöhten Metaboliten NA, Cr und Ins von der Erkrankungsdauer entdecken.
In Anlehnung hierzu wurden Korrelationen zwischen dem NAA/Cr-Verhältnis und dem klinischen Defizit der SCA respektive OPCA Patienten beschrieben (Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996). Diese Ergebnisse bestärken die pathologisch nachgewiesene Vorstellung des zunehmenden Purkinjezelluntergangs im Verlauf der spinocerebellaren Ataxie und werfen die Möglichkeit des Einsatz der Magnetresonanzspektroskopie als Ergänzung der klinischen Einschätzung des Krankheitsstadiums auf (Mascalchi et al., 2002; Tedeschi et al., 1996). In einer weiterführenden Studie wurde eine Korrelation des NAAs mit der Krankheitsausprägung nur für SCA1 nicht aber SCA2 festgestellt (Guerrini et al., 2004). Ursächlich hierfür könnte ein unterschiedliches Fortschreiten der Neurodegeneration mit einem späteren Beginn und schnellem Voranschreiten bei SCA1 und einem früheren Auftreten und langsamer Progression bei SCA2 sein, wie bereits in klinischen Studien gezeigt (Guerrini et al., 2004).

Desweiteren beschrieben Viau *et al.* jeweils Korrelationen zwischen der Cholinkonzentration, dem Cho/Cr-Verhältnis und der Anzahl der CAG-Repeats (Viau et al., 2005). Unsere Vorstellung, dass sich eine Korrelation der CAG-Repeatanzahl mit den erwarteten spektroskopischen Korrelaten der

entstehenden Polyglutaminstränge ergeben würde, erfüllte sich nicht. So konnten wir keine Korrelationen von Glx und dem Makromolekülanteil mm3 mit der Trinucleotidanzahl entdecken. Weiterhin wiesen wir keine Abhängigkeit des NA von der Anzahl der CAG-Repeats nach, eine Überlegung die wir aufgrund der nachgewiesenen Korrelation der Trinucleotidanzahl mit dem Voranschreiten der Erkrankung anstellten (Guerrini et al., 2004; Martin, 1999).

Guerrini *et al.* wiesen in ihrer Untersuchung SCA1 und SCA2 Erkrankter keine Metabolitenunterschiede zwischen den SCA-Subtypen nach (Guerrini et al., 2004). Wir konnten dies für Metaboliten- und Makromolekülkonzentrationen innerhalb unserer Studie an SCA1, SCA2 und SCA3 Patienten bestätigen. Diese Ergebnisse decken sich mit dem berichteten gemeinsamen Mutationsmechanismus bei SCA1, SCA2 und SCA3, der in einen gleichartigen Pathomechanismus mit Produktion polyglutaminhaltiger Proteine mündet (Klockgether et al., 2000).
Hingegen wurden für SCA2 gegenüber SCA6 Unterschiede beschrieben. So fand sich ein signifikant erniedrigtes NAA/Cr-Verhältnis bei den SCA2 Patienten im Vergleich zu an SCA6 Erkrankten (Boesch et al., 2001; Viau et al., 2005). Weiterhin wurde ein vermindertes Cho/Cr-Verhältnis und geringe Lactatanteile bei SCA2 gegenüber SCA6 beschrieben (Boesch et al., 2001), was von Viau et al. nicht bestätigt werden konnte (Viau et al., 2005). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit beschriebenen unterschiedlichen Genmutationen die einerseits bei SCA2 die Bildung polyglutaminhaltger Proteine initiiert, wohingegen bei SCA6 eine Mutation innerhalb eines für Ionenkanaluntereinheiten codierenden Gens entdeckt wurde (Klockgether et al., 2000).

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie befasste sich mit der Frage nach der magnetresonanzspektroskopischen Nachweisbarkeit von Veränderungen bei der spinocerebellaren Ataxie. Im Zentrum unserer Untersuchung stand die Suche nach freiem und proteingebundenem Glutamin und Glutamat, nachdem der bei der spinocerebellaren Ataxie vorliegende genetische Defekt zu Bildung von Polyglutaminsträngen innerhalb der von den betroffenen Genen codierten Proteine führt. Diese Erwartung ergab sich, nachdem in vorangehenden Studien an Makromoleküle gebundenes Glutamin und Glutamat in vivo bei 1,5 Tesla erfasst werden konnte, sowie freies Glutamin in vitro bei SCA3 transgenen Mäusen nachweisbar war (Griffin et al., 2004; Seeger et al., 2003). In unserer Studie stellten wir allerdings keine signifikanten Konzentrationsveränderungen weder des freien noch des proteingebundenen Glutamin und Glutamats fest.

Wir fanden eine signifikant verminderte N-Acetylaspartatkonzentration im Cerebellum der an SCA Erkrankten, wie sie in vorangegangene Untersuchungen bereits beschrieben wurden (Boesch et al., 2001; Davie et al., 1995; Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005). Diese Veränderungen lassen sich durch die mit der Erkrankung verbundene neuronale Dysfunktion und Degeneration erklären.

Des weiteren zeigten wir im Cerebellum der an SCA Erkrankten ein signifikant erhöhtes Creatin auf, wie bereits durch Viau *et al.* beschrieben (Viau et al., 2005). Dies kann auf Störungen im intrazellulären Energiestoffwechsel zurückgeführt werden.

Weiterhin wiesen wir eine signifikante Erhöhung der Inositolkonzentration bei den Erkrankten innerhalb des Pons nach, die im Einklang mit einer vorangehenden Studie steht und sich über eine durch die spinocerebellare Ataxie induzierte Gliose erklären lässt, wie sie in einer pathohistologischen Untersuchung durch Rüb *et al.* beschrieben wurde (Rüb et al., 2004; Viau et al., 2005).

Für die Cholin- und Lactatkonzentrationen konnten wir keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen nachweisen, wie ebenfalls durch andere Autoren beschrieben (Guerrini et al., 2004; Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996; Viau et al., 2005).

Bemerkenswert ist die Übereinstimmung unserer Ergebnisse mit den kürzlich durch Viau *et al.* publizierten, mit dem erstmaligen *in-vivo* Nachweis einer Creatin- und Myoinositolerhöhung sowie einer unveränderten Cholinkonzentration bei an SCA Erkrankten (Viau et al., 2005). Diese Studie wurde wie die hier vorliegende erstmals unter Einsatz einer Partialvolumenkorrektur für den Liquoranteil des *volume of interest* durchgeführt. Diesen Ergebnissen zufolge ist eine derartige Korrektur der Messwerte bei Erkrankungen die mit einer Atrophie des untersuchten Hirngewebes einhergehen unerlässlich, möchte man auch geringe Konzentrationsunterschiede nachweisen.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Protonenmagnetresonanz-spektroskopie eine hilfreiche Ergänzung zur Diagnose der spinocerebellaren Ataxie darstellt, vor allem in Frühstadium, wenn noch keine Atrophie durch die Magnetresonanzbildgebung nachzuweisen ist. Sie scheint auch hilfreich zur Einschätzung der neuroaxonalen Schädigung und darüber zur Überwachung des Krankheitsverlaufs mit Hilfe der N-Acetylaspartatkonzentration zu sein, für die teilweise Korrelationen mit dem Behinderungsgrad der Patienten nachgewiesen wurden (Mascalchi et al., 2002; Mascalchi et al., 1998; Tedeschi et al., 1996).

Die endgültige Diagnose der spinocerebellaren Ataxie bleibt weiterhin der genetischen Analyse vorbehalten, allerdings kann durch die Einbeziehung der Magnetresonanzspektroskopie/ -bildgebung sowie des klinisch-neurologischen Bildes und der Familienanamnese eine wichtige Vorauswahl unter der Vielzahl der verfügbaren Tests vorgenommen werden, die eine übermäßige Durchführung der sehr kostenintensiven genetischen Untersuchungen vermeidet.

6 Literaturverzeichnis

Albrecht M, Golatta M, Wullner U, Lengauer T. Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. Eur J Biochem 2004; 271: 3155-70.

Bartha R, Drost DJ, Menon RS, Williamson PC. Comparison of the quantification precision of human short echo time (1)H spectroscopy at 1.5 and 4.0 Tesla. Magn Reson Med 2000; 44: 185-92.

Baslow MH. Functions of N-acetyl-L-aspartate and N-acetyl-L-aspartylglutamate in the vertebrate brain: role in glial cell-specific signaling. J Neurochem 2000; 75: 453-9.

Baslow MH. N-acetylaspartate in the vertebrate brain: metabolism and function. Neurochem Res 2003; 28: 941-53.

Basu P, Chattopadhyay B, Gangopadhaya PK, Mukherjee SC, Sinha KK, Das SK, Roychoudhury S, Majumder PP, Bhattacharyya NP. Analysis of CAG repeats in SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 and DRPLA loci in spinocerebellar ataxia patients and distribution of CAG repeats at the SCA1, SCA2 and SCA6 loci in nine ethnic populations of eastern India. Hum Genet 2000; 106: 597-604.

Behar KL, Ogino T. Characterization of macromolecule resonances in the 1H NMR spectrum of rat brain. Magn Reson Med 1993; 30: 38-44.

Behar KL, Rothman DL, Spencer DD, Petroff OA. Analysis of macromolecule resonances in 1H NMR spectra of human brain. Magn Reson Med 1994; 32: 294-302.

Bender A, Auer DP, Merl T, Reilmann R, Saemann P, Yassouridis A, Bender J, Weindl A, Dose M, Gasser T, Klopstock T. Creatine supplementation lowers brain glutamate levels in Huntington's disease. J Neurol 2005; 252: 36-41.

Bevivino AE, Loll PJ. An expanded glutamine repeat destabilizes native ataxin-3 structure and mediates formation of parallel beta-fibrils. Proc Natl Acad Sci U S A 2001; 98: 11955-60.

Birken DL, Oldendorf WH. N-acetyl-L-aspartic acid: a literature review of a compound prominent in 1H-NMR spectroscopic studies of brain. Neurosci Biobehav Rev 1989; 13: 23-31.

Bloch F. Nuclear induction. Phys.Rev. 1946a; 70: 460-473.

Bloch F. The nuclear induction experiment. Phys.Rev. 1946b; 70: 474-485.

Bloch F, Hansen W, Packard M. Nuclear induction. Phys.Rev. 1946; 69: 127.

Bluml S, Philippart M, Schiffmann R, Seymour K, Ross BD. Membrane phospholipids and high-energy metabolites in childhood ataxia with CNS hypomyelination. Neurology 2003; 61: 648-54.

Boesch SM, Schocke M, Bürk K, Hollosi P, Fornai F, Aichner FT, Poewe W, Felber S. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging reveals differences in spinocerebellar ataxia types 2 and 6. J Magn Reson Imaging 2001; 13: 553-9.

Bottomley P. PRESS. U.S. Patent 1984.

Bottomley PA. Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. Ann N Y Acad Sci 1987; 508: 333-48.

Brenneis C, Bösch SM, Schocke M, Wenning GK, Poewe W. Atrophy pattern in SCA2 determined by voxel-based morphometry. Neuroreport 2003; 14: 1799-802.

Bürk K, Abele M, Fetter M, Dichgans J, Skalej M, Laccone F, Didierjean O, Brice A, Klockgether T. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. Brain 1996; 119 (Pt 5): 1497-505.

Bürk K, Globas C, Bosch S, Graber S, Abele M, Brice A, Dichgans J, Daum I, Klockgether T. Cognitive deficits in spinocerebellar ataxia 2. Brain 1999; 122 (Pt 4): 769-77.

Burnett BG, Pittman RN. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102: 4330-5.

Chung MY, Lu YC, Cheng NC, Soong BW. A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. Brain 2003; 126: 1293-9.

Colomer Gould VF. Mouse models of Machado-Joseph disease and other polyglutamine spinocerebellar ataxias. NeuroRx 2005; 2: 480-3.

Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL, Zoghbi HY. Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. Neuron 1999; 24: 879-92.

Cummings CJ, Zoghbi HY. Fourteen and counting: unraveling trinucleotide repeat diseases. Hum Mol Genet 2000; 9: 909-16.

Damadian R. Tumor detection by nuclear magnetic resonance. Science 1971; 171: 1151-3.

Davie CA, Barker GJ, Webb S, Tofts PS, Thompson AJ, Harding AE, McDonald WI, Miller DH. Persistent functional deficit in multiple sclerosis and autosomal dominant cerebellar ataxia is associated with axon loss. Brain 1995; 118: 1583-92.

de Graaf RA, van Kranenburg A, Nicolay K. Off-resonance metabolite magnetization transfer measurements on rat brain in situ. Magn Reson Med 1999; 41: 1136-44.

Dickinson W. Dependence of the F19 nuclear resonance position on chemical compound. Phys.Rev. 1950; 77: 736.

Dreher W, Norris DG, Leibfritz D. Magnetization transfer affects the proton creatine/phosphocreatine signal intensity: in vivo demonstration in the rat brain. Magn Reson Med 1994; 31: 81-4.

Ernst R, Anderson W. Applications of Fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. Rev.Sci.Instrum. 1966; 37: 93-102.

Frahm J, Bruhn H, Gyngell ML, Merboldt KD, Hanicke W, Sauter R. Localized high-resolution proton NMR spectroscopy using stimulated echoes: initial applications to human brain in vivo. Magn Reson Med 1989; 9: 79-93.

Gasparovic C, Berghmans K. Ca2+- and Mg2+-modulated lipolysis in neonatal rat brain slices observed by one- and two-dimensional NMR. J Neurochem 1998; 71: 1727-32.

Gasparovic C, Rosenberg GA, Wallace JA, Estrada EY, Roberts K, Pastuszyn A, Ahmed W, Graham GD. Magnetic resonance lipid signals in rat brain after experimental stroke correlate with neutral lipid accumulation. Neurosci Lett 2001; 301: 87-90.

Gideon P, Henriksen O, Sperling B, Christiansen P, Olsen TS, Jorgensen HS, Arlien-Soborg P. Early time course of N-acetylaspartate, creatine and phosphocreatine, and compounds containing choline in the brain after acute stroke. A proton magnetic resonance spectroscopy study. Stroke 1992; 23: 1566-72.

Gill SS, Small RK, Thomas DG, Patel P, Porteous R, Van Bruggen N, Gadian DG, Kauppinen RA, Williams SR. Brain metabolites as 1H NMR markers of neuronal and glial disorders. NMR Biomed 1989; 2: 196-200.

Gilman S, Sima AA, Junck L, Kluin KJ, Koeppe RA, Lohman ME, Little R. Spinocerebellar ataxia type 1 with multiple system degeneration and glial cytoplasmic inclusions. Ann Neurol 1996; 39: 241-55.

Graham GD, Hwang JH, Rothman DL, Prichard JW. Spectroscopic assessment of alterations in macromolecule and small-molecule metabolites in human brain after stroke. Stroke 2001; 32: 2797-802.

Griffin JL, Cemal CK, Pook MA. Defining a metabolic phenotype in the brain of a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia 3. Physiol Genomics 2004; 16: 334-40.

Guerrini L, Lolli F, Ginestroni A, Belli G, Della Nave R, Tessa C, Foresti S, Cosottini M, Piacentini S, Salvi F, Plasmati R, De Grandis D, Siciliano G, Filla A, Mascalchi M. Brainstem neurodegeneration correlates with clinical dysfunction in SCA1 but not in SCA2. A quantitative volumetric, diffusion and proton spectroscopy MR study. Brain 2004; 127: 1785-95.

Haacke A, Broadley SA, Boteva R, Tzvetkov N, Hartl FU, Breuer P. Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. Hum Mol Genet 2006; 15: 555-68.

Harding AE. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. Brain 1982; 105: 1-28.

Hennig J, Pfister H, Ernst T, Ott D. Direct absolute quantification of metabolites in the human brain with in vivo localized proton spectroscopy. NMR Biomed 1992; 5: 193-9.

Herminghaus S, Frolich L, Gorriz C, Pilatus U, Dierks T, Wittsack HJ, Lanfermann H, Maurer K, Zanella FE. Brain metabolism in Alzheimer disease and vascular dementia assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy. Psychiatry Res 2003; 123: 183-90.

Hofmann L, Slotboom J, Boesch C, Kreis R. Characterization of the macromolecule baseline in localized (1)H-MR spectra of human brain. Magn Reson Med 2001; 46: 855-63.

Howe FA, Barton SJ, Cudlip SA, Stubbs M, Saunders DE, Murphy M, Wilkins P, Opstad KS, Doyle VL, McLean MA, Bell BA, Griffiths JR. Metabolic profiles of human brain tumors using quantitative in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy. Magn Reson Med 2003; 49: 223-32.

Hwang JH, Graham GD, Behar KL, Alger JR, Prichard JW, Rothman DL. Short echo time proton magnetic resonance spectroscopic imaging of macromolecule and metabolite signal intensities in the human brain. Magn Reson Med 1996; 35: 633-9.

Inglese M, Li BS, Rusinek H, Babb JS, Grossman RI, Gonen O. Diffusely elevated cerebral choline and creatine in relapsing-remitting multiple sclerosis. Magn Reson Med 2003; 50: 190-5.

Kaemmerer WF, Rodrigues CM, Steer CJ, Low WC. Creatine-supplemented diet extends Purkinje cell survival in spinocerebellar ataxia type 1 transgenic mice but does not prevent the ataxic phenotype. Neuroscience 2001; 103: 713-24.

Kaldis P, Hemmer W, Zanolla E, Holtzman D, Wallimann T. 'Hot spots' of creatine kinase localization in brain: cerebellum, hippocampus and choroid plexus. Dev Neurosci 1996; 18: 542-54.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, et al. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. Nat Genet 1994; 8: 221-8.

Klockgether T, Wullner U, Spauschus A, Evert B. The molecular biology of the autosomal-dominant cerebellar ataxias. Mov Disord 2000; 15: 604-12.

Kreis R, Farrow N, Ross BD. Localized 1H NMR spectroscopy in patients with chronic hepatic encephalopathy. Analysis of changes in cerebral glutamine, choline and inositols. NMR Biomed 1991; 4: 109-16.

Kugel H, Heindel W, Ernestus RI, Bunke J, du Mesnil R, Friedmann G. Human brain tumors: spectral patterns detected with localized H-1 MR spectroscopy. Radiology 1992; 183: 701-9.

Lauterbur P. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. Nature 1973; 242: 190-191.

Lee WY, Jin DK, Oh MR, Lee JE, Song SM, Lee EA, Kim GM, Chung JS, Lee KH. Frequency analysis and clinical characterization of spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, 6, and 7 in Korean patients. Arch Neurol 2003; 60: 858-63.

Lopez-Villegas D, Lenkinski RE, Wehrli SL, Ho WZ, Douglas SD. Lactate production by human monocytes/macrophages determined by proton MR spectroscopy. Magn Reson Med 1995; 34: 32-8.

Lu CS, Wu Chou YH, Kuo PC, Chang HC, Weng YH. The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. Arch Neurol 2004; 61: 35-8.

Mader I, Karitzky J, Klose U, Seeger U, Sperfeld A, Naegele T, Schick F, Ludolph A, Grodd W. Proton MRS in Kennedy disease: absolute metabolite and macromolecular concentrations. J Magn Reson Imaging 2002a; 16: 160-7.

Mader I, Roser W, Hagberg G, Schneider M, Sauter R, Seelig J, Radue EW, Steinbrich W. Proton chemical shift imaging, metabolic maps, and single voxel spectroscopy of glial brain tumors. Magma 1996; 4: 139-50.

Mader I, Roser W, Kappos L, Hagberg G, Seelig J, Radue EW, Steinbrich W. Serial proton MR spectroscopy of contrast-enhancing multiple sclerosis plaques: absolute metabolic values over 2 years during a clinical pharmacological study. AJNR Am J Neuroradiol 2000; 21: 1220-7.

Mader I, Seeger U, Karitzky J, Erb M, Schick F, Klose U. Proton magnetic resonance spectroscopy with metabolite nulling reveals regional differences of macromolecules in normal human brain. J Magn Reson Imaging 2002b; 16: 538-46.

Mader I, Seeger U, Weissert R, Klose U, Naegele T, Melms A, Grodd W. Proton MR spectroscopy with metabolite-nulling reveals elevated macromolecules in acute multiple sclerosis. Brain 2001; 124: 953-61.

Magistretti P, Pellerin L. Regulation of cerebral energy metabolism. Heidelberg: Springer, 1999.

Mansfield P. Multiplanar image formation using NMR spin echoes. J.Phys.C:Solid State Phys. 1977; 10: L55-L58.

Martin JB. Molecular basis of the neurodegenerative disorders. N Engl J Med 1999; 340: 1970-80.

Mascalchi M, Cosottini M, Lolli F, Salvi F, Tessa C, Macucci M, Tosetti M, Plasmati R, Ferlini A, Tassinari CA, Villari N. Proton MR spectroscopy of the cerebellum and pons in patients with degenerative ataxia. Radiology 2002; 223: 371-8.

Mascalchi M, Tosetti M, Plasmati R, Bianchi MC, Tessa C, Salvi F, Frontali M, Valzania F, Bartolozzi C, Tassinari CA. Proton magnetic resonance spectroscopy in an Italian family with spinocerebellar ataxia type 1. Ann Neurol 1998; 43: 244-52.

Maschke M, Oehlert G, Xie TD, Perlman S, Subramony SH, Kumar N, Ptacek LJ, Gomez CM. Clinical feature profile of spinocerebellar ataxia type 1-8 predicts genetically defined subtypes. Mov Disord 2005; 20: 1405-12.

Masino L, Musi V, Menon RP, Fusi P, Kelly G, Frenkiel TA, Trottier Y, Pastore A. Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. FEBS Lett 2003; 549: 21-5.

Merboldt KD, Bruhn H, Hanicke W, Michaelis T, Frahm J. Decrease of glucose in the human visual cortex during photic stimulation. Magn Reson Med 1992; 25: 187-94.

Michaelis T, Merboldt KD, Bruhn H, Hanicke W, Frahm J. Absolute concentrations of metabolites in the adult human brain in vivo: quantification of localized proton MR spectra. Radiology 1993; 187: 219-27.

Naegele T, Grodd W, Viebahn R, Seeger U, Klose U, Seitz D, Kaiser S, Mader I, Mayer J, Lauchart W, Gregor M, Voigt K. MR imaging and (1)H spectroscopy of brain metabolites in hepatic encephalopathy: time-course of renormalization after liver transplantation. Radiology 2000; 216: 683-91.

Paulson HL. Toward an understanding of polyglutamine neurodegeneration. Brain Pathol 2000; 10: 293-9.

Pfeuffer J, Tkac I, Provencher SW, Gruetter R. Toward an in vivo neurochemical profile: quantification of 18 metabolites in short-echo-time (1)H NMR spectra of the rat brain. J Magn Reson 1999; 141: 104-20.

Proctor W. The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. Phys.Rev. 1950; 77: 717.

Provencher SW. Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. Magn Reson Med 1993; 30: 672-9.

Purcell E. Resonance absorption by nuclear magnetic moment in a solid. Phys.Rev. 1946; 69: 37-38.

Robitaille Y, Lopes-Cendes I, Becher M, Rouleau G, Clark AW. The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features. Brain Pathol 1997; 7: 901-26.

Ross BD, Danielsen ER, Bluml S. Proton magnetic resonance spectroscopy: the new gold standard for diagnosis of clinical and subclinical hepatic encephalopathy? Dig Dis 1996; 14 Suppl 1: 30-9.

Rüb U, Bürk K, Schöls L, Brunt ER, de Vos RA, Diaz GO, Gierga K, Ghebremedhin E, Schultz C, Del Turco D, Mittelbronn M, Auburger G, Deller T, Braak H. Damage to the reticulotegmental nucleus of the pons in spinocerebellar ataxia type 1, 2, and 3. Neurology 2004; 63: 1258-63.

Rüb U, Del Turco D, Del Tredici K, de Vos RA, Brunt ER, Reifenberger G, Seifried C, Schultz C, Auburger G, Braak H. Thalamic involvement in a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and a spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patient, and its clinical relevance. Brain 2003a; 126: 2257-72.

Rüb U, Gierga K, Brunt ER, de Vos RA, Bauer M, Schöls L, Bürk K, Auburger G, Bohl J, Schultz C, Vuksic M, Burbach GJ, Braak H, Deller T. Spinocerebellar ataxias types 2 and 3: degeneration of the precerebellar nuclei isolates the three phylogenetically defined regions of the cerebellum. J Neural Transm 2005; 112: 1523-45.

Rüb U, Schultz C, Del Tredici K, Gierga K, Reifenberger G, de Vos RA, Seifried C, Braak H, Auburger G. Anatomically based guidelines for systematic investigation of the central somatosensory system and their application to a spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) patient. Neuropathol Appl Neurobiol 2003b; 29: 418-33.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME. Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. Cell 1998; 95: 55-66.

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O. Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. Lancet Neurol 2004; 3: 291-304.

Schöls L, Riess O, Schmidt T. Autosomal dominant vererbte spinozerebellare Ataxien: Klinik, Genetik und Pathogenese. Dt Ärztebl 2001; 98: A1546-1558.

Seeger U, Klose U, Mader I, Grodd W, Nägele T. Parameterized evaluation of macromolecules and lipids in proton MR spectroscopy of brain diseases. Magn Reson Med 2003; 49: 19-28.

Seeger U, Mader I, Nägele T, Grodd W, Lutz O, Klose U. Reliable detection of macromolecules in single-volume 1H NMR spectra of the human brain. Magn Reson Med 2001; 45: 948-54.

Soher BJ, Vermathen P, Schuff N, Wiedermann D, Meyerhoff DJ, Weiner MW, Maudsley AA. Short TE in vivo (1)H MR spectroscopic imaging at 1.5 T: acquisition and automated spectral analysis. Magn Reson Imaging 2000; 18: 1159-65.

Soher BJ, Young K, Maudsley AA. Representation of strong baseline contributions in 1H MR spectra. Magn Reson Med 2001; 45: 966-72.

Stevanin G, Bouslam N, Thobois S, Azzedine H, Ravaux L, Boland A, Schalling M, Broussolle E, Durr A, Brice A. Spinocerebellar ataxia with sensory neuropathy (SCA25) maps to chromosome 2p. Ann Neurol 2004; 55: 97-104.

Tabrizi SJ, Blamire AM, Manners DN, Rajagopalan B, Styles P, Schapira AH, Warner TT. High-dose creatine therapy for Huntington disease: a 2-year clinical and MRS study. Neurology 2005; 64: 1655-6.

Taylor-Robinson SD, Weeks RA, Bryant DJ, Sargentoni J, Marcus CD, Harding AE, Brooks DJ. Proton magnetic resonance spectroscopy in Huntington's disease: evidence in favour of the glutamate excitotoxic theory. Mov Disord 1996; 11: 167-73.

Tedeschi G, Bertolino A, Massaquoi SG, Campbell G, Patronas NJ, Bonavita S, Barnett AS, Alger JR, Hallett M. Proton magnetic resonance spectroscopic imaging in patients with cerebellar degeneration. Ann Neurol 1996; 39: 71-8.

Tsuji S. Spinocerebellar ataxia type 17: latest member of polyglutamine disease group highlights unanswered questions. Arch Neurol 2004; 61: 183-4.

Urenjak J, Williams SR, Gadian DG, Noble M. Proton nuclear magnetic resonance spectroscopy unambiguously identifies different neural cell types. J Neurosci 1993; 13: 981-9.

Valsasina P. Segmentierung von MR- Datensätzen in kleinen Volumina zur Auswertung vom fMRI- und MRS Experimenten. Studienarbeit am Institut für biomedizinische Technik: Universität Stuttgart, 2001

van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV, Kremer HP. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. Neurology 2002; 58: 702-8.

Viau M, Boulanger Y. Characterization of ataxias with magnetic resonance imaging and spectroscopy. Parkinsonism Relat Disord 2004; 10: 335-51.

Viau M, Marchand L, Bard C, Boulanger Y. (1)H magnetic resonance spectroscopy of autosomal ataxias. Brain Res 2005; 1049: 191-202.

Vig PJ, Subramony SH, Qin Z, McDaniel DO, Fratkin JD. Relationship between ataxin-1 nuclear inclusions and Purkinje cell specific proteins in SCA-1 transgenic mice. J Neurol Sci 2000; 174: 100-10.

Wang Y, Li SJ. Differentiation of metabolic concentrations between gray matter and white matter of human brain by in vivo 1H magnetic resonance spectroscopy. Magn Reson Med 1998; 39: 28-33.

Watanabe H, Fukatsu H, Katsuno M, Sugiura M, Hamada K, Okada Y, Hirayama M, Ishigaki T, Sobue G. Multiple regional 1H-MR spectroscopy in multiple system atrophy: NAA/Cr reduction in pontine base as a valuable diagnostic marker. J Neurol Neurosurg Psychiatry 2004; 75: 103-9.

Yoshizawa T, Watanabe M, Frusho K, Shoji S. Magnetic resonance imaging demonstrates differential atrophy of pontine base and tegmentum in Machado-Joseph disease. J Neurol Sci 2003; 215: 45-50.

Zoghbi HY, Orr HT. Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. Curr Opin Neurobiol 1999; 9: 566-70.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Grodd, Leiter der Sektion für experimentelle Kernspinresonanz des ZNS der Abteilung für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Tübingen, für die Ermöglichung dieser Dissertation und seine freundliche Unterstützung zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Mein großer Dank geht an Frau Professor Dr. med. Irina Mader, Oberärztin der Abteilung für Neuroradiologie des Universitätsklinikums Freiburg, die mir jederzeit bei Planung, Auswertung und Erstellung dieser Arbeit hilfreich zur Seite stand und mit Rat und Tat von unschätzbarem Wert für mich war.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Uwe Seeger, Herrn Dr. rer. nat. Michael Erb und Herrn PD Dr. rer. nat. Uwe Klose von der Sektion für experimentelle Kernspinresonanz des ZNS für ihre fachkundige und unermüdliche Unterstützung in physikalischen und methodischen Fragen danken.

Auch möchte ich Frau Professor Dr. med. Katrin Bürk sowie Herrn Dr. med. Christoph Globas von der Abteilung für Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen für ihre tatkräftige Mitarbeit bei der Requirierung der Patienten und ihre Ratschläge in klinischen Belangen meinen großen Dank aussprechen.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. rer. pol. Reinhard Vontheim vom Institut für medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen für Beratung und Hilfe bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an Frau Franziska Hösl, Frau Dr. med. Claudia Ambrosi, Herrn Dipl. phys. Bernd Kadatzki und Herrn Holger Putzhammer von der Sektion für experimentelle Kernspinresonanz des ZNS für ihre Unterstützung und ihren täglichen Beistand innerhalb der Forschungsgruppe.

Abschließend gilt mein tiefer Dank meinem Vater und meiner verstorbenen Mutter, die mir dieses Studium ermöglichten und Frau Dr. med. Franziska Eberle, die mir oft zur nötigen Motivation verhalf und zahlreiche Ratschläge zur Niederschrift dieser Arbeit beitrug.

7.2 Lebenslauf

Ich wurde am 05.09.1978 als zweites Kind meiner Eltern Dr. med. Traudl Drepper, geb. Schmitt, Ärztin für Innere und Allgemeinmedizin und Paul Drepper, Oberstudienrat für Mathematik und Physik in Erlenbach am Main geboren.

Von 1985 bis 1989 besuchte ich die Grundschule in Kirchzell und von 1989 an das Karl-Ernst-Gymnasium in Amorbach, an dem ich 1998 mein Abitur absolvierte.

Hierauf leistete ich von 1998 bis 1999 meinen Zivildienst als Pflegediensthelfer im Kreiskrankenhaus Miltenberg ab.

Mit dem Wintersemester 1999/2000 nahm ich mein Studium der Humanmedizin an der Eberhard Karls Universität Tübingen auf, mit Studienaufenthalten an den Universitäten Lausanne und Marseille im Wintersemester 2004/2005 sowie Sommersemester 2005. Ich beendete mein Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 29. November 2005.

Seit Anfang April 2006 bin ich als Assistenzarzt in der Inneren Abteilung des Hôpital Riviera in Vevey (VD) in der Schweiz tätig.

Diese Dissertation entstand zwischen dem Sommersemester 2003 und dem Wintersemester 2006/2007 in der Abteilung für Neuroradiologie, Sektion für Experimentelle Kernspinresonanz des ZNS des Universitätsklinikums Tübingen bei Herrn Professor Dr. med. W. Grodd.