

Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Immunhistochemische Untersuchung hCAT1-exprimierender Neurone im  
Hippocampus bei depressiven Patienten und Vergleichspersonen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Susann Wolf

aus Berlin

Magdeburg 2019

# Dokumentationsblatt

## Bibliographische Beschreibung:

Wolf, Susann:

### **Immunhistochemische Untersuchung hCAT1-exprimierender Neurone im Hippocampus bei depressiven Patienten und Vergleichspersonen.**

- 2019. - 88 Bl., 15 Abb., 6 Tab.

## Kurzreferat:

Der humane kationische Aminosäuretransporter 1 (hCAT1) hat aufgrund seiner Substratbereitstellungsfunktion für verschiedenste Stoffwechselprozesse eine zentrale Bedeutung hinsichtlich physiologischer und pathologischer Prozesse im menschlichen Gehirn. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind immunhistochemische Untersuchungen zur Verteilung des hCAT1-Proteins im gesunden menschlichen Gehirn, sowie die Bestimmung der neuronalen Zelldichte hCAT1-immunreaktiver Neurone im Hippocampus von depressiven Patienten im Vergleich zu psychiatrisch Gesunden.

Es wurden post mortem Gehirne von 14 depressiven Patienten (sieben unipolar depressiv, sieben bipolar depressiv) und von neun psychiatrisch unauffälligen Vergleichspersonen untersucht. Es zeigte sich eine weite Verbreitung von hCAT1 im gesamten menschlichen Gehirn, auch wenn die Intensität der Expression in den verschiedenen Regionen des Gehirns variierte. Hinsichtlich der neuronalen Dichte hCAT1-exprimierender Neurone ergab sich in der Region des Cornu Ammonis 2 (CA2) eine signifikante Erniedrigung in beiden Hemisphären von depressiven Patienten. In den anderen untersuchten Regionen des Hippocampus (CA1, CA3, CA4 und Subiculum) wurden keine signifikanten Unterschiede gefunden.

Die beschriebenen Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass das hCAT1-Protein eine Rolle in der Pathogenese der Depression spielt und in Zukunft bei der Erarbeitung neuer therapeutischer Ansätze depressiver Erkrankungen von Interesse sein könnte.

# Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Depressive Erkrankungen.....	1
1.1.1 Einteilung, Symptomatik und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Multifaktorielle Ätiopathogenese.....	2
1.1.2.1 Genetische Aspekte und Umwelteinflüsse.....	2
1.1.2.2 Hirnmorphologische Veränderungen.....	3
1.1.2.3 Neurobiochemische Aspekte.....	5
1.2 Hippocampus und affektive Störungen.....	7
1.3 Der kationische Aminosäuretransporter 1.....	10
1.4 Fragestellung und Hypothese.....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Untersuchungsmaterial.....	15
2.2 Herstellung der Gehirnschnittpräparate.....	18
2.3 Kombinierte Markscheiden-Nissl-Färbung.....	18
2.4 Immunhistochemische Färbung.....	20
2.5 Qualitative Bewertung.....	22
2.6 Zellzählung und Dichtebestimmung.....	22
2.7 Verfahren zur Datenanalyse.....	24
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>25</b>
3.1 Verteilung des hCAT1-Proteins im menschlichen Gehirn.....	25
3.1.1 Telenzephalon.....	25
3.1.2 Dienzephalon.....	27
3.1.3 Zerebellum.....	27
3.1.4 Hirnstamm.....	27
3.1.5 Weiße Substanz und Plexus choroideus.....	28

3.2 Numerische Zelldichten.....	31
3.3 Einfluss der konfundierenden Variablen.....	34
3.4 Validität.....	38
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>41</b>
4.1 Verteilung von hCAT1-Immunreaktivität im menschlichen Gehirn.....	41
4.2 Expression von hCAT1 in Neuronen des Hippocampus bei affektiven Erkrankungen.....	42
4.2.1 Zusammenhang von hCAT1-Expression und NO-Stoffwechsel...43	
4.2.2 Zusammenhang von hCAT1-Expression mit anderen Stoffwechselprozessen.....	45
4.2.3 Einfluss der Medikation auf die hCAT1-Expression.....	50
4.2.4 Einfluss anderer Erkrankungen auf das hCAT1-Protein.....	52
4.3 Methodenkritische Aspekte.....	54
4.3.1 Einfluss konfundierender Variablen.....	54
4.3.1.1 Geschlecht, Alter, Autolysedauer, Suizid.....	54
4.3.1.2 Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer, Medikation.....	55
4.3.1.3 Andere Erkrankungen.....	56
4.3.2 Untersuchungsgut.....	56
4.3.3 Zellzählung.....	56
4.3.4 Interpretation.....	58
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>59</b>
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>VII</b>
<b>Ehrenerklärung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>Darstellung des Bildungsweges.....</b>	<b>IX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Methode	Avidin-Biotin-Komplex-Methode
ADC	Arginin-Decarboxylase
AGAT	L-Arginin:Glycin-Amidino-transferase
ANOVA	Varianzanalyse (englisch: analysis of variance)
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CA	Cornu ammonis
CAT	Kationischer Aminosäuretransporter
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CT	Computertomografie
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
DE	Deutschland
DK	Dänemark
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FST	Erzwungener Schwimmtest (englisch: forced swimming test)
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAMT	Guanidinoacetat-N-Methyltransferase
GD	Gyrus Dentatus
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hCAT	Humaner kationischer Aminosäuretransporter
ICD	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (englisch: International Classification of Diseases and Related Health Problems)
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
Kap.	Kapitel

Li	Links
MAO	Monoaminoxidase
mCAT	Kationischer Aminosäuretransporter der Maus
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (englisch: messenger ribonucleic acid)
MRT	Magnetresonanztomografie
mTOR	mechanistisches Ziel des Rapamycins (englisch: mechanistic target of rapamycin)
MW	Mittelwert
n	Anzahl
Na+	Natrium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
ODC	Ornithin-Decarboxylase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (englisch: phosphate buffered saline)
PET	Positronenemissionstomografie
PKC	Proteinkinase C
Re	Rechts
SD	Standardabweichung (englisch: standard deviation)
SLC	Transporter löslicher Substanzen (englisch: solute carrier)
SSNRI	Selektive Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (englisch: selective norepinephrine reuptake inhibitor)
SSRI	Selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (englisch: selective serotonin reuptake inhibitor)
Sub	Subiculum
TCA	Trizyklische Antidepressiva

UK

Vereinigtes Königreich (englisch: United Kingdom)

US

Vereinigte Staaten von Amerika (englisch: United States)

# 1. Einleitung

## 1.1 Depressive Erkrankungen

### 1.1.1 Einteilung, Symptomatik und Epidemiologie

Die verschiedenen depressiven Erkrankungen werden in der aktuellen Version der Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10) unter dem Begriff der affektiven Störungen zusammengefasst und sind durch eine meist episodische und wiederholt auftretende Veränderung der Stimmung bzw. Affektivität gekennzeichnet (Dilling et al. 2010). Hierbei unterscheidet man die unipolar depressive Störung, bei der es ausschließlich zu depressiven Episoden kommt, von der bipolar affektiven Störung, die durch einen Wechsel von depressiven und hypomanischen bzw. manischen Episoden oder das Auftreten von gemischten Episoden charakterisiert ist (Lieb et al. 2012). Typische Symptome während einer depressiven Phase sind gedrückte Stimmung, Interessenverlust und Freudlosigkeit, sowie Verminderung des Antriebs mit erhöhter Ermüdbarkeit und Aktivitätseinschränkung; außerdem können noch andere Symptome, wie z. B. verminderte Konzentration bzw. Aufmerksamkeit, vermindertes Selbstwertgefühl bzw. Selbstvertrauen, Schuldgefühle bzw. Gefühle von Wertlosigkeit, negative bzw. pessimistische Zukunftsperspektiven, Suizidgedanken bzw. -handlungen, Schlafstörungen und verminderter Appetit hinzukommen; anhand der gezeigten Gesamtsymptomatik wird der Schweregrad der depressiven Episode in leicht, mittelgradig und schwer eingeteilt (Dilling et al. 2010). Patienten in einer manischen Phase zeigen hingegen eine gehobene Stimmung, einen gesteigerten Antrieb mit erhöhter Aktivität bzw. motorischer Ruhelosigkeit und weitere Symptome, wie z. B. Ideenflucht bzw. subjektives Gedankenrasen, Rededrang, Verlust sozialer Hemmungen, vermindertes Schlafbedürfnis, überhöhte Selbsteinschätzung bzw. Größenwahn, ausgeprägte Ablenkbarkeit und gesteigerte Libido; dabei stellt eine hypomanische Phase eine leichtere Verlaufsform dar (Lieb et al. 2012). Die aktuell gültigen S3-Leitlinien gehen von einer Lebenszeitprävalenz für bipolare Störungen von ca. 3% und für unipolare depressive Störungen sogar von 16-20% aus, wobei das Geschlechtsverhältnis bei bipolaren Erkrankungen ausgeglichen ist; dagegen



leiden doppelt so viele Frauen wie Männer an einer unipolar depressiven Erkrankung (DGPPN et al. 2015; DGBS & DGPPN 2012). Das Manifestationsalter für bipolare Erkrankungen liegt vor allem im jugendlichen und jungen Erwachsenenalter, Patienten mit einer unipolaren Depression erkranken durchschnittlich einige Jahre später; dabei zeigen beide Patientengruppen eine hohe Mortalität, die vor allem auf einer erhöhten Suizidalität beruht (DGPPN et al. 2015; DGBS & DGPPN 2012).

### **1.1.2 Multifaktorielle Ätiopathogenese**

Aktuell existieren zur Entstehung depressiver Erkrankungen zahlreiche Erklärungshypothesen, wobei bisher keine überzeugende monokausale Erklärung geliefert werden konnte. Insgesamt wird sowohl für die unipolar depressive Störung als auch für die bipolar affektive Störung von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen; hierbei werden Wechselwirkungen von genetischen, psychosozialen und neurobiologischen Faktoren als pathogenetisch relevant angesehen (Haack et al. 2010; DGPPN et al. 2015).

#### **1.1.2.1 Genetische Aspekte und Umwelteinflüsse**

In der Vergangenheit durchgeführte Familien-, Zwillings- und Adoptionsstudien konnten die wichtige Bedeutung genetischer Faktoren aufzeigen. Diesbezüglich wurde für die unipolar depressive Störung eine Heritabilität von ca. 40-50% nachgewiesen; für die bipolar affektive Störung konnte sogar eine Heritabilität von ca. 80% belegt werden, was einen der höchsten Werte im Bereich psychiatrischer Erkrankungen darstellt (Bertelsen et al. 1977; McGuffin et al. 1996; Sullivan et al. 2000; Haack et al. 2010). Mittels Kopplungsstudien wurden zwar zahlreiche Regionen des Genoms vorgeschlagen, die Risiko-Allele enthalten könnten, jedoch sind die Ergebnisse bezüglich beider Erkrankungen insgesamt inkonsistent, so dass letztlich keine aussagekräftigen positiven Ergebnisse vorliegen (Lohoff 2010; Craddock & Sklar 2013). Allerdings wurden in der Chromosomenregion 12q23 prädisponierende Gene sowohl für die unipolar depressive Störung als auch für die bipolar depressive Störung beschrieben (Abkevich et al. 2003; McGuffin et al. 2005). Auch mittels Assoziationsstudien wurden zahlreiche Kandidaten-Gene untersucht; bisher konnte aber für keine der beiden Erkrankungen ein anerkanntes Dispositionsgen festgestellt werden (Barnett & Smoller 2009; Flint & Kendler 2014).

Etwas erfolgreicher verliefen in jüngerer Zeit genomweite Assoziationsstudien, die zumindest zwei mit der bipolar affektiven Störung assoziierte Gene (nämlich CACNA1C und ANK3) nachweisen konnten (Ferreira et al. 2008; Barnett & Smoller 2009; Cichon et al. 2009; Lohoff 2010; Flint & Kendler 2014). CACNA1C kodiert für die Alpha-1C-Untereinheit eines spannungsabhängigen L-Typ-Calciumkanals und ANK3 für das Ankyrin-G-Protein, welches als neuronales Adapterprotein die Zusammenstellung von spannungsabhängigen Natriumkanälen reguliert; letztlich ist aber die pathogenetische Bedeutung beider assoziierter Gene nicht abschließend geklärt (Barnett & Smoller 2009). Aufgrund der dargelegten Schwierigkeiten, konsistente genetische Befunde zu erzielen, wird bezüglich beider Erkrankungen einerseits ein komplexer Vererbungsmodus mit einem Zusammenspiel mehrerer Gene bzw. verschiedener genetischer Mechanismen angenommen, andererseits auch psychosozialen Faktoren bzw. Umwelteinflüssen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung depressiver Erkrankungen zugeschrieben (Craddock & Jones 1999; Fullerton et al. 2010; Craddock & Sklar 2013; Fakhoury 2015). Nach dem Vulnerabilitäts-Stress-Modell können kritische Lebensereignisse, wie beispielsweise Scheidung oder Todesfall, als Stressoren fungieren und dadurch bei entsprechender Prädisposition krankheitsauslösend bzw. krankheitsunterhaltend wirken (Brakemeier et al. 2008; Haack et al. 2010).

### **1.1.2.2 Hirnmorphologische Veränderungen**

Bisher sind für die affektiven Erkrankungen keine pathognomonischen makro- oder mikroskopischen Hirnveränderungen beschrieben worden, jedoch konnten in bildgebenden und neuropathologischen Untersuchungen hirnstrukturelle Veränderungen bei Patienten mit affektiver Erkrankung gegenüber gesunden Personen gezeigt werden. Mittels zahlreicher Computertomografie(CT)- bzw. Magnetresonanztomografie(MRT)-Studien und Zusammenfassung der Ergebnisse in Metaanalysen ergaben sich sowohl für die unipolar depressive Erkrankung als auch für die bipolar affektive Erkrankung übereinstimmende Befunde hinsichtlich vergrößerter lateraler Ventrikel und gesteigerter Raten an subkortikalen Hyperintensitäten (Kempton et al. 2011). Häufig wurde bei beiden Erkrankungen auch eine frontale bzw. präfrontale Volumenabnahme, vor allem den anterioren zingulären Kortex betreffend, beschrieben (Haack et al. 2010). Bei unipolar depressiv

Erkrankten konnte zusätzlich eine Volumenreduktion im Bereich der Basalganglien (Putamen, Nucleus caudatus) und des Hippocampus belegt werden; bezüglich der genannten Hirnregionen sind die Ergebnisse für bipolar affektive Störungen inkonsistent (Kanner 2004; Koolschijn et al. 2009; Haack et al. 2010). Des Weiteren konnte bei bipolar depressiv Erkrankten ein reduziertes Volumen des Corpus callosum nachgewiesen werden (Palaniyappan & Cousins 2010; Kempton et al. 2011). Zum aktuellen Zeitpunkt existieren nur wenige post mortem Studien, die sich konkret mit den hirnmorphologischen Veränderungen bei Patienten mit unipolar depressiver bzw. bipolar affektiver Erkrankung auseinandersetzen haben. Hinsichtlich der bereits in bildgebenden Verfahren nachgewiesenen frontalen bzw. präfrontalen Volumenabnahme konnte gezeigt werden, dass es bei beiden Erkrankungen zu einer Abnahme der kortikalen Schichtdicke im präfrontalen Kortex und zur Volumenreduktion im subgenualen Kortex, als Teil des anterioren zingulären Kortex, kommt (Rajkowska 1997; Öngür et al. 1998). Auch verschiedene subkortikale Strukturen des Gehirns, die bereits in den bildgebenden Verfahren Auffälligkeiten zeigten, wurden näher untersucht. Hierbei konnte herausgefunden werden, dass sowohl Patienten mit unipolar depressiver Erkrankung als auch Patienten mit bipolar affektiver Erkrankung verminderte Volumina des Nucleus accumbens, des Pallidums und des Putamens aufweisen (Baumann et al. 1999). In einer weiteren Studie fand man bei bipolar affektiver Störung kleinere Volumina des Hypothalamus, des externen Pallidums, des Putamens und des Thalamus; dagegen konnte für die unipolar depressive Störung nur eine Volumenreduktion im Bereich des externen Pallidums nachgewiesen werden (Bielau et al. 2005). Weiterhin wurde gezeigt, dass sowohl bipolar affektiv Erkrankte als auch unipolar Depressive ein etwas kleineres Hippocampusvolumen haben (Bernstein et al. 2012b). Zusätzlich fand man bei der gemeinsamen Betrachtung beider depressiver Erkrankungen gegenüber neuropsychiatrisch gesunden Personen eine Volumenminderung der medialen und lateralen Habenula (Ranft et al. 2010). Während hinsichtlich des Fornix weder bei unipolar depressiver Störung noch bei bipolar affektiver Störung Volumenunterschiede nachgewiesen werden konnten (Brisch et al. 2008), wurde bei bipolar affektiv Erkrankten eine Volumenreduktion der Mamillarkörper aufgezeigt, die nicht für unipolar depressive Patienten gefunden wurde (Bernstein et al. 2012a). Kürzlich konnte bei unipolar depressiven Patienten eine Volumenreduktion des Claustrums nachgewiesen werden (Bernstein et al. 2016).

### 1.1.2.3 Neurobiochemische Aspekte

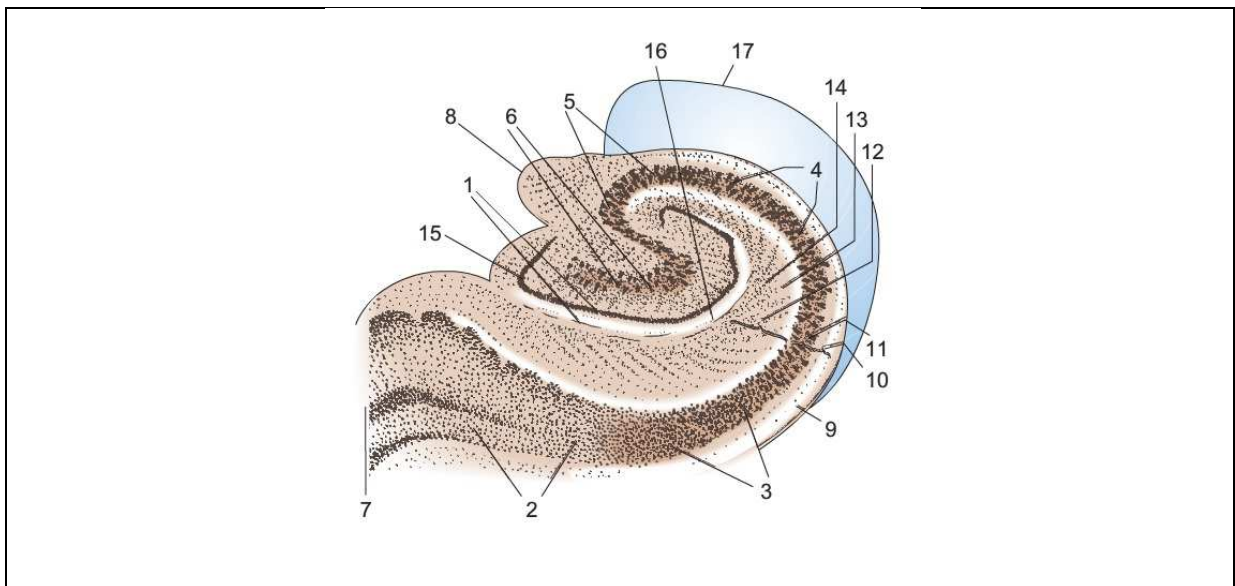
Eine der ältesten und bedeutendsten Theorien hinsichtlich neurobiochemischer Veränderungen bei der Pathogenese der depressiven Erkrankungen sind die Katecholamin- bzw. die im Verlauf daraus entstandene Monoamin-Hypothese aus den 1960er Jahren, die insgesamt von einem Mangel an Noradrenalin, Dopamin und/oder Serotonin in der Depression und einer Erhöhung der genannten biogenen Amine in der Manie ausgehen (Bunney & Davis 1965; Schildkraut 1965; Schildkraut & Kety 1967; Delgado 2000; Haack et al. 2010). Zu dieser Auffassung führte einerseits die Entdeckung, dass das zur antihypertensiven Therapie eingesetzte Medikament Reserpin Depressionen hervorrufen kann und seine Wirkung über die Hemmung vesikulärer Monoamintransporter mit nachfolgender Erniedrigung der biogenen Amine im Gehirn entfaltet (Muller et al. 1955; Shore et al. 1955; Schildkraut 1965; Hirschfeld 2000; Hillhouse & Porter 2015). Andererseits wurde diese Hypothese bestärkt durch die zugrundeliegenden Wirkmechanismen der antidepressiv wirksamen Monoaminoxidase-Hemmer (MAO-Hemmer) und trizyklischen Antidepressiva (TCA), die über verschiedene Prozesse die Verfügbarkeit der Monoamine im synaptischen Spalt erhöhen (Verteuil & Lehmann 1958; Kuhn 1958; Glowinski & Axelrod 1964; Hirschfeld 2000; Hillhouse & Porter 2015). In der Folge wurden unter anderem die selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) und die selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI) entwickelt, die auch heute noch aufgrund ihrer Wirksamkeit und ihres Nebenwirkungsprofils zu den Medikamenten der ersten Wahl gehören (Anderson 2013; Dale et al. 2015). Im Laufe der Zeit kamen allerdings Zweifel an der Monoamin-Hypothese auf, weil einerseits die lange Wirklatenz der Antidepressiva nicht mit dem meist unmittelbar eintretenden Effekt auf die Monoaminkonzentration erklärbar war und es andererseits bei bis zu 50% der Patienten trotz adäquater antidepressiver Therapie nicht zu einer Remission kam (Fava 2003; Rush et al. 2006; Brakemeier et al. 2008; O'Leary et al. 2015). Deswegen wurde in zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten anderen Ansätzen bzw. Strategien nachgegangen. Aufgrund der cholinergen-adrenergen-Hypothese der Manie und der Depression aus dem Jahr 1972, die ein Überwiegen der zentralen cholinergen Aktivität im Rahmen der Depression und der adrenergen Aktivität in der Manie postuliert (Janowsky et al. 1972), wurde in nachfolgenden Studien sowohl für

die Antagonisierung des muskarinergen Acetylcholinrezeptors (v.a. mittels Scopolamin) als auch für die Modulation des nikotinergen Acetylcholinrezeptors (z. B. mittels des Antagonisten Mecamylamin) eine antidepressive Wirkung nachgewiesen (Furey & Drevets 2006; Mineur & Picciotto 2010; Philip et al. 2012; Drevets et al. 2013). Im Jahr 1980 wurde dagegen eine Gamma-Aminobuttersäure(GABA)-Hypothese formuliert, bei der ein Defizit im GABAergen System als pathogenetisch relevant für affektive Erkrankungen beschrieben wurde und folglich auch in weiteren Studien die Beeinflussung der GABAergen Aktivität beispielsweise über den GABA-Rezeptor als potentiell Angriffsziel für antidepressive Medikamente angesehen wurde (Emrich et al. 1980; Pilc & Lloyd 1984; Brambilla et al. 2003; Mombereau et al. 2004; Nowak et al. 2006). Weiterhin wurde durch die Entdeckung der raschen antidepressiven Wirkung des N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptor-Antagonisten Ketamin auch die glutamaterge Neurotransmission in der Pathogenese der depressiven Erkrankungen diskutiert, wobei antidepressive Effekte nicht nur für die Antagonisierung des NMDA-Rezeptors, sondern ebenso für die Beeinflussung anderer Glutamatrezeptoren und -transporter beobachtet wurden (Trullas & Skolnick 1990; Berman et al. 2000; Zarate et al. 2010; Sanacora et al. 2012; Chaki et al. 2013). Der Gebrauch von Opioiden in der Behandlung der depressiven Erkrankungen wurde wegen des bestehenden Missbrauchs- und Abhängigkeitsrisikos in den 1960er Jahren von den auf der Monoamin-Hypothese basierenden neueren Antidepressiva abgelöst (siehe oben); später wurde dieser Aspekt aber wieder aufgegriffen und es konnten für die jeweils spezifische Beeinflussung der verschiedenen Opioidrezeptoren antidepressive Wirkungen, teilweise auch in therapieresistenten Fällen mit potentiell weniger Nebenwirkungen, belegt werden (Emrich et al. 1982; Carlezon et al. 2009; Lutz & Kieffer 2013; Ehrich et al. 2015). Es ergaben sich auch zahlreiche Hinweise dafür, dass sowohl neuroinflammatorische Prozesse als auch neuroendokrine Mechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei depressiven Erkrankungen pathophysiologisch von Bedeutung sind, so dass die Modulation der genannten Vorgänge als potenzielle Angriffsziele für neuere antidepressive Medikamente angesehen werden (Holsboer 2000; Jahn et al. 2004; Young et al. 2004; Irwin & Miller 2007; Abbasi et al. 2012; Raison et al. 2013). Seit den 1990er Jahren bis in die heutige Zeit wird eine Neuroplastizitäts-Hypothese diskutiert, die hinsichtlich der Pathogenese der depressiven Erkrankungen und der Wirkmechanismen der

antidepressiven Behandlung komplexere gegenteilige Anpassungen auf zellulärer und molekularer Ebene postuliert, die beispielsweise über verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden und die Beeinflussung der Proteinsynthese spezifischer neurotropher Faktoren vermittelt werden und notwendig für das Überleben und die Funktion der Zellen sind (Duman et al. 1997; Duman et al. 1999; Grady & Stahl 2013). Zusammengefasst gibt es zahlreiche neurobiochemische Erklärungsansätze hinsichtlich der Pathogenese der depressiven Erkrankungen, die keinesfalls separat voneinander betrachtet werden können, da sie sich gegenseitig beeinflussen bzw. bedingen und daher letztlich ein komplexes Gefüge darstellen.

## 1.2 Hippocampus und affektive Störungen

Die Hippocampusformation (in der vorliegenden Studie als Hippocampus bezeichnet) bildet einen Teil des limbischen Systems, liegt größtenteils im Temporallappen des Telencephalons und besteht aus den Regionen Gyrus dentatus (GD), Cornu ammonis (CA) und Subiculum (Sub) (Trepel 2012). Einen Überblick über den Aufbau des Hippocampus gibt Abbildung (Abb.) 1.



**Abb. 1: Mikroskopischer Frontalschnitt durch den Hippocampus.** 1= GD, 2 = Sub, 3 = CA1, 4 = CA2, 5 = CA3, 6 = CA4, 7 = Entorhinaler Kortex des Gyrus parahippocampalis, 8 = Fimbria hippocampi (Beginn des Fornix), 9 = Alveus, 10 = Stratum oriens, 11 = Stratum pyramidale, 12 = Stratum moleculare (CA), 13 = Stratum radiatum, 14 = Stratum lacunosum, 15 = Stratum granulosum, 16 = Stratum moleculare (GD), 17 = Umriss des Unterhorns des Seitenventrikels. Nach (Trepel 2012), modifiziert.

Aufgrund der Zugehörigkeit des Hippocampus zum phylogenetisch älteren Archicortex, können mikroskopisch sowohl im CA, als auch im GD vereinfacht drei Schichten abgegrenzt werden (Stratum oriens, Stratum pyramidale im CA bzw. Stratum granulosum im GD und Stratum moleculare), die im Bereich des Subiculum in den sechsschichtigen Neocortex der Area entorhinalis des Gyrus parahippocampalis übergehen (Duvernoy 2005). Im Fokus der Betrachtungen der vorliegenden Studie stehen die Neurone bzw. Pyramidenzellen im Stratum pyramidale des Subiculum und des CA, hierbei wird das CA durch die unterschiedliche Größe und Dichte der Pyramidenzellen noch in die Felder CA1 bis CA4 unterteilt (Trepel 2012). Der Hippocampus wird durch seine weitreichenden Verbindungen zu anderen Hirnregionen mit einer Vielzahl von Funktionen in Verbindung gebracht; vor allem seine Rolle bei der Gedächtniskonsolidierung, bei der Regulation von Stress durch die Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und bei der Verarbeitung von Emotionen als Teil des limbischen Systems sind hervorzuheben (Bartsch 2012). Weiterhin wurde der Hippocampus mit neurologischen (z. B. Epilepsie), neurodegenerativen (z. B. Alzheimer) und auch verschiedenen neuropsychiatrischen Erkrankungen (z. B. Schizophrenie, Depression) in Zusammenhang gebracht; zusammengefasst in (Campbell & MacQueen 2004; Harrison 2004; Tatum 2012; Hill et al. 2014).

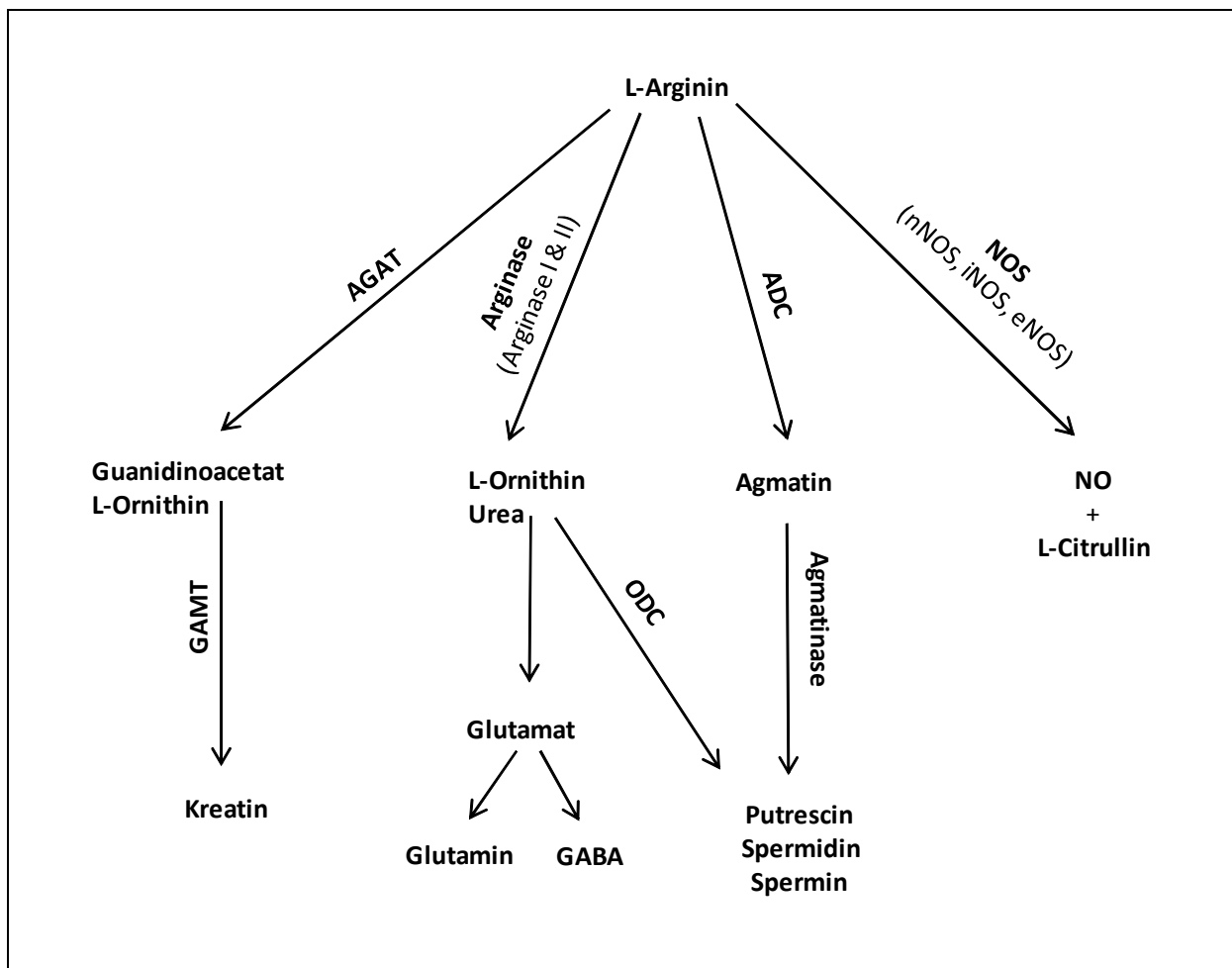
Die zentrale Rolle des Hippocampus in der Pathogenese sowohl der unipolaren, als auch der bipolaren affektiven Störungen wird durch zahlreiche Studien belegt, die sich auf Ergebnisse von strukturellen bzw. funktionellen bildgebenden Verfahren, neuropsychologischen Untersuchungen, tierexperimentellen Beobachtungen und post mortem Studien stützen; zusammengefasst in (Campbell & MacQueen 2004; Frey et al. 2007). Mittels struktureller bildgebender Verfahren, die auf MRT-Studien beruhen, konnte in Meta-Analysen insgesamt eine beidseitige Volumenreduktion des Hippocampus bei unipolar depressiv Erkrankten nachgewiesen werden, wohingegen es bei bipolar depressiven Patienten meist nicht bzw. nur zu einer leichten hippocampalen Volumenminderung kam (Campbell et al. 2004; Videbech & Ravnkilde 2004; Otten & Meeter 2015). In mehreren Studien wurden die negativen Ergebnisse bezüglich der bipolar affektiven Störungen durch Medikationseffekte erklärt; beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass mit Lithium behandelte Patienten größere Hippocampusvolumina aufweisen (Bearden et al. 2008; Foland et al. 2008). Außerdem konnten funktionelle bildgebende Verfahren, wie z. B.

funktionelles MRT oder Positronenemissionstomografie (PET), bei beiden depressiven Patientengruppen eine veränderte Aktivierung des Hippocampus belegen, wobei die Ergebnisse verschiedener Studien hierbei nicht ganz eindeutig sind; zusammengefasst in (Campbell & MacQueen 2004; Ng et al. 2009). In neuropsychologischen Studien an unipolar bzw. bipolar depressiven Patienten konnte gezeigt werden, dass die Betroffenen besonders im Bereich des deklarativen Gedächtnisses Defizite aufweisen (Zakzanis et al. 1998; Gorp et al. 1999; Deckersbach et al. 2004; Bearden et al. 2006). Da der Hippocampus bei der Bildung des deklarativen Gedächtnisses eine wichtige Funktion hat (Eichenbaum 2001), ist auch hierbei von einer Beteiligung des Hippocampus auszugehen. Diesbezüglich konnte bei bipolar depressiven Patienten außerdem nachgewiesen werden, dass eine positive Korrelation zwischen dem Hippocampusvolumen und der Leistung bei Gedächtnisaufgaben besteht, d.h. kleinere Hippocampusvolumina mit einer schlechteren Gedächtnisfunktion einhergingen (Chepenik et al. 2012; Avery et al. 2014). In tierexperimentellen Studien konnten sowohl für antidepressiv wirksame Medikamente als auch für stimmungsstabilisierende Medikamente neuroprotektive Effekte bezüglich des Hippocampus von Nagetieren gefunden werden (Chen et al. 2000; Malberg et al. 2000; Young 2002). Diese Beobachtungen unterstützen nicht nur die Beteiligung des Hippocampus bei der Pathogenese der affektiven Erkrankungen, sondern auch seine Rolle als potentiell Angriffsziel für Medikamente, die bei der Behandlung von affektiven Störungen eingesetzt werden. In post mortem Studien an menschlichen Gehirnen konnte die hippocampale Volumenminderung bei depressiv erkrankten Personen bestätigt werden (Bielau et al. 2005; Bernstein et al. 2012b), insgesamt wurde dies aber nicht auf einen massiven neuronalen Zellverlust oder Unterdrückung der Neurogenese zurückgeführt, sondern vor allem auf Veränderungen somatodendritischer, axonaler und synaptischer Komponenten und auch auf Veränderungen der Gliazellen (Czéh & Lucassen 2007). Aufgrund der dargelegten bedeutenden Rolle des Hippocampus bei affektiven Störungen, wurde in der vorliegenden Studie diese Hirnregion für die Untersuchungen ausgewählt.



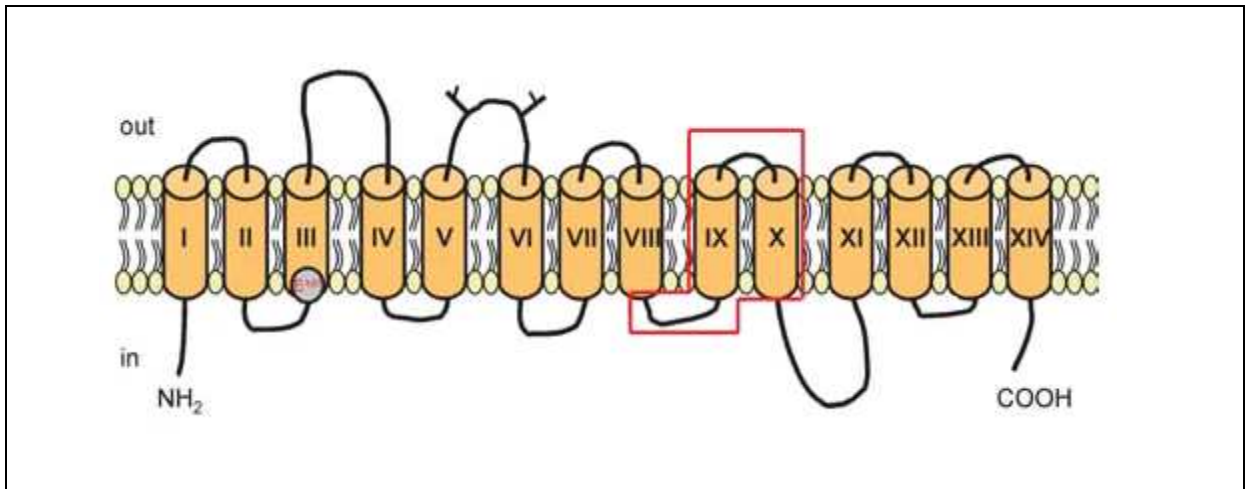
### 1.3 Der Kationische Aminosäuretransporter 1

Die semiessentielle Aminosäure L-Arginin hat eine bedeutende Funktion als Substrat für die Synthese verschiedener wichtiger bioaktiver Moleküle mittels unterschiedlicher Stoffwechselprozesse. Hier ist vor allem die Synthese von Harnstoff, Glutamat, Stickstoffmonoxid (NO), Kreatin, Agmatin und Polyaminen zu nennen; zusammengefasst in (Wu & Morris 1998; Wiesinger 2001; Morris 2004). Eine Übersicht der komplexen Stoffwechselwege ist in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Stoffwechselwege von Arginin.** Arginin kann über verschiedene Enzyme metabolisiert werden, um eine Reihe bioaktiver Moleküle zu produzieren. ADC = Arginin-Decarboxylase, AGAT = L-Arginin:Glycin-Amidino-Transferase, GAMT = Guanidinoacetat-N-Methyltransferase, NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase, nNOS = neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase, iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, ODC = Ornithin-Decarboxylase, Urea = Harnstoff. Nach (Liu et al. 2014), modifiziert.

Für jeden der aufgezeigten Stoffwechselwege ist die Bereitstellung des Substrates L-Arginin unabdingbare Voraussetzung für den ungestörten Ablauf der enzymatischen Reaktionen. Folglich ist es hierfür notwendig, die Aminosäure L-Arginin über die Zellmembran in die verschiedenen Zellen zu transportieren. Die Arbeitsgruppe um Halvor N. Christensen entdeckte in den 1960er Jahren ein Transportsystem für kationische Aminosäuren in Ehrlich-Zellen (Christensen 1964) und Retikulozyten von Kaninchen (Christensen & Antonioli 1969), welches später auch in humanen Fibroblasten nachgewiesen und als System  $y^+$  bezeichnet wurde (White et al. 1982); zusammengefasst in (Devés & Boyd 1998). Hierüber wurden neben L-Arginin auch andere kationische Aminosäuren, wie L-Ornithin und L-Lysin, transportiert und außerdem wurden für das Transportsystem  $y^+$  folgende spezifische Eigenschaften beschrieben: Natrium( $\text{Na}^+$ )-Unabhängigkeit, pH-Insensitivität und Stimulierbarkeit durch Substrat auf der gegenüberliegenden Seite der Membran (sogenannte Trans-Stimulation) (White et al. 1982; Closs et al. 2004). Der Arginintransport wird hierbei hauptsächlich über das Transportsystem  $y^+$  vermittelt, welches anschließend auch in zahlreichen anderen Zelltypen nachgewiesen werden konnte; zusammengefasst in (Devés & Boyd 1998; Wu & Morris 1998; Wiesinger 2001). Im Jahre 1991 wurde entdeckt, dass der Membranrezeptor für das ecotrope mausspezifische Leukämievirus, wenn er in Oozyten von Krallenfröschen exprimiert wird, kationische Aminosäuren transportiert und hierbei die Transporteigenschaften und das Expressionsmuster mit dem System  $y^+$  übereinstimmen (Kim et al. 1991; Wang et al. 1991). Zuvor war es einer Forschergruppe gelungen, die komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), die für den genannten Membranrezeptor kodiert, zu klonen, wobei man ursprünglich davon ausging, dass dieser die Anfälligkeit für die Infektion mit dem ecotropischen mausspezifischen Leukämievirus bestimmt (Albritton et al. 1989). Aufgrund seiner entdeckten zellulären Funktion wurde der Virusrezeptor in den kationischen Aminosäuretransporter 1 (CAT1), genauer in den mCAT1 für das Vorkommen in der Maus, umbenannt (Closs et al. 1993a). Der schematische Aufbau des Transporters ist Abb. 3 zu entnehmen.



**Abb. 3: Schematischer Aufbau von mCAT1.** Dargestellt sind 14 Transmembrandomänen und zwei Glykosylierungsstellen an der 3. extrazellulären Schleife. Der Proteinbereich, der die Transporteigenschaften bestimmt, ist in rot markiert. Nach (Verrey et al. 2004), modifiziert.

In der Folge konnten in verschiedenen Geweben von Nagetieren und auch vom Menschen (dort als humane CATs, hCATs, bezeichnet) insgesamt vier CATs identifiziert werden: CAT1, CAT2A, CAT2B und CAT3, die sich hinsichtlich ihrer verschiedenen kinetischen Eigenschaften und Gewebeexpressionsmuster unterscheiden (Closs et al. 1993b; Closs et al. 1997; Ito & Groudine 1997; Vékony et al. 2001); zusammengefasst in (Devés & Boyd 1998; Wiesinger 2001; Closs et al. 2006; Fotiadis et al. 2013). Die CAT-Proteine stellen eine Unterfamilie der Familie 7 der Transporter löslicher Substanzen (SLC) dar und werden beim Menschen durch folgende Gene repräsentiert: SLC7A1 (hCAT1), SLC7A2A (hCAT2A), SLC7A2B (hCAT2B) und SLC7A3 (hCAT3) (Verrey et al. 2004; Closs et al. 2006). Nicht nur in den peripheren Geweben, sondern auch im Gehirn zeigt sich eine weite, aber ungleiche Verteilung der verschiedenen CAT-Isoformen (Ito & Groudine 1997; Braissant et al. 1999, 2001; Vékony et al. 2001; Manner et al. 2003); zusammengefasst in (Wiesinger 2001; Fotiadis et al. 2013). Wegen des fast ubiquitären Vorkommens des CAT1-Proteins in peripheren Geweben und im Gehirn und auch aufgrund der Tatsache, dass die homozygote Deletion des CAT1-Gens bei Mäusen sogar letal verläuft, scheint das CAT1-Protein die wichtigste Bedeutung für die Aufrechterhaltung des normalen Arginintransports zu haben (Ito & Groudine 1997; Perkins et al. 1997; Braissant et al. 1999; Vékony et al. 2001). Aus diesem Grund soll das CAT1- bzw. hCAT1-Protein im Fokus der Betrachtungen der vorliegenden Studie stehen. Allerdings stammen die Daten über die Verteilung des

CAT1-Proteins im Gehirn hauptsächlich von Untersuchungen an Nagetieren und Daten für das menschliche Gehirn wurden selten erhoben und sind somit unvollständig (Vékony et al. 2001). Dies ist überraschend, wenn man bedenkt, dass L-Arginin und seine Metaboliten (Harnstoff, Glutamat, NO, Kreatin, Agmatin und Polyamine, siehe Abb. 2) eine Schlüsselrolle für die normale Gehirnfunktion und auch für ein weites Spektrum an Erkrankungen des Gehirns spielen; unter anderem zusammengefasst in (Fiori & Turecki 2008; Vural et al. 2009; Bernstein et al. 2011b; Uzbay 2012). Da die Aufdeckung der genauen neuroanatomischen Lokalisation des hCAT1-Proteins zu einem besseren Verständnis seiner Rolle in physiologischen und pathologischen Abläufen des Gehirns beitragen könnte, soll dies in der vorliegenden Studie zunächst mittels immunhistochemischer Methoden untersucht werden.

Weiterhin gibt es in der Literatur viele Hinweise darauf, dass verschiedenste Stoffwechselprozesse, die Arginin als Substrat verwenden (siehe Abb. 2), bei der Pathogenese von depressiven Erkrankungen von Bedeutung sind; unter anderem zusammengefasst in (Fiori & Turecki 2008; Dhir & Kulkarni 2011; Bernstein et al. 2012b; Sanacora et al. 2012; Uzbay 2012). Daher stellt sich berechtigterweise die Frage, ob schon der Transport der Aminosäure über das hCAT1-Protein beeinträchtigt ist und daher in der Pathogenese von depressiven Erkrankungen eine Rolle spielt. Diesbezüglich gibt es auch erste Hinweise darauf, dass die Expression des SLC7A1-Gens im Gehirn, welches für das hCAT1-Protein kodiert, bei depressiven Erkrankungen beeinträchtigt ist (Orsetti et al. 2009). Aufgrund der bereits im Kapitel (Kap.) 1.2 dargestellten hirmorphologischen Veränderungen im Hippocampus und der in der Literatur gefundenen Hinweise auf gestörte Stoffwechselprozesse in Neuronen dieser Hirnregion, die Arginin als Substrat verwenden (Oliveira et al. 2008; Bernstein et al. 2012b; Bernstein et al. 2014), soll in der vorliegenden Studie außerdem die Expression des hCAT1-Proteins in hippocampalen Neuronen bei depressiv erkrankten Patienten im Vergleich zu psychiatrisch gesunden Personen untersucht werden. Diesbezüglich wurden in bisherigen wissenschaftlichen Studien noch keine Daten erhoben.

## 1.4 Fragestellung und Hypothese

Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln ausführlich dargestellt, hat sich die vorliegende Studie, aufgrund der bisher spärlichen und unvollständigen Daten bezüglich der Verteilung des hCAT1-Proteins im menschlichen Gehirn (Vékony et al. 2001), zunächst als Ziel gesetzt, die präzise neuronanatomische Lokalisation des hCAT1-Proteins mittels immunhistochemischer Methoden aufzudecken und zu beschreiben. Dies soll zu einem besseren Verständnis der Funktion von hCAT1 in physiologischen und pathologischen Prozessen im menschlichen Gehirn beitragen. Des Weiteren gibt es in der wissenschaftlichen Literatur erste genetische Hinweise darauf, dass das hCAT1-Protein bei depressiven Erkrankungen eine Rolle spielen könnte (Orsetti et al. 2009). Aufgrund der zentralen Rolle des Hippocampus in der Pathogenese der depressiven Erkrankungen (Campbell & MacQueen 2004; Frey et al. 2007) und zusätzlichen Hinweisen in dieser Hirnregion auf gestörte neuronale Stoffwechselprozesse im Rahmen depressiver Erkrankungen, die auf eine Zufuhr von Arginin angewiesen sind (Oliveira et al. 2008; Bernstein et al. 2012b; Bernstein et al. 2014), soll in der vorliegenden Studie außerdem die hCAT1-Expression in Neuronen des Hippocampus untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist die Hypothese bzw. das Ziel der vorliegenden Arbeit, mittels immunhistochemischer Methoden den Nachweis einer veränderten neuronalen hCAT1-Expression im Hippocampus von depressiv erkrankten Patienten gegenüber psychiatrisch gesunden Personen zu erbringen und somit die Rolle des hCAT1-Proteins in der Pathogenese der Depression darzulegen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungsmaterial

Alle untersuchten Gehirne entstammen der Sammlung der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg. Gemäß den allgemein geltenden gesetzlichen Regelungen wurde die schriftliche Einwilligung der nächsten Angehörigen eingeholt. Außerdem lag für die Auswahl, Entnahme, Aufbereitung und Untersuchung der Gehirne ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg vor (Registriernummern 47/10 und 67/10).

Für die durchgeführte Studie wurden insgesamt 14 Gehirne von depressiven Patienten und im Vergleich neun Gehirne von psychisch gesunden Vergleichspersonen („Kontrollen“) untersucht. Hierbei wurde die Gruppe der depressiv Erkrankten zu gleichen Teilen in die zwei Subgruppen unipolare affektive Störung und bipolare affektive Störung unterteilt, sodass jeweils sieben Gehirne aus jeder Gruppe vorlagen. Die Diagnose der depressiven Erkrankung wurde zu Lebzeiten anhand der Diagnosekriterien der ICD gestellt. Die im Folgenden erläuterten demografischen Daten und Angaben zur Krankheit und Todesursache wurden der klinischen Falldokumentation entnommen, die zu jedem Patienten bzw. zu jeder Person der Kontrollgruppe vorlag.

Das Alter der depressiven Patienten mit einer unipolaren affektiven Störung war zwischen 35 und 63 Jahren, so dass das mittlere Alter bei  $45,6 \pm 11,9$  Jahren lag. Hierbei bestand die Gruppe aus vier Männern und drei Frauen, so dass sich ein annähernd ausgewogenes Geschlechterverhältnis zeigte. Weiterhin wurde eine durchschnittliche Autolysedauer von  $28,1 \pm 15,2$  Stunden ermittelt. Das Erkrankungsalter betrug in dieser Gruppe im Mittel  $40,5 \pm 14,4$  Jahre und die mittlere Erkrankungsdauer lag bei  $3,0 \pm 2,7$  Jahren. Die Medikation während der letzten 90 Tage vor dem Tod blieb bei drei Patienten dieser Gruppe unbekannt, zwei Patienten erhielten antidepressive Medikamente und keiner der Patienten nahm Neuroleptika ein. Hinsichtlich der Todesursachen ist bekannt, dass fünf Patienten durch Suizid starben und bei zwei Personen der Tod durch internistische Ursachen hervorgerufen wurde.

In der Gruppe der bipolaren affektiven Störungen lag das Alter der Patienten zwischen 39 und 65 Jahren, bei einem ermittelten Durchschnittsalter von  $51,0 \pm 9,2$  Jahren. Auch in dieser Untersuchungsgruppe befanden sich vier Männer und drei Frauen, wobei die mittlere Autolysedauer  $37,7 \pm 22,1$  Stunden betrug. Die Patienten erkrankten im Durchschnitt mit  $32,4 \pm 7,1$  Jahren und wiesen eine mittlere Erkrankungsdauer von  $18,0 \pm 7,0$  Jahren auf. Hinsichtlich der Medikation innerhalb der letzten 90 Tage vor dem Tod ist bekannt, dass vier Patienten Antidepressiva einnahmen und drei Patienten Neuroleptika erhielten. Die Medikation blieb bei zwei Personen der Untersuchungsgruppe unbekannt. Bezüglich der Todesursache handelte es sich bei vier Patienten um einen Suizid, die anderen drei Patienten starben an einer internistischen Ursache.

Innerhalb der Kontrollgruppe war das Alter der Personen zwischen 38 und 64 Jahren mit einem Durchschnittsalter von  $51,2 \pm 10,1$  Jahren. Hinsichtlich des Geschlechts ergab sich mit fünf männlichen und vier weiblichen Personen eine Verteilung entsprechend der anderen beiden Untersuchungsgruppen. Die durchschnittliche Autolysedauer betrug  $41,3 \pm 16,0$  Stunden. Insgesamt lag bei allen Personen der Kontrollgruppe weder eine neuropsychiatrische Erkrankung noch die Einnahme von Psychopharmaka vor. Weiterhin bestand bei keiner Kontrollperson Drogen- oder Alkoholmissbrauch. Durch einen erfahrenen Neuropathologen wurden andere Veränderungen der Gehirne durch neurodegenerative oder traumatische Prozesse ausgeschlossen. Bei acht Personen der Kontrollgruppe wurde der Tod durch internistische Ursachen hervorgerufen, bei einer Person blieb die Todesursache unbekannt.

Um den Einfluss der konfundierenden Variablen zu minimieren, ist es günstig, wenn sich die Gruppen hinsichtlich ihrer konfundierenden Variablen nicht unterscheiden. Dies wurde mit Hilfe der Differenzstatistik überprüft. Dabei zeigte sich, dass es hinsichtlich des Geschlechts, des Alters und der Autolysedauer keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Untersuchungsgruppen gab. Außerdem erwiesen sich die Differenzen bezüglich des Krankheitsbeginns unter den unipolaren und bipolaren affektiven Störungen als nicht signifikant. Allerdings fiel hinsichtlich der Krankheitsdauer ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen auf. Einen Überblick über die demografischen Daten und die Differenzstatistik gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: Demografische Daten und Differenzstatistik der Untersuchungsgruppen.

ID	Geschlecht [m - männlich, w - weiblich]	Alter [Jahre]	Autolyse- dauer [h]	Krankheits- beginn [Jahre]	Krankheits- dauer [Jahre]	Todes- ursache
<b>Unipolare affektive Störungen (n=7)</b>						
1	m	42	5	-	-	Suizid durch Erhängen
2	w	39	48	32	7	Suizid durch Tabletten
3	w	63	24	62	2	Lungenembolie
4	m	35	24	33	2	Suizid durch Pulsaderschnitt
5	m	36	48	35	1	Suizid durch Erhängen
6	m	42	24	-	-	Akute Pankreatitis
7	w	62	24	-	-	Suizid durch Erhängen
<b>3w / 4m</b>		<b>45,6 ± 11,9</b>	<b>28,1 ± 15,2</b>	<b>40,5 ± 14,4</b>	<b>3,0 ± 2,7</b>	<b>-</b>
<b>Bipolare affektive Störungen (n=7)</b>						
1	m	47	24	38	9	Suizid durch Erstechen
2	m	42	12	25	17	Suizid durch Erhängen
3	w	59	72	34	25	Suizid durch Tabletten
4	m	39	56	25	14	Myokardinfarkt
5	w	52	24	-	-	Fulminante Lungenembolie
6	w	65	52	40	25	Linksherzdekompensation
7	m	53	24	-	-	Suizid durch Erhängen
<b>3w / 4m</b>		<b>51,0 ± 9,2</b>	<b>37,7 ± 22,1</b>	<b>32,4 ± 7,1</b>	<b>18,0 ± 7,0</b>	<b>-</b>
<b>Gesunde (n=9)</b>						
1	m	50	72	-	-	Myokardinfarkt
2	m	47	24	-	-	Myokardinfarkt
3	w	48	48	-	-	Status Asthmaticus
4	m	47	24	-	-	Respiratorische Insuffizienz
5	m	64	36	-	-	Rupturiertes Bauchaortenaneurysma
6	m	63	48	-	-	Aneurysma dissecans der Aorta
7	w	64	24	-	-	Gastrointestinalblutung
8	w	38	48	-	-	Myokardinfarkt
9	w	40	48	-	-	-
<b>4w / 5m</b>		<b>51,2 ± 10,1</b>	<b>41,3 ± 16,0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>Differenzstatistik Affektive Störungen vs. Gesunde</b>						
<b>rel. Differenz</b>		-5,73%	-20,33%	-	-	
<b>Test</b>	Chi-Quadrat	t-Test	t-Test	-	-	
<b>KW<sup>b</sup></b>	$\chi^2 = 0,006$	T = - 0,661	T = -1,101	-	-	
<b>p-Wert</b>	0,940	0,516	0,283	-	-	
<b>Differenzstatistik Unipolare vs. Bipolare vs. Gesunde</b>						
<b>Test</b>	Chi-Quadrat	ANOVA	ANOVA	t-Test <sup>a</sup>	t-Test <sup>a</sup>	
<b>KW<sup>b</sup></b>	$\chi^2 = 0,006$	F = 0,695	F = 1,109	T = 1,114	T = -4,007	
<b>p-Wert</b>	0,997	0,511	0,349	0,302	<b>0,005</b>	

Dargestellt sind die demografischen Daten der Untersuchungsgruppen und die Differenzstatistik, die mittels Chi-Quadrat-Test, Varianzanalyse (ANOVA) und t-Test durchgeführt wurde. a = Unipolare vs. Bipolare, b = Kennwert, n = Anzahl.



## **2.2 Herstellung der Gehirnschnittpräparate**

Die untersuchten Gehirne wurden nach dem Tod entnommen und zunächst für etwa drei Monate in phosphatgepufferter 10%iger Formaldehydlösung fixiert. Nachdem die Fixierungszeit abgelaufen war, wurde von einem Neuropathologen sowohl der Frontalpol als auch der Okzipitalpol mittels Koronarschnitten abgetrennt. Die Trennung erfolgte jeweils vor dem Knie des Corpus Callosum und hinter dem Splenium des Corpus Callosum.

Danach fand eine dreistündige Spülung unter fließendem Leitungswasser statt, bevor die Gehirne einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung zugeführt wurden. Dabei steigerte sich wöchentlich die Alkoholkonzentration (50% - 60% - 70% - 80% - 90% - 96% - 100% - 100%) über insgesamt acht Wochen. Anschließend wurden die Gehirne für sieben Tage in Chloroform, welches täglich gewechselt wurde, eingebracht. Abschließend folgte die definitive Einbettung der Gehirne in Paraffin (Shandon Histoplast, Thermo Scientific, UK).

Mit Hilfe eines Großschnittmikrotoms (Polycut S, Leica, DE) wurden Koronarschnitte angefertigt, wobei die Schichtdicke auf 20 $\mu$ m eingestellt war. Bevor die Schnitte auf den jeweiligen Objektträger aufgezogen wurden, erfolgte das Glätten des Gewebes in einem Wasserbad mit der Temperatur von 40°C, welches zur besseren Haftung des Materials am Objektträger mit Gelatine (Fluka, DE) versetzt war. Nachdem die Schnittpräparate kurzzeitig auf einer Wärmeplatte aufbewahrt wurden, folgte zur weiteren Trocknung des Gewebes die Lagerung in einem Brutschrank mit einer Temperatur von 37°C für 24 Stunden.

## **2.3 Kombinierte Markscheiden-Nissl-Färbung**

Standardisiert wurde jeder 50. Schnitt ausgewählt, um ihn mit einer kombinierten Neuronenfärbung nach Nissl sowie einer Markscheidenfärbung nach Heidenhain-Woelke zu behandeln. Hierzu musste zunächst die Entparaffinierung des Materials vorgenommen werden. Dies geschah, indem die Schnitte erst zweimal für jeweils zehn Minuten in Xylol getaucht und danach für jeweils fünf Minuten einer absteigenden Alkoholreihe (100%-96%-80%-70%-50%) zugeführt wurden. Es folgte die zweimalige Spülung mit destilliertem Wasser (Aqua dest.) für je fünf Minuten. Danach fand die Inkubierung des Materials über Nacht bei Raumtemperatur mit

2,5%igem Eisenalaun statt, welches vorher durch die Lösung von 50g Ammoniumeisen(III)-Sulfat-Dodecahydrat in 2000ml Aqua dest. hergestellt wurde. Nach der zweimaligen Spülung mit Aqua dest. für jeweils fünf Minuten fand eine Behandlung der Präparate für 1-1,5 Stunden mit einer Hämatoxylin-Farblösung statt. Diese wurde im Vorfeld hergestellt, indem zunächst 0,6g Natriumjodat in 2000ml Aqua dest. gelöst wurden. Hiervon wurden wieder 400ml verworfen und zu der restlichen Lösung wurden 20g Hämatoxylin (gelöst in 200ml 96%igem Alkohol) und 2g Lithiumcarbonat (gelöst in 200ml Aqua dest.) gegeben. Vor Verwendung der fertigen Hämatoxylin-Farblösung wurde diese gut gemischt und filtriert. Im nächsten Schritt wurden die Präparate mit 70%igem Alkohol und zweimal mit Aqua dest. abgespült, bevor die Färbung mit 2%igem Kresylviolett stattfand. Die Kresylviolett-Farblösung wurde wiederum durch das Lösen von 40g Kresylviolett in 2000ml Aqua dest. unter Erwärmung hergestellt und vor der Benutzung sowohl durch einen Doppelfilter filtriert als auch im Kühlschrank aufbewahrt. Nachdem die Gehirnschnitte 15-mal kurz in die Kresylviolett-Farblösung eingetaucht wurden, erfolgte mit Aqua dest. eine zweimalige Spülung. Im Anschluss daran wurden die Schnittpräparate mit Essigsäure-Alkohol, bestehend aus 2000ml 96%igem Alkohol mit 12ml Essigsäure, differenziert. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob die gewünschte Farbintensität erreicht ist. Falls dies nicht zutreffend war, fand eine weitere Differenzierung statt. Die nachfolgende Spülung wurde zweimal mittels Aqua dest. durchgeführt. Zur Entwässerung der Schnitte wurden diese nun nacheinander in 96%igen Alkohol (zwei Minuten), 100%igen Alkohol (zweimal vier Minuten) und Xylol (zweimal zehn Minuten) gebracht. Dann fand die Säuberung der Präparate mit Salzsäure-Alkohol, hergestellt aus 1000ml 70%igem Alkohol und 10ml konzentrierter Salzsäure, statt. Zum Abschluss wurden die Gehirnschnitte unter einem Deckglas mit Eukitt (O. Kindler, DE) eingedeckt.

Zwischen den mit dieser Färbemethode angefertigten Gehirnschnitten lag ein Abstand von 1mm, da die Schnittdicke, wie bereits erwähnt, 20 $\mu$ m betrug und jeder 50. Schnitt ausgewählt wurde. Später dienten diese sogenannten Übersichtsschnitte der Orientierung im jeweiligen Gehirn, sodass die individuell variierenden neuroanatomischen Strukturen besser lokalisiert werden konnten. Die restlichen bisher ungefärbten Gehirnschnitte wurden direkt nach dem Verbleib im Brutschrank (siehe Kap. 2.2) in einer Kühlkammer gelagert, bis die benötigten Schnitte der immunhistochemischen Färbung zugeführt wurden.

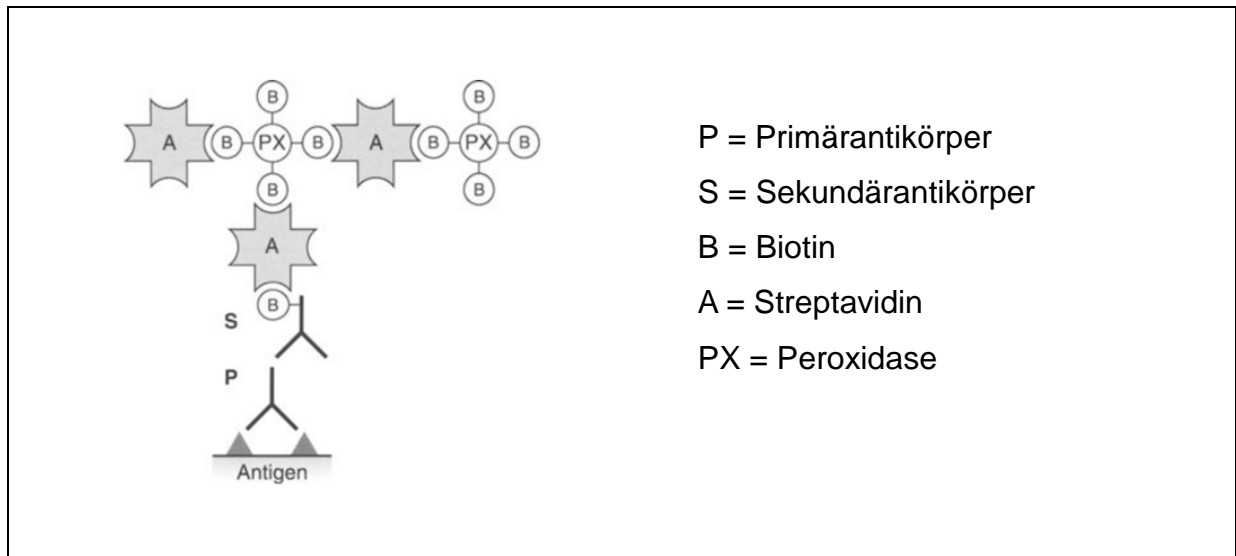
## 2.4 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde mittels der sogenannten Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) vorgenommen. Für die vorliegende Studie wurde Avidin durch Streptavidin ersetzt.

Zunächst erfolgte der Vorgang der Entparaffinierung, der analog zur bereits oben beschriebenen Methode durchgeführt wurde (siehe Kap. 2.3). Nachdem die Spülung der Gehirnschnittpräparate für zweimalig fünf Minuten mit Aqua dest. stattfand, wurden sie über vier Minuten in 0,1M Citratpuffer (pH-Wert = 6) gekocht, um eine Demaskierung der Epitope für die spätere Antikörperbindung zu erreichen. Es folgten zwei Spülschritte mit Aqua dest. für jeweils fünf Minuten und eine weitere fünfminütige Spülung mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Sigma, US), welche einen physiologischen pH-Wert von 7,4 aufwies. Um eine unspezifische Hintergrundanfärbung durch endogene Peroxidasen zu reduzieren, wurden die Präparate für zehn Minuten mit 1,5%iger Wasserstoffperoxid(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Lösung (verdünnt mit PBS) behandelt. Danach schloss sich eine zweimalige Spülung mit PBS für jeweils fünf Minuten an. Weiterhin wurde das Gewebe mit 1:10 verdünntem Ziegennormalserum (Sigma, US) für 60 Minuten im Schüttler inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungsstellen zu blockieren.

Nach dieser Vorbehandlung wurde ein primärer Antikörper appliziert, der spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. In diesem Fall ein polyklonaler Immunglobulin G-Antikörper gegen das hCAT1-Protein (Proteintech Europe, UK), der in einer Verdünnung in PBS von 1:100 vorlag und aus dem Kaninchen gewonnen wurde. Nach 60 Minuten auf dem Schüttler erfolgte die Inkubation der Schnitte im Kühlschrank über 72 Stunden. Es schlossen sich zwei Spülschritte mit PBS für jeweils fünf Minuten an. Danach wurde der sekundäre Antikörper, ein biotinylierter polyklonaler aus der Ziege gewonnener Anti-Kaninchen-Antikörper (DakoCytomation, DK), in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen. Dieser Sekundärantikörper war wiederum spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet. Nachdem die Schnitte für weitere zwei Stunden auf dem Schüttler inkubiert wurden, fand eine erneute Spülung für zweimal fünf Minuten mit PBS statt. Anschließend folgte die Behandlung der Schnitte mit dem 1:100 verdünnten Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex (GE Healthcare, UK) für 60 Minuten auf dem Schüttler. Da der Sekundärantikörper biotinyliert ist und Streptavidin eine hohe Affinität zum Molekül Biotin hat, entstand

ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (siehe Abb. 4). Es folgten zwei Spülschritte mit PBS über jeweils fünf Minuten.



**Abb. 4: Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode).** Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Epitop des gesuchten Antigens. Daraufhin findet eine weitere spezifische Bindung zwischen primärem und biotinyliertem sekundären Antikörper statt. Aufgrund der hohen Affinität von Streptavidin zu Biotin entsteht ein Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Die an Streptavidin gekoppelte Peroxidase ist verantwortlich für die spätere Farbreaktion. Nach (Remmele 1999), modifiziert.

Anschließend wurde die eigentliche Färbung mit einer vorher gefertigten Färbelösung vorgenommen. Zur Herstellung wurden jeweils 0,5g Ammonium-Nickel(II)-Sulfat-Hexahydrat (Aldrich, DE) und 0,0125g 3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma, US) in zwei separaten Ansätzen in PBS gelöst, bevor die Zusammenführung und Filtrierung der beiden Lösungen stattfand. Das Filtrat wurde auf ein Gesamtvolumen von 25ml mit PBS aufgefüllt und direkt vor dem Färben mit 250 $\mu$ l 1%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Mit dieser Farblösung wurden die Schnitte für zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Hierbei katalysierte die Peroxidase, unter Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, die Reaktion des farblosen DAB zur braunen oxidierten Form des DAB. Die Intensität der Färbung wurde durch das in der Lösung befindliche Ammonium-Nickel(II)-Sulfat-Hexahydrat weiter verstärkt und die gesamte Prozedur erbrachte ein blau-violettes Reaktionsprodukt (Bernstein et al. 1999). Die hierdurch angefärbten Strukturen konnten als hCAT1-immunpositiv bezeichnet werden. Danach wurden die Präparate zweimal mit Aqua dest. gespült und zur Dehydrierung einer aufsteigenden Alkoholreihe (jeweils fünf Minuten 50%-70%-80%-96%-100%) zugeführt, bevor eine Behandlung für zweimal zehn Minuten mit Xylol stattfand.

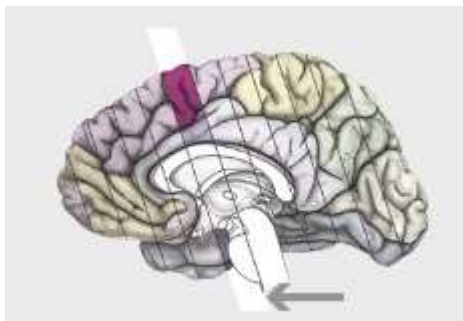
Zuletzt wurden die Schnittpräparate mit Eukitt (O. Kindler, DE) unter einem Deckglas eingedeckt. Um die Spezifität der immunhistochemischen Färbung zu kontrollieren, wurde während des bereits beschriebenen Prozesses der primäre Antikörper durch PBS ersetzt. Hierbei kam es zu keiner immunhistochemischen Färbung in den Kontrollschnitten.

## **2.5 Qualitative Bewertung**

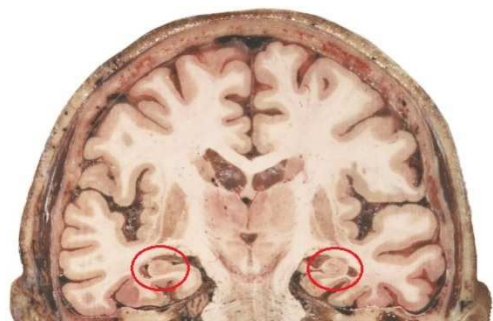
Um sich zunächst einen Überblick über die Verteilung hCAT1-exprimierender Strukturen im gesamten Gehirn zu verschaffen, wurden fünf Gehirne von psychiatrisch gesunden Personen ausgewählt und in diesen verschiedene Regionen des Gehirns auf das Vorhandensein von hCAT1-Protein hin untersucht. Hierfür wurden Gehirnschnittpräparate des Telenzephalons, des Dienzephalons, des Zerebellums, und des Hirnstamms durchmustert und die regionale und zelluläre Verteilung des Proteins erfasst. Dabei wurde nach der Stärke der blau-violetten Färbung unterteilt in schwache, moderate und starke Expression des hCAT1-Proteins. Weitere Einzelheiten zum Untersuchungsmaterial und Prozedere sind der Publikation (Jäger et al. 2013; Bernstein et al. 2014) zu entnehmen.

## **2.6 Zellzählung und Dichtebestimmung**

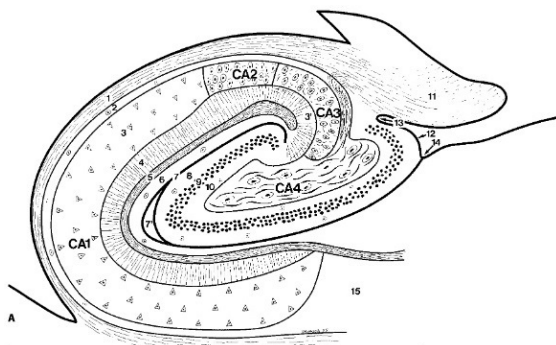
Für die Zählung der hCAT1-immunreaktiven Neurone wurde ein Mikroskop der Firma Olympus vom Typ BH 2 verwendet. Vor der Zählung wurde der Hippocampus und die einzelnen hippocampalen Subregionen zunächst ohne Mikroskop und zur Kontrolle unter 40facher Vergrößerung (Okular zehnfach, Objektiv vierfach) identifiziert und mit Hilfe eines wasserfesten Stifts (Staedtler, DE) auf dem entsprechenden Schnitt markiert. Die Lokalisation des dorsalen Hippocampus und die Identifikation der für diese Arbeit relevanten Subregionen (CA1, CA2, CA3, CA4 und Subiculum) erfolgten nach (Mai et al. 2008) und (Duvernoy 2005) und können schematisch den Abb. 5 bis 8 entnommen werden.



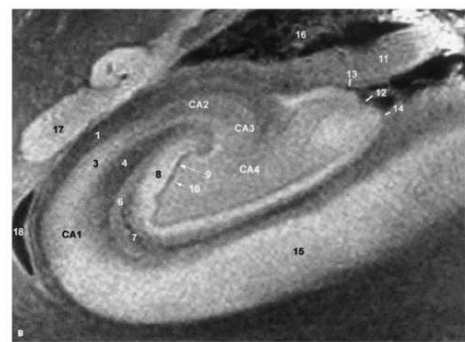
**Abb. 5: Mediane Darstellung der koronaren Schnittführung.** Der Pfeil zeigt auf Schnittebene und Blickrichtung. Nach (Mai et al. 2008), modifiziert.



**Abb. 6: Koronarschnitt.** Schnittebene und Blickrichtung entsprechend Abb.5. Markiert ist auf beiden Seiten die interessierende Region des Hippocampus. Nach (Mai et al. 2008), modifiziert.



**Abb. 7: Schema des Hippocampus im Koronarschnitt.** Hervorzuheben sind die relevanten Subregionen CA1 – CA4 und Sub (Nr. 15). Nach (Duvernoy 2005), modifiziert.



**Abb. 8: MRT-Aufnahme des Hippocampus im Koronarschnitt.** Beschriftung entsprechend Abb. 7. Nach (Duvernoy 2005), modifiziert.

Die Zählung selbst wurde bei 400facher Vergrößerung (Okular zehnfach, Objektiv 40fach) durchgeführt. Ein im Okular des Mikroskops eingelassenes Zählgitter definierte hierbei die Fläche einer Zählbox auf 0,0625mm<sup>2</sup>. Den neuronatomischen Gegebenheiten entsprechend wurden in jeder Subregion des Hippocampus mindestens zehn Zählboxen (maximal 20 Zählboxen) erfasst. Bei der Zählung wurde darauf geachtet, dass nur Neurone gezählt wurden, deren Zellgrenzen und Zellkörper klar abgrenzbar waren und bei denen auch der Zellkern deutlich zu erkennen war. Gezählt wurden angefärbte Neurone, die sich innerhalb der Zählbox befanden sowie auf der rechten und unteren Begrenzungslinie, um eine doppelte Erfassung der Zellen zu vermeiden. Die gesamte Zählung wurde blind vorgenommen, das heißt die zählende Person hatte keine Kenntnis davon, ob es

sich um das Gehirnschnittpräparat einer psychiatrisch gesunden Kontrollperson oder eines depressiven Patienten handelte.

Um folglich die Dichte der hCAT1-exprimierenden Neurone zu bestimmen, wurde zunächst die Zellzahl über die jeweils gezählten Zählboxen gemittelt. Außerdem floss der Volumenschrumpfungsfaktor in die Berechnung mit ein, da die Gewebereinbettung der Gehirne ein reduziertes Volumen zur Folge hat. Dieser wurde für jedes Gehirn der Magdeburger Hirnsammlung ermittelt, indem Fotos von den einzelnen Hirnblöcken vor und nach der Einbettung angefertigt wurden und die Oberflächen dann ins Verhältnis zueinander gesetzt wurden. Der über alle Gehirne gemittelte Volumenschrumpfungsfaktor wurde mit 2,15 bestimmt. Außerdem wurden auch die nach der histologischen Färbung mittels Mikroskop bestimmten Schichtdicken über alle Gehirne der Sammlung gemittelt und für die Berechnungen eine mittlere Schichtdicke von 0,018mm zugrundegelegt. Nach folgender Formel wurde schließlich die Dichte der hCAT1-immunreaktiven Neurone ermittelt:

$$D = \frac{Z}{A \cdot d \cdot VSF}$$

D = Dichte [Zellen/mm<sup>3</sup>]

Z = Mittlere Zellzahl der Zählboxen

A = Fläche der Zählbox = 0,0625mm<sup>2</sup>

d = Mittlere Schichtdicke = 0,018mm

VSF = Mittlerer Volumenschrumpfungsfaktor = 2,15

## 2.7 Verfahren zur Datenanalyse

Mit Hilfe des Shapiro-Wilk-Tests wurden sämtliche Stichproben auf Normalverteilung untersucht. Die Nullhypothese wurde hierbei nicht abgelehnt, so dass weitere Analysen mit Hilfe parametrischer Tests gerechnet werden konnten. Der Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde mit dem t-Test berechnet, der Vergleich von drei unabhängigen Stichproben wurde mittels Varianzanalyse (ANOVA) umgesetzt und Einflüsse von Störfaktoren wurden mit dem „Allgemeinen linearen Modell“ analysiert. Zur Berechnung von Korrelationen wurde die Methode nach Pearson genutzt. Sämtliche statistische Verfahren wurden mit der Hilfe der Software SPSS15.0.1 (International Business Machines Corporation, US) durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei 5%.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Verteilung des hCAT1-Proteins im menschlichen Gehirn**

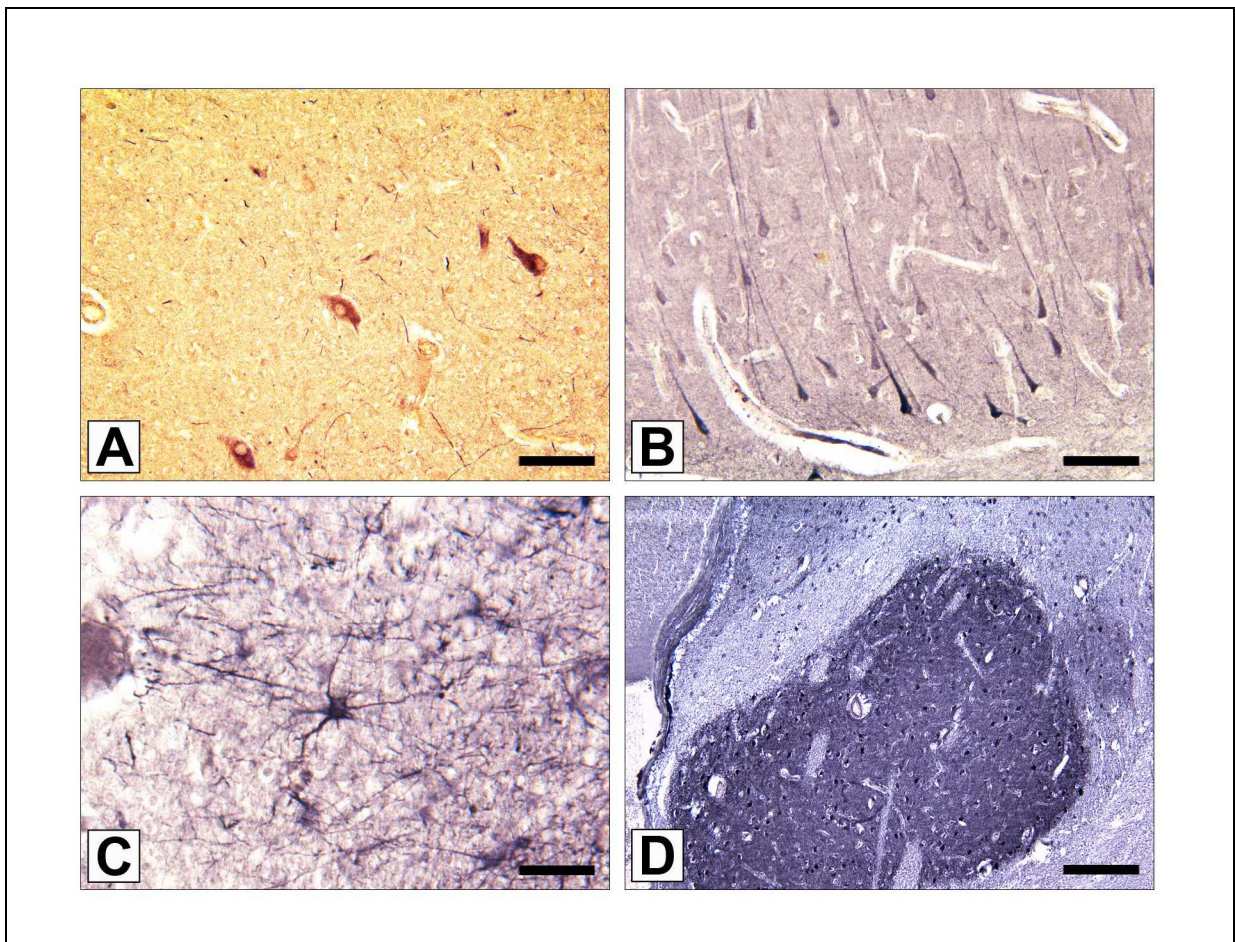
Generell zeigte sich bei der Durchmusterung der ausgewählten Gehirne von psychiatrisch gesunden Personen eine Immunreaktivität für hCAT1 in Neuronen (moderat bis stark), Astrozyten (stark) und Oligodendrozyten (moderat), sowie im Plexus choroideus (stark) und in einigen Kapillaren (moderat bis stark). Intraneuronal war die hCAT1-Immunreaktivität im Perikaryon und in den Dendriten lokalisiert. Hierbei blieb der Nukleus in der Regel ohne Färbung und hob sich hell vom restlichen Perikaryon ab. Die einzige Ausnahme davon waren einige parahippocampale Interneurone, bei denen es eine Immunfärbung im Nukleus zu verzeichnen gab. Gelegentlich zeigte sich auch eine schwache bis moderate hCAT1-Immunreaktivität im Neuropil.

#### **3.1.1 Telenzephalon**

Bei den untersuchten Regionen der Großhirnrinde handelte es sich um den Gyrus parahippocampalis mit entorhinalen Kortex, den orbitofrontalen Kortex, den inferioreren temporalen Gyrus, den medialen temporalen Gyrus, den Inselkortex mit Gyri breves insulae und Gyrus longus insulae, den medialen frontalen Gyrus, den superioren frontalen Gyrus, den anterioren Gyrus cinguli und den dorsolateralen präfrontalen Kortex. In allen diesen Regionen zeigten sich hCAT1-immunpositive Neurone, wobei die Anzahl in präfrontalen Regionen (wie anteriorer Gyrus cinguli oder dorsolateraler präfrontaler Kortex) eher gering war und sich auf große Pyramidenzellen in der Schicht V beschränkte (siehe Abb. 9A). In anderen kortikalen Arealen (wie inferiorer und medialer temporaler Gyrus oder Gyrus parahippocampalis mit entorhinalen Kortex) wurde das hCAT1-Protein in zahlreichen Neuronen und allen Kortexschichten gefunden. Interessanterweise fanden sich zahlreiche intensiv für hCAT1-immungefärbte Astrozyten am Übergang von grauer Substanz (Schicht VI) zu weißer Substanz. Im Hippocampus zeigten viele Pyramidenzellen eine moderate hCAT1-Expression (siehe Abb. 9B). Im Gyrus dentatus fanden sich nur schwach angefärbte Neurone. Im Unterschied zur Mehrzahl der Pyramidenzellen wiesen einige Interneurone eine starke Immunmarkierung auf. Extraneuronal zeigten vor



allem alveoläre Astrozyten eine starke Expression des hCAT1-Proteins auf (siehe Abb. 9C). Zahlreiche Neurone der Amygdala waren immunreaktiv für hCAT1, allerdings war dies nur schwach ausgeprägt. Auch die Mehrzahl der Neurone im Nucleus basalis Meynert zeigten sich immunpositiv für das hCAT1-Protein. Bezüglich der Basalganglien ergab sich nicht nur eine sehr starke hCAT1-Expression in Neuronen des Nucleus caudatus und im daran angrenzenden Neuropil (siehe Abb. 9D), sondern auch im Putamen. In der Capsula interna hingegen wurden zahlreiche hCAT1-immunpositive Astrozyten gefunden.



**Abb. 9: Expression von hCAT1 im Telenzephalon.** **A** Immunreaktive Neurone für hCAT1 im dorsolateralen präfrontalen Kortex, hierbei beschränkt sich die Immunreaktivität auf einige Pyramidenzellen. Balken =  $80\mu\text{m}$ . **B** Viele hCAT1-exprimierende Pyramidenzellen im Hippocampus in der Region CA2. Balken =  $100\mu\text{m}$ . **C** Immunpositive Astrozyten für hCAT1 im Alveus des Hippocampus. Balken =  $40\mu\text{m}$ . **D** Sehr starke hCAT1-Expression in Neuronen des Nucleus Caudatus und dem angrenzenden Neuropil. Balken =  $250\mu\text{m}$ .

### **3.1.2 Dienzephalon**

Im Thalamus ergab sich insgesamt eine moderate Intensität der immungefärbten Neurone für hCAT1, wobei im Nucleus reticularis eine sehr starke Färbung zu verzeichnen war (siehe Abb. 10A). In der medialen Habenula zeigten sich die Mehrheit der Neurone hCAT1-immunpositiv. Eine sehr intensive Immunfärbung für das untersuchte Protein fand sich in Neuronen des Corpus geniculatum laterale und auch in der subventrikulären Zone. Der Hypothalamus fiel als einer der Hirnregionen mit der prominentesten Immunfärbung für hCAT1 auf. Die am stärksten ausgeprägte Immunreaktivität zeigte sich hierbei in parvozellulären Neuronen des Nucleus paraventricularis, aber auch in Neuronen der lateralen hypothalamischen Kerngebiete, des Nucleus supraopticus und des Nucleus arcuatus. Außerdem wurden in diesen Regionen zahlreiche Astrozyten gefunden, die immunreaktiv für hCAT1 waren. Bei der Untersuchung des Hypophysenstiels fiel auf, dass mehrere Nervenfasern eine starke Expression des hCAT1-Proteins aufwiesen.

### **3.1.3 Zerebellum**

Zelluläre Strukturen des Zerebellums zeigten im Durchschnitt eine schwache bis moderate Immunreaktivität für hCAT1. In einigen Purkinje-Zellen zeigte sich nur ein schwaches Reaktionsprodukt in den Zellkörpern und manchmal auch in den Dendriten. Entgegen der schwachen Reaktion in diesen Zellen, wurde beobachtet, dass ein paar Körnerzellen und Golgi-Zellen stark immunpositiv für hCAT1 waren (siehe Abb. 10B). Außerdem wurde das hCAT1-Protein in bestimmten Neuronen der tiefen Kleinhirnerne gefunden. Hierbei handelte es sich um Nervenzellen des Nucleus dentatus, des Nucleus emboliformis, des Nucleus fastigii und des Nucleus globosus.

### **3.1.4 Hirnstamm**

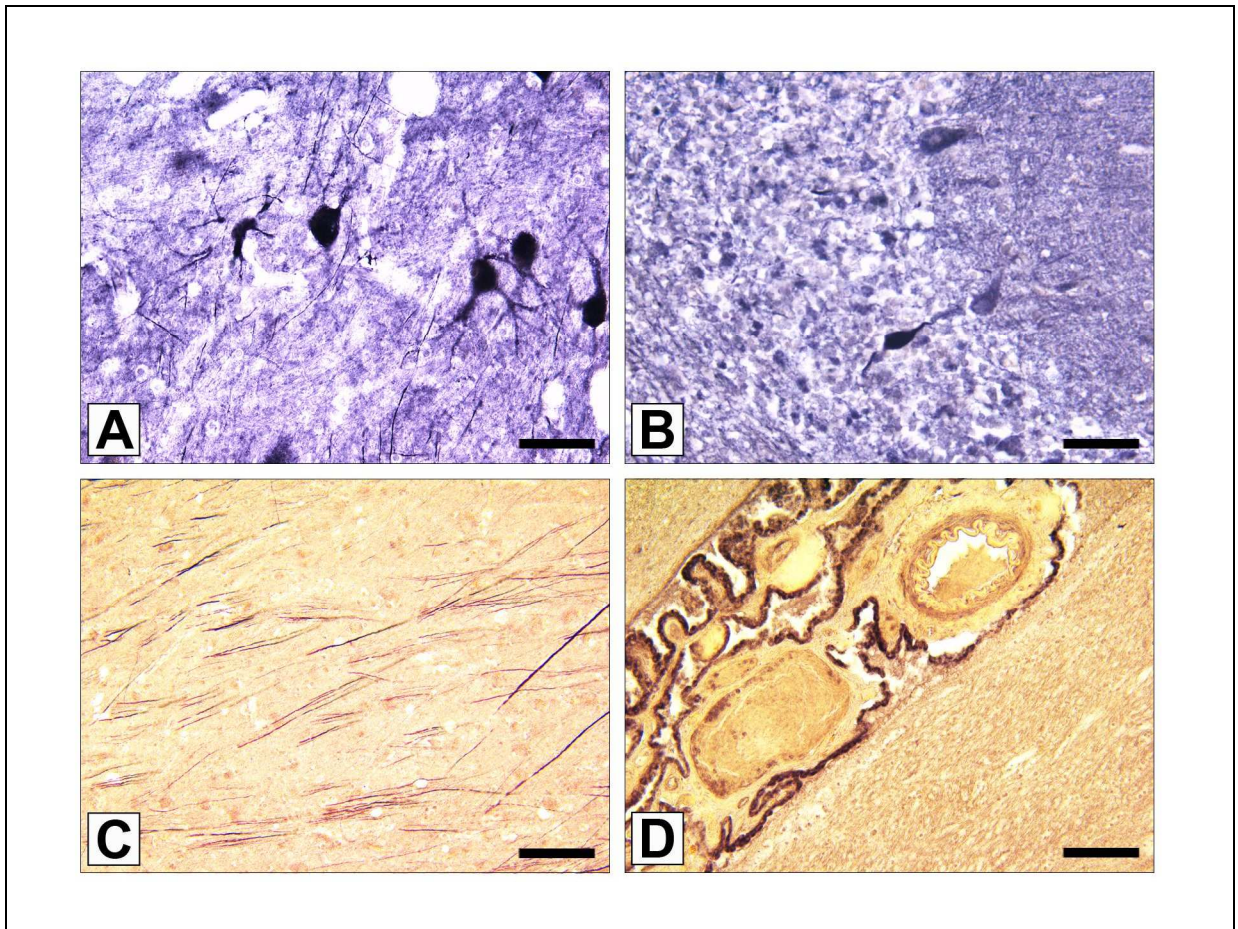
Im Mesenzephalon ließ sich durchschnittlich eine moderate Intensität der Immunfärbung für hCAT1 feststellen. Dabei wurden einige immunpositive Neurone im ventralen Tegmentum gefunden. Außerdem fanden sich zahlreiche Astrozyten, die das hCAT1-Protein exprimierten. Im Bereich der Pons und der Medulla oblongata wurde das Vorhandensein von hCAT1 in einigen Kerngebieten beobachtet. Hierzu gehörten vor allem Neurone in den Kerngebieten des Nervus trigeminus und des

Nervus vestibularis. Außerdem zeigten sich auch im Nucleus olivaris inferior immunreaktive Neurone für hCAT1.

### **3.1.5 Weiße Substanz und Plexus choroideus**

In der weißen Substanz fanden sich viele Astrozyten, die eine Immunreaktivität für hCAT1 aufwiesen. Außerdem wurde hCAT1 in zahlreichen parafaszikulären Oligodendrozyten beobachtet, hierbei besonders im Corpus Callosum. Auch ein paar Neurone im Interstitium der weißen Substanz waren für das untersuchte Protein immunpositiv. Eine interessante Beobachtung war das Vorhandensein von hCAT1 in vielen kreuzenden Nervenfasern (siehe Abb. 10C). Des Weiteren fielen auch einige Blutgefäße auf, die das hCAT1-Protein exprimierten.

Hinsichtlich des Plexus choroideus wurde eine starke Expression von hCAT1 sowohl in den kubischen Ependymzellen des Plexusepithels als auch in zahlreichen Kapillaren gefunden (siehe Abb. 10D).



**Abb. 10: Expression von hCAT1 in Dienzephalon, Zerebellum, weißer Substanz und Plexus Choroideus.** **A** Immunreaktive Neurone für hCAT1 im Nucleus reticularis des Thalamus. Balken = 40 $\mu$ m. **B** Expression des hCAT1-Proteins in zerebellären Neuronen. Einige Purkinjezellen, Golgizellen und Körnerzellen sind immunpositiv. Balken = 60 $\mu$ m. **C** Zahlreiche hCAT1-exprimierende Nervenfasern in der weißen Substanz. Balken = 40 $\mu$ m. **D** Intensive Immunreaktivität für das hCAT1-Protein in den Epithelzellen des Plexus choroideus. Balken = 100 $\mu$ m.

Eine zusammenfassende Darstellung der wichtigsten Ergebnisse bezüglich der Verteilung des hCAT1-Proteins im menschlichen Gehirn gibt Tabelle 2.

**Tabelle 2: Expression von hCAT1 im menschlichen Gehirn.**

Untersuchte Region im menschlichen Gehirn	Intensität der Immunfärbung
Zelluläre Distribution	
Neurone	++/+++
Astrozyten	+++
Oligodendrozyten	++
Telenzephalon	
Präfrontaler Kortex	++
Andere Areale des zerebralen Kortex	+++
Nucleus caudatus und Putamen	+++
Hippocampus	++
Subregionen CA1 - CA4	+/++
Gyrus dentatus	+
Polymorphe/molekulare Schichten	++
Subiculum	++/+++
Amygdala	+
Diencephalon	
Thalamus	++
Nucleus reticularis	+++
Corpus geniculatum laterale	+++
Hypothalamus	+++
Nucleus paraventricularis	+++
Nucleus supraopticus	+++
Hypophysenstiel	+++
Epiphyse	+++
Zerebellum	
Purkinje-Zellen	+/++
Körnerzellen und Golgi-Zellen	++
Tiefe zerebelläre Nuclei	++
Hirnstamm	
Mesenzephalon	++
Ventrales Tegmentum	++
Pons und Medulla oblongata	
Nuclei trigeminus und vestibularis	++
Nuclei olivares	++
Plexus choroideus	+++
Epithelien	+++

Dargestellt ist die mittlere Signalintensität der Immunfärbung des hCAT1-Proteins in den verschiedenen Regionen des menschlichen Gehirns. + = Schwache Expression, ++ = Moderate Expression, +++ = Starke Expression.

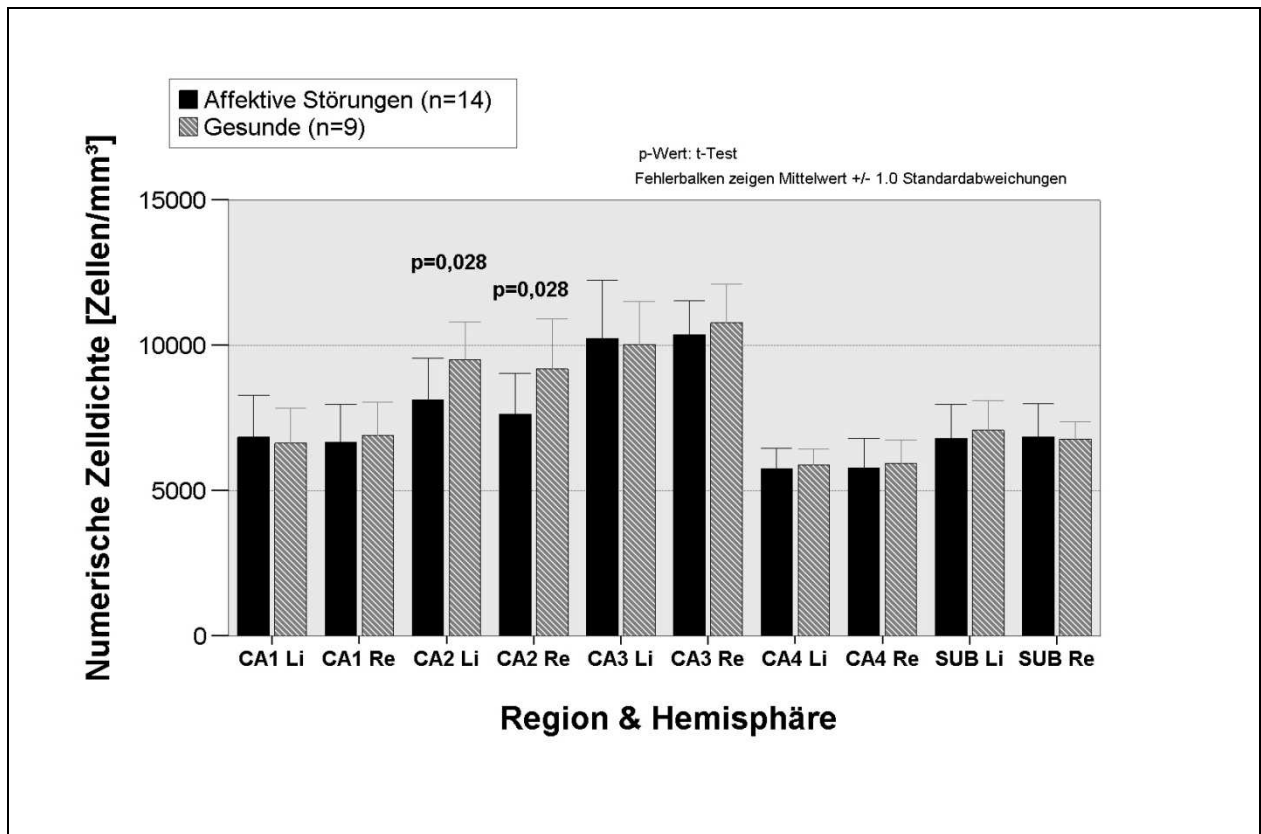
### 3.2 Numerische Zelldichten

Zunächst erfolgte die Betrachtung der Zelldichte hCAT1-exprimierender Neurone im Hippocampus zwischen den depressiv erkrankten Personen (einschließlich beider Untergruppen) und den psychiatrisch gesunden Personen. Hierbei zeigte sich mittels t-Test eine signifikante Verminderung der Zelldichte in der Region CA2 in beiden Hemisphären ( $p = 0,028$ ) (siehe Tabelle 3 und Abb. 11). Hinsichtlich der restlichen untersuchten Regionen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, auch eine einheitliche Tendenz der numerischen Zelldichten hCAT1-immunreaktiver Neurone war nicht zu verzeichnen (siehe Tabelle 3 und Abb. 11).

**Tabelle 3: Deskriptive Statistik und Differenzstatistik der Zelldichten (Affektive Störungen versus Gesunde).**

Region	Hemisphäre	Deskriptive Statistik		Differenzstatistik		
		Affektive St.	Gesunde	rel. Differenz	t-Test	
		n=14 MW $\pm$ SD [Zellen/mm <sup>3</sup> ]	n=9 MW $\pm$ SD [Zellen/mm <sup>3</sup> ]		T-Wert	p-Wert
<b>CA1</b>						
	<i>links</i>	6841 $\pm$ 1423	6631 $\pm$ 1199	3,16%	0,366	0,718
	<i>rechts</i>	6673 $\pm$ 1278	6888 $\pm$ 1149	-3,13%	-0,410	0,686
<b>CA2</b>						
	<i>links</i>	8111 $\pm$ 1440	9513 $\pm$ 1300	-14,74%	-2,364	<b>0,028</b>
	<i>rechts</i>	7623 $\pm$ 1401	9179 $\pm$ 1738	-16,95%	-2,368	<b>0,028</b>
<b>CA3</b>						
	<i>links</i>	10239 $\pm$ 1986	10033 $\pm$ 1477	2,06%	0,267	0,792
	<i>rechts</i>	10360 $\pm$ 1176	10765 $\pm$ 1350	-3,76%	-0,760	0,456
<b>CA4</b>						
	<i>links</i>	5742 $\pm$ 709	5870 $\pm$ 558	-2,19%	-0,458	0,652
	<i>rechts</i>	5774 $\pm$ 1028	5928 $\pm$ 803	-2,60%	-0,380	0,708
<b>SUB</b>						
	<i>links</i>	6803 $\pm$ 1158	7070 $\pm$ 1017	-3,78%	-0,565	0,578
	<i>rechts</i>	6845 $\pm$ 1155	6760 $\pm$ 592	1,27%	0,205	0,840

Die deskriptive Statistik stellt die neuronalen Dichten der beiden Untersuchungsgruppen in der jeweiligen Region und Hemisphäre dar. Die Differenzstatistik gibt den Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsgruppen an, jeweils unter Angabe der relativen Differenz in Prozent und der Ergebnisse des t-Tests (T-Wert und p-Wert). Signifikante Veränderungen sind **fettgedruckt**; MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung.



**Abb. 11: Grafische Darstellung der Zelldichten (Affektive Störungen versus Gesunde).** Die Balken entsprechen der numerischen Zelldichte in der jeweiligen Region und Hemisphäre. Li = Links, Re = Rechts.

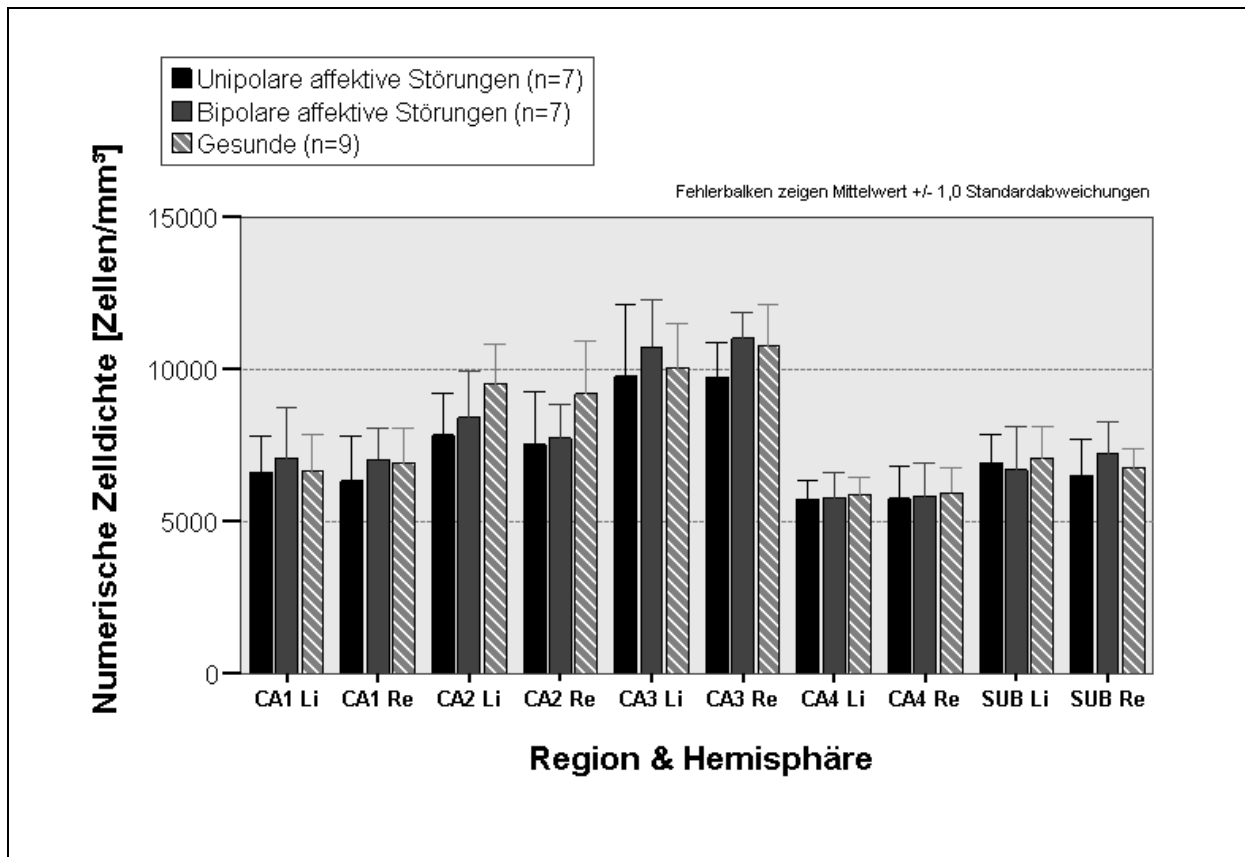
Anschließend wurde mit Hilfe einer ANOVA ein Vergleich der numerischen Zelldichte hCAT1-immunreaktiver Neurone zwischen allen drei Untersuchungsgruppen durchgeführt, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelldichten festgestellt werden konnte (siehe Tabelle 4 und Abb. 12). Auch die vorher erwähnte Signifikanz in der Region CA2 in beiden Hemisphären war nicht mehr nachweisbar. Allerdings bestand noch die Tendenz, dass Personen mit einer unipolaren oder bipolaren affektiven Störung eine verminderte Zelldichte in dieser Region aufwiesen (siehe Tabelle 4 und Abb. 12).

**Tabelle 4: Deskriptive Statistik und Differenzstatistik der Zelldichten (Unipolar versus Bipolar versus Gesunde).**

Region	Hemisphäre	Deskriptive Statistik			Differenzstatistik	
		Unipolar n=7 MW ± SD	Bipolar n=7 MW ± SD	Gesunde n=9 MW ± SD	ANOVA F-Wert    p-Wert	
		[Zellen/mm <sup>3</sup> ]	[Zellen/mm <sup>3</sup> ]	[Zellen/mm <sup>3</sup> ]		
<b>CA1</b>						
	<i>links</i>	6615 ± 1196	7067 ± 1685	6631 ± 1199	0,257	0,776
	<i>rechts</i>	6317 ± 1477	7028 ± 1031	6888 ± 1149	0,676	0,520
<b>CA2</b>						
	<i>links</i>	7822 ± 1376	8399 ± 1550	9513 ± 1300	3,038	0,070
	<i>rechts</i>	7530 ± 1740	7716 ± 1098	9179 ± 1738	2,701	0,092
<b>CA3</b>						
	<i>links</i>	9752 ± 2378	10727 ± 1530	10033 ± 1477	0,544	0,589
	<i>rechts</i>	9716 ± 1144	11005 ± 849	10765 ± 1350	2,510	0,106
<b>CA4</b>						
	<i>links</i>	5712 ± 628	5772 ± 833	5870 ± 558	0,114	0,893
	<i>rechts</i>	5737 ± 1041	5811 ± 1097	5928 ± 803	0,079	0,924
<b>SUB</b>						
	<i>links</i>	6925 ± 945	6680 ± 1406	7070 ± 1017	0,236	0,792
	<i>rechts</i>	6494 ± 1198	7197 ± 1079	6760 ± 592	0,961	0,399

Die deskriptive Statistik stellt die neuronalen Dichten der drei Untersuchungsgruppen in der jeweiligen Region und Hemisphäre dar. Die Differenzstatistik gibt den Unterschied zwischen den drei Untersuchungsgruppen an, jeweils unter Angabe des F-Wertes und p-Wertes der Berechnungen mittels ANOVA.





**Abb. 12: Grafische Darstellung der Zelldichten (Bipolar versus Unipolar versus Gesunde).** Die Balken entsprechen der numerischen Zelldichte in der jeweiligen Region und Hemisphäre.

### 3.3 Einfluss der konfundierenden Variablen

Um den Einfluss der konfundierenden Variablen Alter, Autolysedauer, Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer und Medikation auf die Zelldichte hCAT1-exprimierender Neurone abzuschätzen, wurden für die einzelnen Merkmale die Korrelationskoeffizienten nach Pearson berechnet und die jeweilige Signifikanz dazu angegeben.

Hinsichtlich des Alters, der Autolysedauer und des Krankheitsbeginns zeigten sich keine signifikanten Ergebnisse. Allerdings fielen bezüglich der Krankheitsdauer signifikante Werte im Sinne einer positiven Korrelation in den Regionen CA3 rechts ( $r = 0,844$ ;  $p = 0,004$ ) und Subiculum rechts ( $r = 0,698$ ;  $p = 0,036$ ) auf. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 5 abgebildet.

**Tabelle 5: Korrelationen zwischen der numerischen Zelldichte und den konfundierenden Variablen Alter, Autolysedauer, Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer.**

		Alter [Jahre]	Autolysedauer [Stunden]	Krankheitsbeginn [Jahre]	Krankheitsdauer [Jahre]
CA1 Li	Korrelation nach Pearson	,075	-,187	,086	,018
	Signifikanz (2-seitig)	,733	,393	,826	,963
	N	23	23	9	9
CA1 Re	Korrelation nach Pearson	,229	,218	-,245	,379
	Signifikanz (2-seitig)	,294	,317	,526	,314
	N	23	23	9	9
CA2 Li	Korrelation nach Pearson	,366	-,102	,309	,305
	Signifikanz (2-seitig)	,086	,643	,418	,424
	N	23	23	9	9
CA2 Re	Korrelation nach Pearson	,232	,175	-,004	,225
	Signifikanz (2-seitig)	,288	,425	,992	,560
	N	23	23	9	9
CA3 Li	Korrelation nach Pearson	,162	,044	-,074	,558
	Signifikanz (2-seitig)	,460	,840	,850	,118
	N	23	23	9	9
CA3 Re	Korrelation nach Pearson	,241	,265	-,234	,844**
	Signifikanz (2-seitig)	,267	,222	,545	,004
	N	23	23	9	9
CA4 Li	Korrelation nach Pearson	-,084	,296	-,022	,097
	Signifikanz (2-seitig)	,703	,170	,954	,804
	N	23	23	9	9
CA4 Re	Korrelation nach Pearson	-,015	,168	-,135	,314
	Signifikanz (2-seitig)	,946	,444	,730	,411
	N	23	23	9	9
SUB Li	Korrelation nach Pearson	,194	,097	,071	,249
	Signifikanz (2-seitig)	,376	,661	,855	,518
	N	23	23	9	9
SUB Re	Korrelation nach Pearson	,375	,293	-,196	,698*
	Signifikanz (2-seitig)	,078	,174	,614	,036
	N	23	23	9	9

\*\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Dargestellt sind für jede Region die Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit Angabe der jeweiligen Signifikanz und Stichprobengröße (=N).

Bei der Berechnung der Korrelationen für die Medikation, wurde die Einnahme von Antidepressiva und Neuroleptika in den letzten 90 Tagen vor dem Tod herangezogen. Hierbei fiel auf, dass die Dosis der antidepressiven Medikation positiv mit der Zelldichte korrelierte. Signifikante Werte wurden in den Regionen CA3 rechts ( $r = 0,770$ ;  $p = 0,015$ ), CA4 rechts ( $r = 0,833$ ,  $p = 0,005$ ), Subiculum links ( $r = 0,706$ ;  $p = 0,033$ ) und Subiculum rechts ( $r = 0,875$ ;  $p = 0,002$ ) festgestellt (siehe Tabelle 6). In der Region Subiculum rechts blieb die Signifikanz auch noch nach der Korrektur nach Bonferroni erhalten ( $p = 0,040$ ; siehe Abb. 13). Hinsichtlich der Einnahme von Neuroleptika wurden keine signifikanten Ergebnisse gefunden (siehe Tabelle 6).

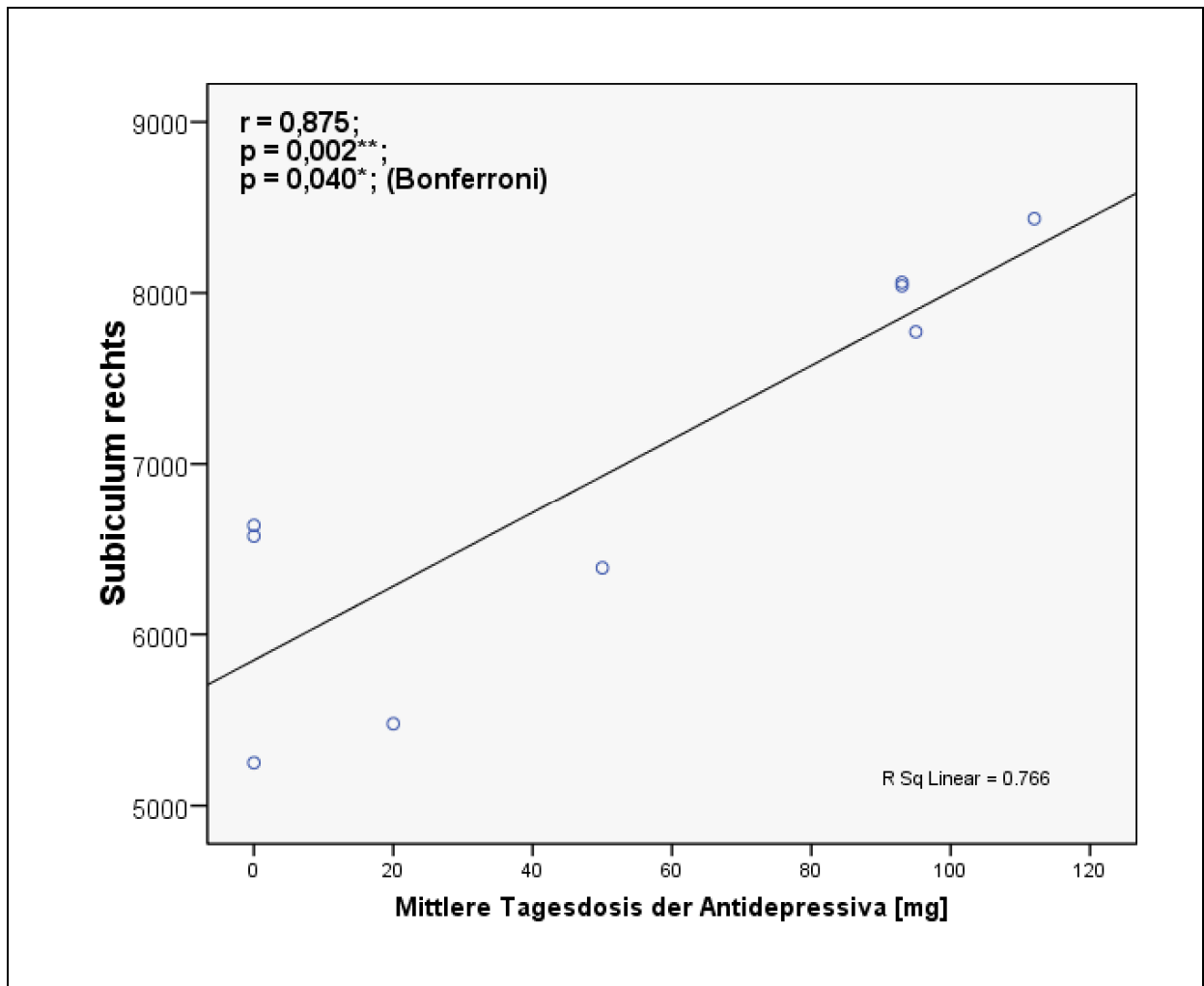
**Tabelle 6: Korrelationen zwischen der numerischen Zelldichte und der Medikation.**

		Mittlere Tagesdosis der Antidepressiva [mg]	Mittlere Tagesdosis der Neuroleptika [mg]
CA1 Li	Korrelation nach Pearson	,279	-,662
	Signifikanz (2-seitig)	,468	,052
	N	9	9
CA1 Re	Korrelation nach Pearson	,499	-,156
	Signifikanz (2-seitig)	,172	,688
	N	9	9
CA2 Li	Korrelation nach Pearson	,642	-,486
	Signifikanz (2-seitig)	,062	,185
	N	9	9
CA2 Re	Korrelation nach Pearson	,583	,080
	Signifikanz (2-seitig)	,100	,838
	N	9	9
CA3 Li	Korrelation nach Pearson	,606	-,069
	Signifikanz (2-seitig)	,084	,860
	N	9	9
CA3 Re	Korrelation nach Pearson	,770*	,257
	Signifikanz (2-seitig)	,015	,504
	N	9	9
CA4 Li	Korrelation nach Pearson	,455	-,421
	Signifikanz (2-seitig)	,219	,259
	N	9	9
CA4 Re	Korrelation nach Pearson	,833**	-,353
	Signifikanz (2-seitig)	,005	,352
	N	9	9
SUB Li	Korrelation nach Pearson	,706*	-,430
	Signifikanz (2-seitig)	,033	,247
	N	9	9
SUB Re	Korrelation nach Pearson	,875**	,110
	Signifikanz (2-seitig)	,002	,779
	N	9	9

\*. Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

\*\* . Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Dargestellt sind für jede Region die Korrelationskoeffizienten nach Pearson mit Angabe der jeweiligen Signifikanz und Stichprobengröße (=N).

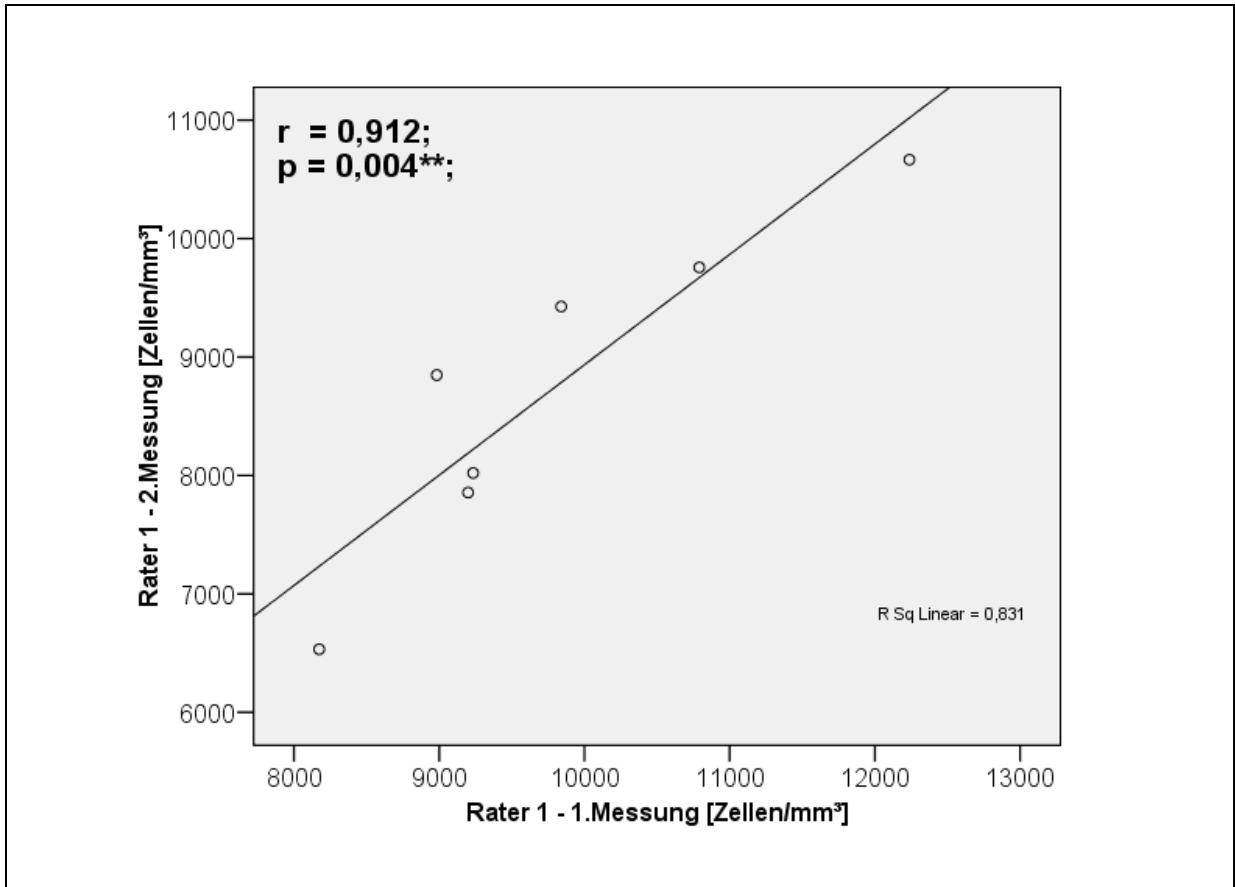


**Abb. 13: Grafische Darstellung der Korrelation zwischen der mittleren Tagesdosis der Antidepressiva und der Zelldichte hCAT1-immunreaktiver Neurone.** Dargestellt sind die Ergebnisse für die Region Subiculum rechts, die mittlere Tagesdosis der Antidepressiva bezieht sich auf die letzten 90 Tage vor dem Tod.

### 3.4 Validität

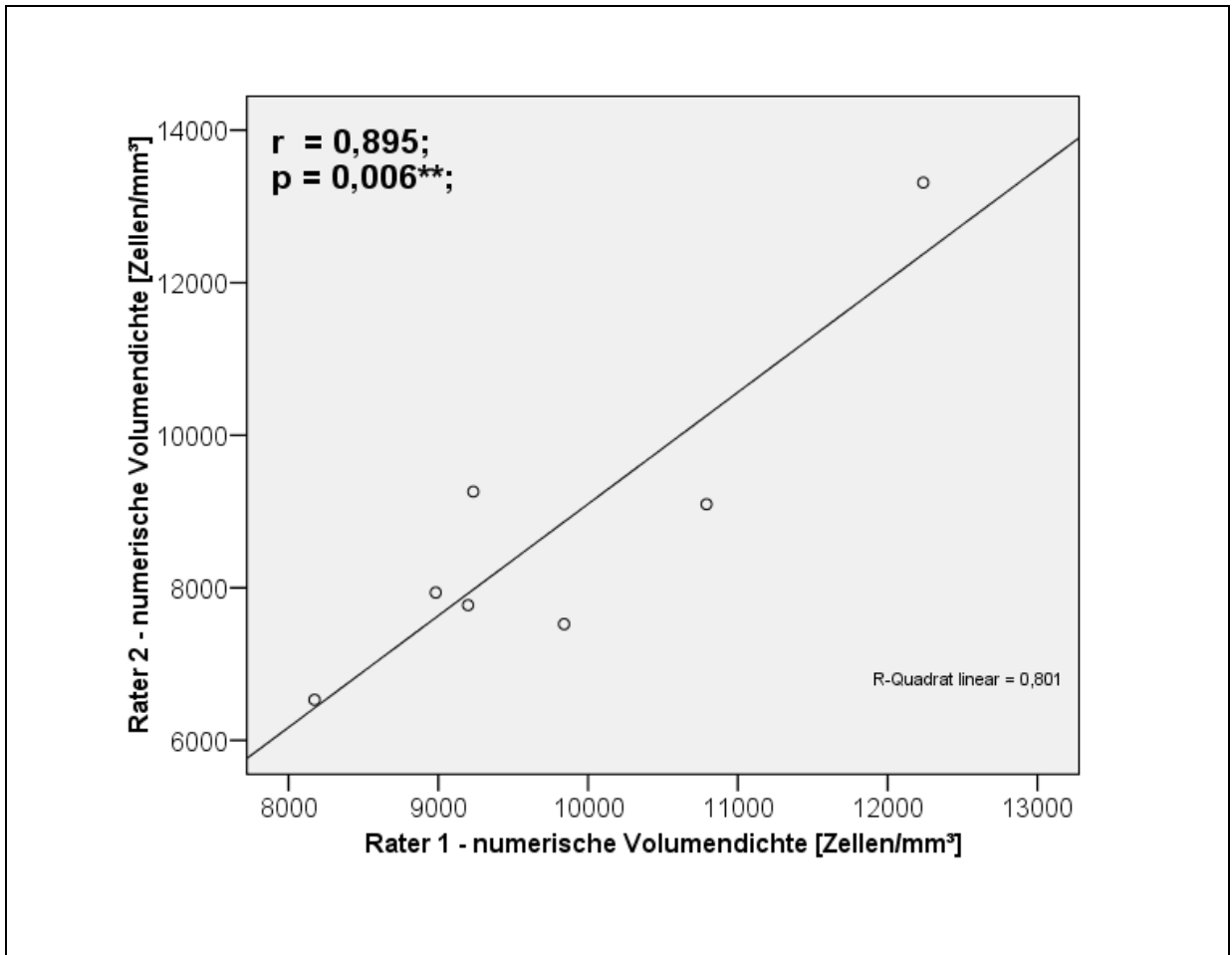
Um die Validität der Studie zu überprüfen, wurde sowohl die Intrarater-Reliabilität, als auch die Interrater-Reliabilität bestimmt. Hierzu wurde die Zellzählung in der Region CA2 links in sieben zufällig ausgewählten Gehirnen unter Berücksichtigung von jeweils fünf Zählfeldern durchgeführt. Zur Beurteilung der Zählergebnisse wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet und die jeweilige Signifikanz dazu angegeben.

Hinsichtlich der nochmaligen Zählung des gleichen Raters (entspricht der Intrarater-Reliabilität) ergab sich ein sehr guter Korrelationskoeffizient von 0,912 mit einer Signifikanz von 0,004 (siehe Abb. 14).



**Abb. 14: Grafische Darstellung der Intrarater-Reliabilität.** Dargestellt ist die Korrelation der Einzelmessungen bei wiederholter Zählung durch denselben Rater.

Auch bezüglich der unabhängigen Zählung des zweiten Raters (Interrater-Reliabilität) konnte eine sehr gute Korrelation der Zählergebnisse mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,895 und einer Signifikanz von 0,006 nachgewiesen werden (siehe Abb. 15).



**Abb. 15: Grafische Darstellung der Interrater-Reliabilität.** Dargestellt ist die Korrelation der Einzelmessungen zwischen zwei verschiedenen Ratern.

Die dargestellten sehr guten Korrelationen sowohl hinsichtlich der Intrarater-Reliabilität als auch der Interrater-Reliabilität bestätigen die hohe Validität der vorliegenden Ergebnisse und tragen zur Objektivierung der durchgeführten Zählungen bei.

## 4. Diskussion

### 4.1 Verteilung von hCAT1-Immunreaktivität im menschlichen Gehirn

Aufgrund der wichtigen Rolle von L-Arginin und anderen kationischen Aminosäuren für die Aufrechterhaltung normaler Gehirnfunktionen und ihrer zunehmenden Bedeutung bei verschiedenen Krankheiten des Gehirns, sind die hCATs erneut in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten gerückt. Die vorliegende Studie befasst sich erstmals mit dem detaillierten zellulären und regionalen Expressionsmuster von hCAT1 im menschlichen Gehirn. Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass das hCAT1-Protein im gesamten menschlichen Gehirn weit verbreitet ist, auch wenn die Expression in den verschiedenen Regionen des Gehirns unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Hinsichtlich des zellulären Verteilungsmusters wurde das hCAT1-Protein in vielen Neuronen, Astro- und Oligodendrogliazellen, Gefäßendothelzellen und Epithelzellen des Plexus choroideus nachgewiesen; diesbezüglich stimmen die Ergebnisse mit bisherigen Untersuchungen an Nagetieren überein (Stoll et al. 1993; Stevens & Vo 1998; Braissant et al. 1999). Das gefundene regionale Expressionsmuster des Proteins (hohe Dichte hCAT1-immunreaktiver Neurone und Gliazellen im Hypothalamus, Neocortex und Thalamus; geringe bis mittelstarke neuronale und gliäre Expression im Hippocampus, Hirnstamm und Kleinhirn) deckt sich weitgehend mit vorherigen Untersuchungen an menschlichen Gehirnen, die mit Hilfe eines cDNA Dot Blot Immunassays durchgeführt wurden (Vékony et al. 2001) und ähnelt dem Expressionsmuster von CAT1 in den besser untersuchten Ratten- bzw. Mausgehirnen, wobei es allerdings einige Unterschiede in der Stärke der Expression in den einzelnen Hirnregionen gab (Braissant et al. 1999). Diese Unterschiede könnten unter anderem dadurch bedingt sein, dass viele Studien die CAT1-Expression auf der Ebene der Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) untersucht haben und dies nicht zwangsläufig Schlussfolgerungen auf die Expression des Proteins zulässt (Luss et al. 1997). Eindeutige Ergebnisse hinsichtlich der Expression des Proteins können nur durch immunhistochemische Methoden gewonnen werden (Wiesinger 2001). Insgesamt zeigt das neuronale Verteilungsmuster von hCAT1 deutliche Parallelen zur Verteilung von am NO-Metabolismus beteiligten Enzymen, wie beispielsweise nNOS, aber auch von anderen Enzymen, die am Arginin-



Stoffwechsel beteiligt sind, wie z. B. Arginase I, Arginase II und Agmatinase (Bernstein et al. 2011a; Jäger et al. 2013). Auf die Bedeutung dieser Zellmarker im Zusammenhang mit hCAT1 wird im Kap. 4.2 näher eingegangen. Das weite Vorkommen von CAT1 bei Nagetieren und hCAT1 beim Menschen beschränkt sich allerdings nicht auf das Gehirn, sondern wurde auch für zahlreiche periphere Gewebe mit Ausnahme von Leber- und Tränendrüsenngewebe festgestellt (Ito & Groudine 1997; Vékony et al. 2001; Jäger et al. 2009). Das CAT1-Protein hat offenbar eine enorme Bedeutung für die normale Zellfunktion, was durch die Tatsache, dass Mäuse mit einer homozygoten Deletion des CAT1-Gens nicht lebensfähig sind, eindrücklich veranschaulicht wird (Perkins et al. 1997).

#### **4.2 Expression von hCAT1 in Neuronen des Hippocampus bei affektiven Erkrankungen**

Aufgrund der zentralen Rolle des Hippocampus bei den depressiven Erkrankungen (siehe Kap. 1.2) wurden Dichtebestimmungen der hCAT1-immunreaktiven Neurone in dieser Region des Gehirns durchgeführt. Es ist hervorzuheben, dass andere Hirnregionen, wie z. B. Hypothalamus, Thalamus, einige Cortexareale, Nucleus caudatus und Putamen, eine stärkere Intensität der Immunfärbung für das hCAT1-Protein zeigten und deshalb von einigem Interesse für künftige Studien sein dürften. Die vorliegende Arbeit beschränkt sich außerdem aus methodentechnischen Gründen auf die Expression von hCAT1 in Neuronen. Die teilweise sehr starke Expression des Proteins in Astrozyten unterstreicht die Bedeutung von hCAT1 für diese Zellen und sollte in nachfolgenden Studien näher untersucht werden. Allerdings sind die hCAT1-immunpositiven Astrozyten teilweise sehr dicht gelegen und deshalb sehr schwer voneinander abzugrenzen (siehe Abb. 8C), so dass in dieser Arbeit auf deren Zählung verzichtet wurde. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der hauptsächliche Arginintransport in Neuronen von Nagetieren durch das CAT1-Protein vermittelt wird und in aktivierten Astrozyten andere CAT-Isoformen eine wichtigere Rolle spielen (Stevens et al. 1996; Stevens & Vo 1998; Manner et al. 2003). Die vorliegende Studie beschäftigt sich erstmals mit der neuronalen Expression des hCAT1-Proteins im Gehirn im Zusammenhang mit depressiven Erkrankungen. Die Ergebnisse zeigen, dass es bei depressiven Patienten im Vergleich mit psychiatrisch

gesunden Personen in beiden Hemisphären in der Region CA2 zu einer signifikant verminderten neuronalen Expression von hCAT1 kommt. Bei Unterscheidung der depressiven Patienten in unipolare und bipolare affektive Störungen ist die Tendenz der verminderten Expression weiterhin ersichtlich, allerdings ist die Signifikanz aufgrund der geringen Fallzahl nicht mehr nachweisbar. Trotzdem lässt sich durch die Unterscheidung in diese beiden Untergruppen feststellen, dass es sowohl bei unipolaren als auch bei bipolaren affektiven Störungen tendenziell eher zu einer Absenkung hCAT1-exprimierender Neurone kommt und dieser Effekt nicht nur durch eine der beiden Untergruppen entsteht. Das Ergebnis der verminderten hCAT1-Expression ist auch im Einklang mit Untersuchungen am frontalen Kortex von Ratten, in denen eine Herabregulation des SLC7A1-Gens, welches für das CAT1-Protein codiert, durch chronischen milden Stress ausgelöst wurde (Orsetti et al. 2009). Hierbei gilt chronischer milder Stress als tierexperimentelles Modell der Depression (Willner 1997). Aufgrund der spärlichen Literatur über die Rolle von hCAT1 bei neuropsychiatrischen Erkrankungen ist es schwierig, die gefundenen Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext einzuordnen. Im Folgenden soll die Bedeutung von hCAT1 in verschiedenen Stoffwechselprozessen, mit besonderem Fokus auf den NO-Stoffwechsel, dargelegt werden.

#### **4.2.1 Zusammenhang von hCAT1-Expression und NO-Stoffwechsel**

Die Rolle des NO-Stoffwechsels hinsichtlich der Pathogenese von depressiven Erkrankungen hat in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und wurde zum Untersuchungsschwerpunkt zahlreicher Studien; zusammengefasst in (Dhir & Kulkarni 2011). Da die CATs die bedeutendsten Transporter für L-Arginin darstellen (White et al. 1982; Devés & Boyd 1998; Wu & Morris 1998) und L-Arginin das einzige physiologische Substrat der NO-Produktion ist (Wiesinger 2001), sind diese Transporter folglich für die Funktionalität und Regulierung des NO-Stoffwechsels von größter Bedeutung. Außerdem zeigen die vorliegenden Untersuchungen Überschneidungen des Expressionsmusters für hCAT1 und für die nNOS, welche in vorangehenden Studien bereits in folgenden Strukturen des menschlichen Gehirns nachgewiesen wurde: zerebraler Cortex, Hirnstamm (Egberongbe et al. 1994); Hypothalamus (Bernstein et al. 1998); Zerebellum (Egberongbe et al. 1994; Bernstein et al. 2001); Hippocampus (Egberongbe et al. 1994; Oliveira et al. 2008) und Locus coeruleus (Bielau et al. 2012). Allerdings lässt

sich die Rolle des Arginin-NO-Stoffwechselweges für die Pathogenese von depressiven Erkrankungen keinesfalls als eindeutig bezeichnen, da in der bisherigen Literatur widersprüchliche Ergebnisse publiziert wurden.

Einerseits gehen manche Autoren davon aus, dass der NO-Metabolismus und damit auch die Expression der nNOS bei depressiven Patienten erhöht ist (Oliveira et al. 2008). Dies ist konform mit Beobachtungen an Nagetieren, bei denen man antidepressive Effekte von NOS-Inhibitoren nachgewiesen hat; sowohl der NOS-Inhibitor N-Methyl-L-Arginin als auch der NOS-Inhibitor 7-Nitroindazol zeigten im durchgeführten erzwungenen Schwimmtest (FST) verminderte Immobilitätszeiten (Yildiz et al. 2000; Spiacci et al. 2008). Der FST gilt als weit verbreiteter tierexperimenteller Screening-Test für potentielle antidepressive Medikamente; dabei wird eine antidepressive Wirkung durch eine verminderte Immobilitätszeit von zum Schwimmen gezwungenen Ratten bzw. Mäusen deutlich (Porsolt et al. 1977; Pollak et al. 2010). Nicht nur die systemische Gabe der NOS-Inhibitoren hatte einen antidepressiven Effekt (Yildiz et al. 2000; Ferreira et al. 2012), sondern auch die direkte Injektion in bestimmte Hirnstrukturen, wie z. B. in den Hippocampus (Joca & Guimarães 2006). In diesem Zusammenhang und unter der Voraussetzung, dass der hCAT1 aufgrund seines fast ubiquitären Vorkommens der entscheidende Faktor hinsichtlich der Zufuhr von Arginin als einziges Substrat der NO-Synthese fungiert, ist es möglich anzunehmen, dass es einen negativen Feedbackmechanismus gibt. Dieser Mechanismus würde bei erhöhtem NO-Metabolismus greifen, um das hCAT1-Protein herunter zu regulieren und somit das Substrat Arginin vermindert der NO-Synthese zuzuführen. Allerdings konnte in einer Studie an Ratten nachgewiesen werden, dass sich durch die Applikation von Ketamin, dem eine antidepressive Wirkung zugeschrieben wird, zwar die Immobilitätszeit im FST, die iNOS-Aktivität, die eNOS-Aktivität und die Gesamtaktivität der NOS im Hippocampus vermindert, nicht aber die Aktivität der nNOS (Zhang et al. 2013). Hierbei wurde aber die nNOS-Aktivität nicht direkt bestimmt, sondern nur durch eine Subtraktion der eNOS- und der iNOS-Aktivität von der Gesamtaktivität der NOS berechnet, so dass die Ergebnisse verfälscht sein könnten.

Andererseits gibt es auch Hinweise darauf, dass der NO-Metabolismus bei depressiven Erkrankungen vermindert ist. Hinsichtlich der Expression der nNOS wurde im Nucleus suprachiasmaticus und im Nucleus paraventricularis des Hypothalamus eine Absenkung nachgewiesen (Bernstein et al. 1998; Bernstein et al.

2002). Außerdem konnte sowohl bei unipolar depressiv Erkrankten als auch bei bipolar depressiven Patienten im Locus coeruleus eine verminderte Expression der nNOS beobachtet werden (Karolewicz et al. 2004; Bielau et al. 2012). Des Weiteren wurde in mehreren Studien beschrieben, dass die NO-Konzentration im Plasma depressiv erkrankter Patienten im Gegensatz zu psychiatrisch gesunden Patienten vermindert ist (Chrapko et al. 2004; Selley 2004; Ikenouchi-Sugita et al. 2009). Nicht nur die verminderte Expression der nNOS in verschiedenen Strukturen des menschlichen Gehirns, sondern auch die verminderte NO-Konzentration im Plasma lassen eine generelle Verminderung der NO-Produktion im zentralen Nervensystem depressiver Patienten vermuten (García et al. 2011). In diesem Zusammenhang könnte das Ergebnis der vorliegenden Studie bedeuten, dass das verminderte Vorhandensein des hCAT1-Proteins bei depressiv Erkrankten dazu führt, dass weniger Arginin zur Verfügung steht und somit insgesamt auch nur weniger NO durch die nNOS synthetisiert werden kann.

Weiterhin wurde in mehreren tierexperimentellen Studien aufgezeigt, dass NO auf der einen Seite antidepressive, auf der anderen Seite aber auch depressive Effekte bewirken kann (Silva et al. 2000; Ergün & Ergün 2007). Paradoxerweise konnte mittels FST gezeigt werden, dass sowohl die Applikation von L-Arginin als auch die Gabe von NOS-Inhibitoren abhängig von der Dosis antidepressive und depressive Effekte erzeugt (Harkin et al. 1999; Silva et al. 2000; Ergün & Ergün 2007; Spiacci et al. 2008). Folglich kommt es bei der Betrachtung des Arginin-NO-Stoffwechsels im Zusammenhang mit der Pathogenese von depressiven Erkrankungen vor allem auf die Ausbalancierung des Systems an; ähnliche Erkenntnisse ergaben sich bereits hinsichtlich des NO-Stoffwechsels bei Patienten mit Schizophrenie (Bernstein et al. 2011b). Bei der Balancierung des NO-Stoffwechsels spielt hCAT1 offensichtlich aufgrund der Substratbereitstellung von Arginin für die NO-Synthese eine bedeutende Rolle. Die genauen Mechanismen dieses komplexen Gefüges müssen allerdings noch durch weitere Studien näher untersucht werden.

#### **4.2.2 Zusammenhang von hCAT1-Expression mit anderen Stoffwechselprozessen**

Die Aminosäure L-Arginin und der damit eng verknüpfte Transport der Aminosäure über das hCAT1-Protein spielen auch in weiteren Stoffwechselprozessen, wie der Synthese von Polyaminen, Harnstoff und Glutamat, eine zentrale Rolle (Übersicht

siehe Abb. 2). L-Arginin wird mittels der Isoenzyme Argininase I und II in L-Ornithin und Harnstoff umgewandelt, wobei danach aus L-Ornithin Polyamine bzw. Glutamat synthetisiert werden können; zusammengefasst in (Wu & Morris 1998). Wie bereits im Kap. 4.1 erwähnt, wurde in der vorliegenden Studie eine Überlappung des zerebralen Verteilungsmusters des hCAT1-Proteins mit dem der zytosolischen Arginase I und der mitochondrialen Arginase II gefunden (Braissant et al. 1999; Yu et al. 2001; Jäger et al. 2013), die unter anderem in vielen Neuronen des zerebralen Kortex, des Hippocampus, des Zerebellums und der Pons bei Nagetieren nachgewiesen werden konnten (Braissant et al. 1999; Yu et al. 2001; Peters et al. 2013). Die Arginase II wurde daneben auch in Gliazellen verschiedener Hirnstrukturen gefunden (Braissant et al. 1999), wohingegen die Arginase I bisher nur in einigen Gliazellen des Zerebellums nachgewiesen werden konnte (Peters et al. 2013). Hinsichtlich des Vorkommens beider Arginasen in Gliazellen wurden jedoch auch negative Ergebnisse erzielt (Yu et al. 2001). Nur wenige Studien haben sich bisher mit der Rolle der Arginasen im Zusammenhang mit depressiven Erkrankungen auseinandergesetzt. Immerhin gibt es Hinweise darauf, dass es sowohl bei bipolar depressiv erkrankten Patienten als auch bei unipolar depressiv Erkrankten zu einer Erhöhung der Arginase-Aktivität im Serum kommt (Szilagyi 1971; Elgün & Kumbasar 2000). In diesem Zusammenhang nehmen die Autoren an, dass sich Veränderungen der Arginase im zentralen Nervensystem durch Veränderungen der Arginase im Blut widerspiegeln, da gezeigt werden konnte, dass es bei depressiv erkrankten Personen zu einer Blut-Liquor-Schrankenstörung kommt (Hampel et al. 1997; Elgün & Kumbasar 2000). Dies wurde durch eine post mortem Studie an Gehirnen von Patienten, die im Rahmen einer uni- bzw. bipolaren affektiven Störung Suizid begangen haben, bekräftigt, da man eine erhöhte Expression des Arginase II-Gens im zerebralen Kortex nachweisen konnte (Fiori et al. 2011). Ein direkter Zusammenhang zwischen hCAT1 und den Arginasen in der Pathogenese der Depression konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Es ist aber vorstellbar, dass ein negativer Feedbackmechanismus existiert, der bei Erhöhung der Arginasen bzw. deren Stoffwechselprodukten (siehe Abb. 2) eine Verminderung des hCAT1-Proteins bewirkt, um die Zufuhr von Arginin zu reduzieren. Es wäre aber auch denkbar, dass es durch die Verminderung von hCAT1 im Rahmen der Depression zu einer vermehrten Arginase-Expression kommt, als Versuch die Zufuhr von Arginin zu erhöhen und dadurch die Homöostase hinsichtlich der nachfolgenden

Stoffwechselprozesse, wie z. B. dem Harnstoffzyklus oder der Synthese von Polyaminen, aufrecht zu erhalten.

In diesem Zusammenhang muss allerdings ins Kalkül gezogen werden, dass sich die Aktivität der Arginasen und der NO-Synthasen gegenseitig bedingen, da beide L-Arginin als Substrat verwenden und somit eine erhöhte Arginase-Aktivität zu einer verminderten NOS-Aktivität führen kann (Chang et al. 1998). In verschiedenen tierexperimentellen Studien an Makrophagen bzw. Astrozyten konnte nachgewiesen werden, dass die gesteigerte Aktivität der Arginase I bzw. II in einer verminderten NO-Synthese durch die iNOS resultiert (Hey et al. 1997; Gotoh & Mori 1999; Lee et al. 2003; Morris 2004; Colton 2009). Für die Interpretation der vorliegenden Studie von größerer Relevanz ist allerdings die Feststellung, dass auch die NO-Produktion mittels nNOS durch die erhöhte Aktivität der Arginase I herabgesetzt werden kann (Que et al. 2002). Diese reziproke Regulation konnte auch in einer Studie an Patienten mit bipolarer affektiver Störung bestätigt werden; allerdings fand man hierbei, im Gegensatz zu den bisherigen Ausführungen, erhöhte NO-Konzentrationen bei einem gleichzeitig erniedrigten Arginase-Niveau im Serum (Yanik et al. 2004). Eine reduzierte Arginase-Aktivität könnte wiederum durch eine verminderte Substratzufuhr von Arginin durch das bei depressiven Erkrankungen geminderte hCAT1-Protein bedingt sein. Hieraus lässt sich einerseits schlussfolgern, dass die Arginase- und die NOS-Aktivität nicht separat voneinander betrachtet werden dürfen, sondern sich gegenseitig bedingen. Andererseits scheint die Rolle der Arginasen hinsichtlich der Pathogenese der depressiven Erkrankungen noch nicht abschließend geklärt, so dass es letztlich auch bezüglich des hCAT1-Proteins auf eine Ausbalancierung des komplexen Systems ankommt, wie bereits im vorangegangenen Kap. 4.2.1 für den NO-Stoffwechsel erläutert wurde.

In einem anderen Stoffwechselprozess, der sowohl an Nagetiergehirnen, als auch an menschlichen Gehirnen nachgewiesen werden konnte, wird L-Arginin über die Arginin-Decarboxylase zu Agmatin verstoffwechselt (Li et al. 1995; Zhu et al. 2004) und dann über einen alternativen Stoffwechselweg mittels der Agmatinase zu Harnstoff und Putrescin, dem Vorläufermolekül der Polyamine, metabolisiert (Gilad et al. 1996; Iyer et al. 2002; Mistry et al. 2002). Wie bereits im Kap. 4.1 erwähnt, fiel in der vorliegenden Studie bei der qualitativen Untersuchung der Gehirnschnitte auch eine teilweise Übereinstimmung der Verteilung des hCAT1-Proteins mit der humanen Agmatinase im Gehirn auf (Bernstein et al. 2011a; Jäger et al. 2013). In einer post

mortem Studie konnte diesbezüglich bei depressiv erkrankten Personen eine signifikant erhöhte Expression der Agmatinase in Interneuronen des Hippocampus nachgewiesen werden (Bernstein et al. 2012b). Diese Ergebnisse wurden anhand von nachfolgenden Untersuchungen der gleichen Forschergruppe bestätigt und konnten auch für andere Hirnregionen, wie Habenula, insulärer und temporaler Kortex, festgestellt werden (Bernstein et al. 2014). Folglich würde eine vermehrte Aktivität der Agmatinase bei depressiven Personen zu einer vermehrten Metabolisierung und damit verminderten Verfügbarkeit von Agmatin im Gehirn führen. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen in Studien an Nagetieren, in denen nachgewiesen werden konnte, dass Agmatin neben vielen anderen Funktionen eine antidepressive Wirkung hat (Zomkowski et al. 2002; Aricioglu & Altunbas 2003; Li et al. 2003). Es wurde aber in der bereits erwähnten post mortem Studie an menschlichen Gehirnen herausgefunden, dass im Hippocampus die Lokalisation des hCAT1-Proteins (im Unterschied zu anderen Hirnregionen) nicht mit der Immunreaktivität der Agmatinase übereinstimmt (Bernstein et al. 2012b). Aus diesem Grund soll, trotz der offensichtlichen Bedeutung des hCAT1-Proteins zur Substratbereitstellung des L-Arginins für diesen Metabolisierungsprozess, in der vorliegenden Arbeit nicht näher darauf eingegangen werden.

Schließlich wurde der CAT1-Transporter in der Literatur mit dem wichtigen mTOR (mechanistisches Ziel des Rapamycins)-Stoffwechselweg in Verbindung gebracht (Huang et al. 2007). In dieser Studie an Rattenneuronen konnte zunächst nachgewiesen werden, dass eine Aktivierung des NMDA-Rezeptors mit einem reduzierten Arginintransport durch eine Verminderung der Oberflächenexpression von CAT1 einhergeht. Weiterhin kam es zu einer NMDA-induzierten Reduzierung von nachgeschalteten Angriffszielen der mTOR-Stoffwechsel-Kaskade, die unter Beteiligung des CAT1-Proteins ablief. Die Verwendung eines NMDA-Rezeptor-Antagonisten erzeugte jeweils gegenteilige Ergebnisse, d.h. es resultierte ein gesteigerter Arginintransport durch eine erhöhte Oberflächenexpression von CAT1 und eine Steigerung von nachgeschalteten Angriffszielen der mTOR-Stoffwechsel-Kaskade. Außerdem wurde durch eine Antagonisierung des NMDA-Rezeptors ein vermehrtes neuronales Wachstum in hippocampalen Kulturen induziert; auch dafür war die Anwesenheit des CAT1-Proteins notwendig und das neuronale Wachstum war folglich bei Suppression von CAT1 reduziert (Huang et al. 2007). Diese Ergebnisse sind von besonderer Bedeutung, wenn man bedenkt, dass die

Antagonisierung des NMDA-Rezeptors und der mTOR-Stoffwechselweg in der aktuellen Literatur bezüglich der Pathogenese der Depression immer mehr an Beachtung gewinnen. Wegbereitend hierfür war die Entdeckung, dass der NMDA-Rezeptor-Antagonist Ketamin nach intravenöser Applikation bei Patienten mit Depression (auch bei behandlungsresistenten Fällen) eine schnelle, langanhaltende und robuste antidepressive Wirkung entfaltet (Berman et al. 2000; Zarate et al. 2006). In aktuelleren Tierstudien konnte nachgewiesen werden, dass die antidepressiven Effekte von Ketamin über eine schnelle Aktivierung des mTOR-Stoffwechselweges vermittelt werden und zu einer erhöhten Synthese von Synapsen-assoziierten Proteinen (bis zu 72 Stunden) und konsekutiv auch zur vermehrten Bildung von Synapsen (nach 24 Stunden) im präfrontalen Kortex von Ratten führen (Li et al. 2010). Die gleiche Forschergruppe nutzte chronischen unberechenbaren Stress als tierexperimentelles Modell der Depression und demonstrierte, dass die dadurch induzierten negativen Effekte auf das Verhalten der Ratten und die Synapsenbildung bzw. -funktion im präfrontalen Kortex der Versuchstiere, durch die einmalige Applikation von Ketamin wieder aufgehoben werden können (Li et al. 2011). Hierbei konnten die durch Ketamin hervorgerufenen positiven Effekte auf die genannten Prozesse jeweils mittels des selektiven mTOR-Inhibitors Rapamycin blockiert werden, so dass auf diese Weise die Notwendigkeit der Beteiligung des mTOR-Stoffwechselweges verdeutlicht wurde (Li et al. 2011). Des Weiteren wurde in einer post mortem Studie an humanen Gehirnen bei depressiv erkrankten Personen eine Reduzierung mehrerer am mTOR-Stoffwechselweg beteiligter Komponenten im präfrontalen Kortex nachgewiesen, was insgesamt für eine Beteiligung des mTOR-Stoffwechselweges an der Pathogenese der Depression spricht (Jernigan et al. 2011). Im Hinblick auf den in der vorliegenden Studie untersuchten Hippocampus, konnten nach Applikation von Ketamin reduzierte Immobilitätszeiten von Ratten im FST und eine erhöhte Expression von mTOR im Hippocampus von Ratten nachgewiesen werden (Yang et al. 2013; Zhou et al. 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die bisherigen Ausführungen legen den Schluss nahe, dass es bei depressiv erkrankten Personen durch die Aktivierung des NMDA-Rezeptors zu einer Beeinträchtigung des mTOR-Stoffwechselweges kommt, die mit einer verminderten Oberflächenexpression von hCAT1 und einem dadurch reduzierten Arginintransport einhergeht. Umgekehrt könnte es durch eine Antagonisierung des NMDA-Rezeptors zu einer vermehrten Aktivierung des mTOR-



Stoffwechselweges und konsekutiv gesteigertem Arginintransport durch erhöhte Oberflächenexpression von hCAT1 kommen, was insgesamt in einer antidepressiven Wirkung resultiert. Bei dieser Interpretation ist allerdings zu beachten, dass die Mehrzahl der Untersuchungen an Nagetieren durchgeführt wurde und somit Ergebnisse nicht zwingend auf den Menschen übertragen werden können. Des Weiteren kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass eine Veränderung der Oberflächenexpression von hCAT1 und der Arginintransportaktivität auch in einer Änderung der Proteinexpression von hCAT1 resultiert. Außerdem finden sich in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Rolle des mTOR-Stoffwechselweges. In einer Studie an hippocampalen Neuronen von Nagetieren stellte man fest, dass die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren über den mTOR-Stoffwechselweg die Synthese von dendritischen Proteinen induziert und eine Antagonisierung bzw. Blockade der NMDA-Rezeptoren bzw. des mTOR-Stoffwechselweges zu einer verminderten Proteinsynthese in Dendriten führt (Gong et al. 2006), was im direkten Widerspruch zu den bisherigen Ausführungen steht. Weiterhin wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass chronischer Stress in mehreren Hirnregionen von Ratten (präfrontaler Kortex, Hippocampus, dorsaler Raphe-Kern) keine signifikanten Veränderungen in der Aktivität des mTOR-Stoffwechselweges nach sich zieht; lediglich in der Amygdala wurde eine reduzierte Aktivierung der mTOR-Stoffwechsel-Kaskade nachgewiesen (Chandran et al. 2013). Offenbar scheint die Stresswirkung auf das mTOR-System abhängig von der Dauer des Stresses und zudem noch von der Gehirnregion zu sein (Chandran et al. 2013). Insgesamt ist die Erforschung mittels weiterführender Studien notwendig, um die Rolle des mTOR-Stoffwechselweges und der hCATs bezüglich der Pathogenese der depressiven Erkrankungen genauer zu eruieren.

In der Literatur sind auch Verknüpfungen zwischen hCAT1 und der Proteinkinase C (PKC) beschrieben, dies wird im folgenden Kapitel ausführlicher erläutert.

#### **4.2.3 Einfluss der Medikation auf die hCAT1-Expression**

Zwischen der Einnahme von Neuroleptika und der Dichte hCAT1-immunreaktiver Neurone wurde in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation nachgewiesen (siehe Tabelle 6). Bei der Betrachtung der Medikation mit Antidepressiva fiel jedoch auf, dass die Dosis der antidepressiven Medikation in den Regionen CA3 rechts, CA4 rechts, Subiculum links und Subiculum rechts signifikant

positiv mit der Zelldichte korrelierte (siehe Tabelle 6 und Abb. 13). Das heißt, dass eine hohe Dosis antidepressiver Medikamente mit einer hohen neuronalen Dichte hCAT1-immunreaktiver Neurone einhergeht. Auch in den restlichen betrachteten Regionen konnte eine positive Korrelation beobachtet werden, die in diesen Fällen aber nicht signifikant war.

Eine direkte Beeinflussung von hCAT1 durch antidepressive oder neuroleptische Medikation ist in der Literatur bisher nicht beschrieben worden. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass antidepressive Medikamente, im Speziellen TCA, über die PKC mit dem hCAT1-Protein interagieren und somit die bereits genannte positive Korrelation zwischen der antidepressiven Medikation und der Zelldichte hCAT1-exprimierender Neurone erklären könnte. So konnte in Studien zur Wirkungsweise von antidepressiven Medikamenten nachgewiesen werden, dass TCA, wie Desipramin und Imipramin, die Aktivität der PKC steigern (Szmigielski & Górska 1997; Morishita & Aoki 2002). Dies wurde nicht nur in Thrombozyten von Kaninchen und Menschen nachgewiesen (Morishita & Aoki 2002), sondern auch im frontalen Kortex und Hippocampus von Ratten (Szmigielski & Górska 1997). Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass auch Antidepressiva der Gruppe der SSRI die Aktivität der PKC erhöhen (Giambalvo & Price 2003). Anhand von Untersuchungen an verschiedenen Zellpopulationen konnte zusätzlich belegt werden, dass die Aktivierung der PKC eine verminderte Transportaktivität von hCAT1 bewirkt, dies aber keinen Einfluss auf die Proteinsynthese von hCAT1 zur Folge hat (Rotmann et al. 2004; Krotova et al. 2003). Allerdings wurde in weiterführenden Studien herausgefunden, dass es zumindest in humanen Endothelzellen zu einer Erhöhung der mRNA von hCAT1 kommt (Rotmann et al. 2007; Gräf et al. 2001) und dies nach längerer Beobachtung über mehrere Stunden auch zu einer Steigerung der Expression des hCAT1-Proteins führt (Gräf et al. 2001). Die geschilderten Prozesse könnten als kompensatorischer Mechanismus für die Wiederherstellung des Arginintransports wirken und die PKC könnte hierbei einen direkten Einfluss auf die Expression des hCAT1-Proteins haben, indem sie diese auf der Ebene der Transkription bzw. der Translation beeinflusst (Gräf et al. 2001). Andere Autoren beschreiben sowohl in menschlichen Endothelzellen der Umbilikalvenen (Pan et al. 1995) als auch in menschlichen intestinalen Epithelzellen (Pan & Stevens 1995; Pan et al. 2002) eine PKC-assoziierte Erhöhung des Arginintransports mittels der hCATs. Dieser Effekt tritt aber erst nach mehreren Stunden ein, so dass von einer

vermehrten Expression des Proteins ausgegangen wird (Pan et al. 1995). Dafür spricht auch, dass es durch die Aktivierung der PKC zu einer Erhöhung der mRNA von hCAT1 kommt (Pan et al. 2002). Die aufgezeigten Mechanismen könnten eine Erklärung dafür sein, dass die Dosis der antidepressiven Medikation positiv mit der Zelldichte hCAT1-immunreaktiver Neurone korreliert.

#### **4.2.4 Einfluss anderer Erkrankungen auf das hCAT1-Protein**

Weiterhin muss der in der Literatur beschriebene Einfluss von anderen Erkrankungen auf den Arginintransport mitberücksichtigt werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Transport von Arginin beim Krankheitsbild der hepatischen Enzephalopathie eine Rolle spielt. In Astrozyten von Ratten wurde der Einfluss von Ammoniak und Mangan, die mit der Pathogenese der hepatischen Enzephalopathie eng verknüpft sind, untersucht. Hierbei wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem jeweiligen Substrat eine Erhöhung des Arginintransports zur Folge hat (Hazell & Norenberg 1998). Weitere Studien an Synaptosomen aus verschiedenen Hirnregionen von Ratten (Zerebellum, zerebraler Kortex, Hippocampus und Striatum) belegen nicht nur eine Steigerung des Transports von Arginin in den genannten Hirnregionen bei Hyperammonämie, sondern auch bei erfolgter portosystemischer Shunt-Anlage, was einem Modell von chronischer hepatischer Enzephalopathie entspricht (Rao et al. 1997). Allerdings konnte im zerebralen Cortex von Ratten keine Veränderung der mRNA von CAT1 bei Hyperammonämie nachgewiesen werden (Zielińska et al. 2011).

Außerdem gibt es Hinweise in der Literatur, dass sowohl Herz-Kreislauf-Erkrankungen als auch Erkrankungen der Niere Auswirkungen auf den Arginintransport haben können. Einerseits wird ein erhöhter Arginintransport mittels der hCATs in menschlichen Erythrozyten und mononukleären Zellen bei chronischer Herz- bzw. Niereninsuffizienz beschrieben, hierbei wurde die Expression des Proteins jedoch nicht untersucht (Mendes Ribeiro et al. 1997; Hanssen et al. 1998; Mendes Ribeiro et al. 2001). Diesbezüglich konnte in einer anderen Studie an Ratten mit Herzinsuffizienz, bei denen ein erhöhter Transport von Arginin in aortalem Gewebe gefunden wurde, keine Veränderung der CAT1-Expression nachgewiesen werden (Stathopoulos et al. 2001). Andererseits wurde in verschiedenen Studien ein reduzierter Arginintransport in menschlichen Endothelzellen, mononukleären Zellen (Kaye et al. 2000) und Myokardzellen (Kaye et al. 2002) bei Patienten mit

chronischer Herzinsuffizienz beschrieben. Hierbei wurde auch eine Reduzierung der hCAT1-mRNA in mononukleären Zellen (Kaye et al. 2000) und Myokardzellen (Kaye et al. 2002) dargelegt. Allerdings korreliert die mRNA nicht zwangsläufig mit der Proteinexpression (Luss et al. 1997), wie bereits in Kap. 4.1 erläutert wurde. In einer aktuelleren Studie an Schafen und Mäusen mit Herzversagen wurde in aus dem Herzen entnommenen Mitochondrien nicht nur ein reduzierter Arginintransport festgestellt, sondern auch eine Verminderung der Proteinexpression des CAT1-Transporters (Williams et al. 2014). Auch bei essentieller Hypertonie konnte eine Reduktion des Arginintransports in menschlichen mononukleären Zellen nachgewiesen werden, dies blieb aber ohne Veränderungen der mRNA oder des Proteins für hCAT1 (Schlaich et al. 2004). Des Weiteren wurde belegt, dass Ratten mit chronischer Niereninsuffizienz einen verminderten Arginintransport bei gleichzeitig erhöhter CAT1-mRNA und erniedrigtem CAT1-Protein in Gewebe von Aorta und Glomerulus der Niere zeigen (Schwartz et al. 2006). Die Autoren erklären sich die Erhöhung der Transkription der CAT1-mRNA bzw. die Erhöhung der Stabilität der CAT1-mRNA als Kompensationsmechanismus für eine ineffektive Translation, die allerdings nicht ausreicht, um auch ein adäquates Level des CAT1-Proteins aufrechtzuerhalten. Die im Zusammenhang mit Herz-Kreislauf- und Nierenerkrankungen genannten Studien beziehen sich jedoch nicht spezifisch auf den Arginintransport im Gehirn, so dass nicht mit Sicherheit von einem Einfluss auf die Ergebnisse der vorliegenden Studie ausgegangen werden kann. In der Literatur gibt es aber durchaus Hinweise darauf, dass Patienten mit Herzinsuffizienz oder Herz-Kreislauf-Stillstand auch Veränderungen im Gehirn im Sinne einer Schädigung oder Atrophie zeigen und dies anhand von MRT-Bildern sowohl für den Hippocampus als auch für das gesamte Gehirn belegt wurde (Grubb et al. 2000; Woo et al. 2009; Pan et al. 2013). Außerdem beschreibt eine post mortem Studie bei durch Herz-Kreislauf-Versagen oder Herzinsuffizienz verstorbenen Personen eine Volumenreduktion der Mamillarkörper, hierbei blieben jedoch die totalen neuronalen Zellzahlen unverändert (Bernstein et al. 2012a). Des Weiteren wurde in einer tierexperimentellen Studie an herzinsuffizienten Ratten mit depressiven Symptomen anhand von MRT-Bildern und histologischen Untersuchungen eine Verminderung der grauen Substanz des Hippocampus und damit verbundener beeinträchtigter Neurogenese bei erhöhter Astrozytenzahl nachgewiesen (Suzuki et al. 2014).

## **4.3 Methodenkritische Aspekte**

### **4.3.1 Einfluss konfundierender Variablen**

Wie im Kap. 2.1 bereits dargestellt, konnten hinsichtlich der konfundierenden Variablen Geschlecht, Alter, Autolysedauer und Krankheitsbeginn keine signifikanten Unterschiede zwischen unipolar depressiven Patienten, bipolar depressiven Patienten und Personen der Kontrollgruppe beobachtet werden. Allerdings wurden bezüglich der Krankheitsdauer zwischen den unipolaren affektiven Störungen und den bipolaren affektiven Störungen signifikante Unterschiede festgestellt. Dies ist durch das Patientenkollektiv der Magdeburger Hirnsammlung bedingt und ließ sich daher nicht vermeiden.

#### **4.3.1.1 Geschlecht, Alter, Autolysedauer, Suizid**

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, zeigten sich bei den t-Tests signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zelldichte hCAT1-exprimierender Neurone in der Region CA2 (links:  $T = -2,364$ ;  $p = 0,028$ ; rechts:  $T = -2,368$ ;  $p = 0,028$ ). Um eine mögliche Beeinflussung durch das Geschlecht der Probanden auszuschließen, wurde nachfolgend eine multivariate Varianzanalyse mit der konfundierenden Variable Geschlecht durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das Geschlecht für die Regionen CA2 keinen signifikanten Effekt auf die Dichte hCAT1-immunpositiver Neurone hat (links:  $F = 0,726$ ;  $p = 0,405$ ; rechts:  $F = 0,027$ ;  $p = 0,871$ ). Selbst beim Einbeziehen der konfundierenden Variable Geschlecht bleiben die Unterschiede zwischen der Gruppe der Patienten mit affektiven Störungen und der gesunden Vergleichspersonen in der Region CA2 signifikant (links:  $F = 4,912$ ;  $p = 0,039$ ; rechts:  $F = 4,769$ ;  $p = 0,042$ ). Bezüglich des Alters und der Autolysedauer ließen sich keine signifikanten Pearson-Korrelationen zur neuronalen Dichte von hCAT1 nachweisen (siehe Tabelle 5). Mehrere Patienten der Untersuchungsgruppen sind durch Suizid ums Leben gekommen, aber ein signifikanter Effekt auf die Dichte hCAT1-immunreaktiver Neurone konnte mittels ANOVA ausgeschlossen werden.

#### 4.3.1.2 Krankheitsbeginn, Krankheitsdauer, Medikation

Zwischen dem Erkrankungsbeginn und der numerischen Dichte von hCAT1-exprimierenden Neuronen im Hippocampus konnte keine signifikante Korrelation festgestellt werden. Dieses und die folgenden Ergebnisse wurden bereits im Kap. 3.3 erläutert und sind Tabelle 5 zu entnehmen. Hinsichtlich der Krankheitsdauer fiel eine signifikante positive Korrelation in den Regionen CA3 rechts und Subiculum rechts auf. Das bedeutet, dass eine lange Krankheitsdauer mit einer erhöhten Dichte hCAT1-immunpositiver Neurone einhergeht. Dieser Effekt ließ sich auch in den restlichen Regionen nachweisen, allerdings erreichten die Ergebnisse keine Signifikanz. Um diese Korrelation interpretieren zu können, muss vor allem die Medikation der Patienten und deren Einfluss auf die neuronale hCAT1-Expression mit berücksichtigt werden, was bereits ausführlich im Kap. 4.2.3 diskutiert wurde. Wenn nun angenommen wird, dass eine längere Krankheitsdauer auch mit einer insgesamt längerfristigen antidepressiven Medikation einhergeht, wäre es durchaus denkbar, dass die bereits dargestellten Prozesse die positive Korrelation zwischen der Krankheitsdauer und der Zelldichte hCAT1-exprimierender Neurone erklären könnten.

Beide dargelegten positiven Korrelationen mit der neuronalen Dichte von hCAT1 stehen nicht im Gegensatz zur eigentlich herausgefundenen Verminderung des hCAT1-Proteins bei depressiv erkrankten Patienten, sondern bekräftigen dies noch. Hierbei kann angenommen werden, dass die Verminderung der hCAT1-exprimierenden Neurone durch die Einnahme von antidepressiven Medikamenten zumindest teilweise kompensiert werden kann.

Allerdings waren die Aufzeichnungen in den Krankenakten der Patienten unvollständig, so dass nicht bei allen Patienten eine Aussage zur Medikation der letzten 90 Tage vor dem Tod getroffen werden konnte und außerdem eine genaue Spezifizierung der antidepressiven bzw. neuroleptischen Therapie nicht möglich war. Dies ist durchaus kritisch anzumerken, da die verschiedenen Medikamente möglicherweise unterschiedliche Auswirkungen auf das untersuchte hCAT1-Protein haben könnten.

### **4.3.1.3 Andere Erkrankungen**

Bereits im Kap. 4.2.4. wurde der Einfluss anderer Erkrankungen auf den Arginintransport ausführlich dargelegt. Beispielsweise könnten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, der Niere und eine vorliegende hepatische Enzephalopathie potentiell die Expression des hCAT1-Proteins beeinflussen. In der vorliegenden Studie litt laut Aufzeichnungen keiner der Patienten an einer hepatischen Enzephalopathie, bei nachfolgenden Betrachtungen im Rahmen anderer Studien sollte dies aber berücksichtigt werden. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde auch der mögliche Einfluss von Herz-Kreislauf- oder Nieren-Erkrankungen nicht berücksichtigt, was durchaus kritisch anzumerken ist und in weiterführenden Studien beachtet werden muss.

### **4.3.2 Untersuchungsgut**

In der vorliegenden Studie handelt es sich um Untersuchungen an einem kleinen Patientenkollektiv, was eine Verzerrung der beobachteten Ergebnisse wahrscheinlicher macht und ein Auftreten von signifikanten Unterschieden erschwert. Trotzdem wurden beim Vergleich zwischen depressiv erkrankten Patienten und psychiatrisch gesunden Personen signifikante Unterschiede hinsichtlich der neuronalen hCAT1-Expression im Hippocampus gefunden. Aufgrund der begrenzten Fallzahl konnte dies aber beim Betrachten der Untergruppen der depressiven Patienten nicht mehr nachgewiesen werden. Daher sollten die vorliegenden Ergebnisse in weiteren Studien an einem größeren Patientenkollektiv nochmals bestätigt werden.

### **4.3.3 Zellzählung**

Mit Hilfe der verwendeten Zählmethode und der daraufhin berechneten neuronalen Dichte (siehe Kap. 2.6) kann keinesfalls eine absolute Zellzahl hCAT1-exprimierender Neurone in der jeweiligen Hirnregion bestimmt werden. Hierzu wären volumetrische Angaben zu den Hippocampi der untersuchten Gehirne notwendig gewesen, die aber in der vorliegenden Studie nicht erhoben wurden. Hierbei ist zu bedenken, dass eine nicht berücksichtigte Volumenänderung des Hippocampus per se eine Veränderung der neuronalen Dichte in Gehirnen von depressiven Patienten nach sich ziehen würde. Wie bereits ausführlicher in Kap. 1.2 besprochen, konnte

diesbezüglich nachgewiesen werden, dass Gehirne von unipolar und bipolar depressiv erkrankten Patienten eine beidseitige Volumenminderung des Hippocampus aufweisen (Campbell et al. 2004; Videbech & Ravnkilde 2004; Otten & Meeter 2015). Dies konnte anhand histopathologischer Studien bestätigt werden (Bielau et al. 2005; Bernstein et al. 2012b), wurde aber insgesamt eher nicht auf einen massiven Verlust von Neuronen oder Unterdrückung der Neurogenese zurückgeführt, sondern auf Veränderungen hinsichtlich somatodendritischer, axonaler und synaptischer Komponenten und auch auf Veränderungen bezüglich der Gliazellen (Czéh & Lucassen 2007). Aufgrund dessen bleibt anzunehmen, dass sich durch die beschriebenen Prozesse die neuronale Dichte bei Patienten mit depressiven Erkrankungen noch erhöhen würde (Stockmeier et al. 2004). Hierdurch wird das Ergebnis der vorliegenden Studie noch bekräftigt, da es bei depressiv erkrankten Patienten trotz einer angenommenen allgemeinen Erhöhung der neuronalen Dichte zu einer Verminderung der hCAT1-exprimierenden Neurone gekommen ist.

#### **4.3.4 Interpretation**

Letztlich ist das untersuchte hCAT1-Protein nur ein Parameter im komplexen Gefüge von zellulären Strukturen und Prozessen, dessen Regulationsmechanismen und Bedeutung hinsichtlich depressiver Erkrankungen bisher keinesfalls abschließend geklärt worden sind. Die vorliegende Studie gibt Hinweise darauf, dass der Arginintransport mittels hCAT1 bezüglich der Pathogenese von depressiven Erkrankungen eine Rolle spielt und daher in Zukunft durchaus einen Angriffspunkt neuer therapeutischer Interventionen darstellen könnte.



## 5. Zusammenfassung

Die Pathogenese der affektiven Störungen kann keinesfalls als abschließend geklärt betrachtet werden, auch wenn diesbezüglich zahlreiche Erklärungshypothesen existieren. In den letzten Jahren wurden in verschiedenen Untersuchungen zunehmend Produkte des Argininstoffwechsels mit den depressiven Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Aufgrund der Funktion des hCAT1-Proteins zur Substratbereitstellung für diese Prozesse wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob bereits der Transport der Aminosäure mittels hCAT1 beeinträchtigt ist. Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten an post mortem Gehirnschnitten von 14 Patienten mit affektiven Störungen (sieben unipolar affektiv, sieben bipolar affektiv) und zum Vergleich neun psychiatrisch gesunden Personen. Um ein besseres Verständnis über die Rolle des hCAT1-Proteins zu erlangen, wurde zunächst die präzise neuroanatomische Lokalisation des Transporters im gesunden menschlichen Gehirn aufgedeckt. Im gesamten Gehirn zeigte sich hCAT1 mit unterschiedlicher Stärke der Expression weit verbreitet, was seine wichtige Bedeutung für physiologische und auch pathologische Prozesse im Gehirn des Menschen bekräftigt. Die vergleichende Bestimmung der neuronalen Dichte des hCAT1-Proteins wurde beidseits im Hippocampus durchgeführt. Diese Hirnregion wurde aufgrund der zentralen Bedeutung in der Pathogenese der Depression ausgesucht. Bei depressiven Patienten wurde eine signifikante Verminderung der numerischen Dichte hCAT1-exprimierender Neurone in der Region CA2 in beiden Hemisphären festgestellt, in allen anderen untersuchten Hirnregionen (CA1, CA3, CA4, Subiculum) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise fiel eine positive Korrelation der Krankheitsdauer mit der neuronalen Dichte von hCAT1 auf, was mit hoher Wahrscheinlichkeit als Medikationseffekt zu interpretieren ist. Die aufgeführten Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung des hCAT1-Proteins an der Pathogenese depressiver Erkrankungen und könnten zukünftig zur Erarbeitung neuer Therapiestrategien beitragen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Abbasi SH, Hosseini F, Modabbernia A, Ashrafi M, Akhondzadeh S (2012) Effect of celecoxib add-on treatment on symptoms and serum IL-6 concentrations in patients with major depressive disorder: randomized double-blind placebo-controlled study. *J Affect Disord* 141: 308–314.
2. Abkevich V, Camp NJ, Hensel CH, Neff CD, Russell DL, Hughes DC, Plenk AM, Lowry MR, Richards RL, Carter C, Frech GC, Stone S, Rowe K, Chau CA, Cortado K, Hunt A, Luce K, O'Neil G, Poarch J, Potter J, Poulsen GH, Saxton H, Bernat-Sestak M, Thompson V, Gutin A, Skolnick MH, Shattuck D, Cannon-Albright L (2003) Predisposition locus for major depression at chromosome 12q22-12q23.2. *Am J Hum Genet* 73: 1271–1281.
3. Albritton LM, Tseng L, Scadden D, Cunningham JM (1989) A putative murine ecotropic retrovirus receptor gene encodes a multiple membrane-spanning protein and confers susceptibility to virus infection. *Cell* 57: 659–666.
4. Anderson IM (2013) Pharmacological treatment of unipolar depression. *Curr Top Behav Neurosci* 14: 263–289.
5. Aricioglu F, Altunbas H (2003) Is agmatine an endogenous anxiolytic/antidepressant agent? *Ann N Y Acad Sci* 1009: 136–140.
6. Avery SN, Williams LE, Woolard AA, Heckers S (2014) Relational memory and hippocampal function in psychotic bipolar disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 264: 199–211.
7. Barnett JH, Smoller JW (2009) The genetics of bipolar disorder. *Neuroscience* 164: 331–343.
8. Bartsch T (2012) *The clinical neurobiology of the hippocampus. An integrative view: 1-9.* Oxford University Press, Oxford.
9. Baumann B, Danos P, Krell D, Diekmann S, Leschinger A, Stauch R, Wurthmann C, Bernstein HG, Bogerts B (1999) Reduced volume of limbic system-affiliated basal ganglia in mood disorders: preliminary data from a postmortem study. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 11: 71–78.
10. Bearden CE, Glahn DC, Monkul ES, Barrett J, Najt P, Villarreal V, Soares JC (2006) Patterns of memory impairment in bipolar disorder and unipolar major depression. *Psychiatry Res* 142: 139–150.
11. Bearden CE, Thompson PM, Dutton RA, Frey BN, Peluso MAM, Nicoletti M, Dierschke N, Hayashi KM, Klunder AD, Glahn DC, Brambilla P, Sassi RB, Mallinger AG, Soares JC (2008) Three-dimensional mapping of hippocampal anatomy in unmedicated and lithium-treated patients with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 33: 1229–1238.

12. Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS, Krystal JH (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* 47: 351–354.
13. Bernstein HG, Baumann B, Danos P, Diekmann S, Bogerts B, Gundelfinger ED, Braunewell KH (1999) Regional and cellular distribution of neural visinin-like protein immunoreactivities (VILIP-1 and VILIP-3) in human brain. *J Neurocytol* 28: 655–662.
14. Bernstein HG, Derst C, Stich C, Prüss H, Peters D, Krauss M, Bogerts B, Veh RW, Laube G (2011a) The agmatine-degrading enzyme agmatinase: a key to agmatine signaling in rat and human brain? *Amino Acids* 40: 453–465.
15. Bernstein HG, Heinemann A, Krell D, Mawrin C, Bielau H, Danos P, Diekmann S, Keilhoff G, Bogerts B, Baumann B (2002) Further immunohistochemical evidence for impaired NO signaling in the hypothalamus of depressed patients. *Ann N Y Acad Sci* 973: 91–93.
16. Bernstein HG, Jäger K, Fiebig J, Wolf S, Wick M, Dobrowolny H, Steiner J, Bogerts B, Laube G (2014) Agmatinase and human cationic amino acid transporter 1 in mood disorder: what's under the microscope? *JNBS* 1: 67–71.
17. Bernstein HG, Keilhoff G, Steiner J, Dobrowolny H, Bogerts B (2011b) Nitric oxide and schizophrenia: present knowledge and emerging concepts of therapy. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10: 792–807.
18. Bernstein HG, Klix M, Dobrowolny H, Brisch R, Steiner J, Bielau H, Gos T, Bogerts B (2012a) A postmortem assessment of mammillary body volume, neuronal number and densities, and fornix volume in subjects with mood disorders. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262: 637–646.
19. Bernstein HG, Krell D, Braunewell KH, Baumann B, Gundelfinger ED, Diekmann S, Danos P, Bogerts B (2001) Increased number of nitric oxide synthase immunoreactive Purkinje cells and dentate nucleus neurons in schizophrenia. *J Neurocytol* 30: 661–670.
20. Bernstein HG, Ortmann A, Dobrowolny H, Steiner J, Brisch R, Gos T, Bogerts B (2016) Bilaterally reduced claustral volumes in schizophrenia and major depressive disorder: a morphometric postmortem study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 266: 25–33.
21. Bernstein HG, Stanarius A, Baumann B, Henning H, Krell D, Danos P, Falkai P, Bogerts B (1998) Nitric oxide synthase-containing neurons in the human hypothalamus: reduced number of immunoreactive cells in the paraventricular nucleus of depressive patients and schizophrenics. *Neuroscience* 83: 867–875.

22. Bernstein HG, Stich C, Jäger K, Dobrowolny H, Wick M, Steiner J, Veh R, Bogerts B, Laube G (2012b) Agmatinase, an inactivator of the putative endogenous antidepressant agmatine, is strongly upregulated in hippocampal interneurons of subjects with mood disorders. *Neuropharmacology* 62: 237–246.
23. Bertelsen A, Harvald B, Hauge M (1977) A Danish twin study of manic-depressive disorders. *Br J Psychiatry* 130: 330–351.
24. Bielau H, Brisch R, Bernard-Mittelstaedt J, Dobrowolny H, Gos T, Baumann B, Mawrin C, Bernstein HG, Bogerts B, Steiner J (2012) Immunohistochemical evidence for impaired nitric oxide signaling of the locus coeruleus in bipolar disorder. *Brain Res* 1459: 91–99.
25. Bielau H, Trübner K, Krell D, Agelink MW, Bernstein HG, Stauch R, Mawrin C, Danos P, Gerhard L, Bogerts B, Baumann B (2005) Volume deficits of subcortical nuclei in mood disorders. A postmortem study. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255: 401–412.
26. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C (1999) L-arginine uptake, the citrulline–NO cycle and arginase II in the rat brain: an in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res* 70: 231–241.
27. Braissant O, Gotoh T, Loup M, Mori M, Bachmann C (2001) Differential expression of the cationic amino acid transporter 2(B) in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 91: 189–195.
28. Brakemeier EL, Normann C, Berger M (2008) Ätiopathogenese der unipolaren Depression. Neurobiologische und psychosoziale Faktoren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 51: 379–391.
29. Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC (2003) GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8: 721–737.
30. Brisch R, Bernstein HG, Stauch R, Dobrowolny H, Krell D, Truebner K, Meyer-Lotz G, Bielau H, Steiner J, Kropf S, Gos T, Danos P, Bogerts B (2008) The volumes of the fornix in schizophrenia and affective disorders: a post-mortem study. *Psychiatry Res* 164: 265–273.
31. Bunney WE Jr, Davis JM (1965) Norepinephrine in depressive reactions. A review. *Arch Gen Psychiatry* 13: 483–494.
32. Campbell S, MacQueen G (2004) The role of the hippocampus in the pathophysiology of major depression. *J Psychiatry Neurosci* 29: 417–426.
33. Campbell S, Marriott M, Nahmias C, MacQueen GM (2004) Lower hippocampal volume in patients suffering from depression: a meta-analysis. *Am J Psychiatry* 161: 598–607.

34. Carlezon WA Jr, Béguin C, Knoll AT, Cohen BM (2009) Kappa-opioid ligands in the study and treatment of mood disorders. *Pharmacol Ther* 123: 334–343.
35. Chaki S, Ago Y, Palucha-Paniewiera A, Matrisciano F, Pilc A (2013) mGlu2/3 and mGlu5 receptors: potential targets for novel antidepressants. *Neuropharmacology* 66: 40–52.
36. Chandran A, Iyo AH, Jernigan CS, Legutko B, Austin MC, Karolewicz B (2013) Reduced phosphorylation of the mTOR signaling pathway components in the amygdala of rats exposed to chronic stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 40: 240–245.
37. Chang CI, Liao JC, Kuo L (1998) Arginase modulates nitric oxide production in activated macrophages. *Am J Physiol* 274: H342-H348.
38. Chen G, Rajkowska G, Du F, Seraji-Bozorgzad N, Manji HK (2000) Enhancement of hippocampal neurogenesis by lithium. *J Neurochem* 75: 1729–1734.
39. Chepenik LG, Wang F, Spencer L, Spann M, Kalmar JH, Womer F, Edmiston E, Pittman B, Blumberg HP (2012) Structure-function associations in hippocampus in bipolar disorder. *Biol Psychol* 90: 18–22.
40. Chrapko WE, Jurasz P, Radomski MW, Lara N, Archer SL, Le Mellédo JM (2004) Decreased platelet nitric oxide synthase activity and plasma nitric oxide metabolites in major depressive disorder. *Biol Psychiatry* 56: 129–134.
41. Christensen HN (1964) A transport system serving for mono- and diamino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 337–344.
42. Christensen HN, Antonioli JA (1969) Cationic amino acid transport in the rabbit reticulocyte. Na<sup>+</sup>-dependent inhibition of Na<sup>+</sup>-independent transport. *J Biol Chem* 244: 1497–1504.
43. Cichon S, Craddock N, Daly M, Faraone SV, Gejman PV, Kelsoe J, Lehner T, Levinson DF, Moran A, Sklar P, Sullivan PF (2009) Genomewide association studies: history, rationale, and prospects for psychiatric disorders. *Am J Psychiatry* 166: 540–556.
44. Closs EI, Albritton LM, Kim JW, Cunningham JM (1993a) Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem* 268: 7538–7544.
45. Closs EI, Boissel JP, Habermeier A, Rotmann A (2006) Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *J Membrane Biol* 213: 67–77.
46. Closs EI, Gräf P, Habermeier A, Cunningham JM, Förstermann U (1997) Human cationic amino acid transporters hCAT-1, hCAT-2A, and hCAT-2B: three related carriers with distinct transport properties. *Biochemistry* 36: 6462–6468.

47. Closs EI, Lyons CR, Kelly C, Cunningham JM (1993b) Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 268: 20796–20800.
48. Closs EI, Simon A, Vékony N, Rotmann A (2004) Plasma membrane transporters for arginine. *J Nutr* 134: 2752–2759.
49. Colton CA (2009) Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 4: 399–418.
50. Craddock N, Jones I (1999) Genetics of bipolar disorder. *J Med Genet* 36: 585–594.
51. Craddock N, Sklar P (2013) Genetics of bipolar disorder. *Lancet* 381: 1654–1662.
52. Czéh B, Lucassen PJ (2007) What causes the hippocampal volume decrease in depression? Are neurogenesis, glial changes and apoptosis implicated? *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 257: 250–260.
53. Dale E, Bang-Andersen B, Sánchez C (2015) Emerging mechanisms and treatments for depression beyond SSRIs and SNRIs. *Biochem Pharmacol* 95: 81–97.
54. Deckersbach T, Savage CR, Reilly-Harrington N, Clark L, Sachs G, Rauch SL (2004) Episodic memory impairment in bipolar disorder and obsessive-compulsive disorder: the role of memory strategies. *Bipolar Disord* 6: 233–244.
55. Delgado PL (2000) Depression: the case for a monoamine deficiency. *J Clin Psychiatry* 61: 7–11.
56. Devés R, Boyd CAR (1998) Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function. *Physiol Rev* 78: 487–545.
57. DGBS, DGPPN (2012) S3-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie bipolarer Störungen. Langversion 1.0: 31-33.
58. DGPPN, BÄK, KBV, AWMF (2015) S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression. Langfassung, Version 5: 17-27. 2. Auflage.
59. Dhir A, Kulkarni SK (2011) Nitric oxide and major depression. *Nitric Oxide* 24: 125–131.
60. Dilling H, Mombour W, Schmidt MH, Schulte-Markwort E (2010) Internationale Klassifikation psychischer Störungen. ICD-10 Kapitel V (F), Klinisch-diagnostische Leitlinien: 140-163. 7., überarbeitete Auflage. Huber, Bern.

61. Drevets WC, Zarate CA Jr, Furey ML (2013) Antidepressant effects of the muscarinic cholinergic receptor antagonist scopolamine: a review. *Biol Psychiatry* 73: 1156–1163.
62. Duman RS, Heninger GR, Nestler EJ (1997) A molecular and cellular theory of depression. *Arch Gen Psychiatry* 54: 597–606.
63. Duman RS, Malberg J, Thome J (1999) Neural plasticity to stress and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 46: 1181–1191.
64. Duvernoy HM (2005) *The Human Hippocampus. Functional anatomy, vascularization and serial sections with MRI: 1-38.* 3rd edition. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
65. Egberongbe YI, Gentleman SM, Falkai P, Bogerts B, Polak JM, Roberts GW (1994) The distribution of nitric oxide synthase immunoreactivity in the human brain. *Neuroscience* 59: 561–578.
66. Ehrich E, Turncliff R, Du Y, Leigh-Pemberton R, Fernandez E, Jones R, Fava M (2015) Evaluation of opioid modulation in major depressive disorder. *Neuropsychopharmacology* 40: 1448–1455.
67. Eichenbaum H (2001) The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 127: 199–207.
68. Elgün S, Kumbasar H (2000) Increased serum arginase activity in depressed patients. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 24: 227–232.
69. Emrich HM, Vogt P, Herz A (1982) Possible antidepressive effects of opioids: action of buprenorphine. *Ann N Y Acad Sci* 398: 108–112.
70. Emrich HM, Zerssen D von, Kissling W, Möller HJ, Windorfer A (1980) Effect of sodium valproate on mania. The GABA-hypothesis of affective disorders. *Arch Psychiatr Nervenkr* 229: 1–16.
71. Ergün Y, Ergün UGÖ (2007) Prevention of pro-depressant effect of L-arginine in the forced swim test by NG-nitro-L-arginine and [1H-[1,2,4]Oxadiazole[4,3-a]quinoxalin-1-one]. *Eur J Pharmacol* 554: 150–154.
72. Fakhoury M (2015) New insights into the neurobiological mechanisms of major depressive disorders. *Gen Hosp Psychiatry* 37: 172–177.
73. Fava M (2003) Diagnosis and definition of treatment-resistant depression. *Biol Psychiatry* 53: 649–659.
74. Ferreira FR, Oliveira AM, Dinarte AR, Pinheiro DG, Greene LJ, Silva WA Jr, Joca SR, Guimarães FS (2012) Changes in hippocampal gene expression by 7-nitroindazole in rats submitted to forced swimming stress. *Genes Brain Behav* 11: 303–313.

75. Ferreira MAR, O'Donovan MC, Meng YA, Jones IR, Ruderfer DM, Jones L, Fan J, Kirov G, Perlis RH, Green EK, Smoller JW, Grozeva D, Stone J, Nikolov I, Chambert K, Hamshere ML, Nimgaonkar VL, Moskvina V, Thase ME, Caesar S, Sachs GS, Franklin J, Gordon-Smith K, Ardlie KG, Gabriel SB, Fraser C, Blumenstiel B, Defelice M, Breen G, Gill M, Morris DW, Elkin A, Muir WJ, McGhee KA, Williamson R, MacIntyre DJ, MacLean AW, St Clair D, Robinson M, Beck M van, Pereira ACP, Kandaswamy R, McQuillin A, Collier DA, Bass NJ, Young AH, Lawrence J, Ferrier IN, Anjorin A, Farmer A, Curtis D, Scolnick EM, McGuffin P, Daly MJ, Corvin AP, Holmans PA, Blackwood DH, Wellcome Trust Case Control Consortium, Gurling HM, Owen MJ, Purcell SM, Sklar P, Craddock N (2008) Collaborative genome-wide association analysis supports a role for ANK3 and CACNA1C in bipolar disorder. *Nat Genet* 40: 1056–1058.
76. Fiori LM, Bureau A, Labbe A, Croteau J, Noël S, Mérette C, Turecki G (2011) Global gene expression profiling of the polyamine system in suicide completers. *Int J Neuropsychopharmacol* 14: 595–605.
77. Fiori LM, Turecki G (2008) Implication of the polyamine system in mental disorders. *J Psychiatry Neurosci* 33: 102–110.
78. Flint J, Kendler KS (2014) The genetics of major depression. *Neuron* 81: 484–503.
79. Foland LC, Altshuler LL, Sugar CA, Lee AD, Leow AD, Townsend J, Narr KL, Asuncion DM, Toga AW, Thompson PM (2008) Increased volume of the amygdala and hippocampus in bipolar patients treated with lithium. *Neuroreport* 19: 221–224.
80. Fotiadis D, Kanai Y, Palacín M (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* 34: 139–158.
81. Frey BN, Andreatza AC, Nery FG, Martins MR, Quevedo J, Soares JC, Kapczinski F (2007) The role of hippocampus in the pathophysiology of bipolar disorder. *Behav Pharmacol* 18: 419–430.
82. Fullerton JM, Donald JA, Mitchell PB, Schofield PR (2010) Two-dimensional genome scan identifies multiple genetic interactions in bipolar affective disorder. *Biol Psychiatry* 67: 478–486.
83. Furey ML, Drevets WC (2006) Antidepressant efficacy of the antimuscarinic drug scopolamine: a randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arch Gen Psychiatry* 63: 1121–1129.
84. García RG, Zarruk JG, Barrera C, Pinzón A, Trillos E, Arenas WD, Luengas C, Tomaz C, López-Jaramillo P (2011) Plasma nitrate levels and flow-mediated vasodilation in untreated major depression. *Psychosom Med* 73: 344–349.
85. Giambalvo CT, Price LH (2003) Effects of fenfluramine and antidepressants on protein kinase C activity in rat cortical synaptoneurosome. *Synapse* 50: 212–222.



86. Gilad GM, Wollam Y, Iaina A, Rabey JM, Chernihovsky T, Gilad VH (1996) Metabolism of agmatine into urea but not into nitric oxide in rat brain. *Neuroreport* 7: 1730–1732.
87. Glowinski J, Axelrod J (1964) Inhibition of uptake of tritiated-noradrenaline in the intact rat brain by imipramine and structurally related compounds. *Nature* 204: 1318–1319.
88. Gong R, Park CS, Abbassi NR, Tang SJ (2006) Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem* 281: 18802–18815.
89. Gorp WG van, Altshuler L, Theberge DC, Mintz J (1999) Declarative and procedural memory in bipolar disorder. *Biol Psychiatry* 46: 525–531.
90. Gotoh T, Mori M (1999) Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 144: 427–434.
91. Grady MM, Stahl SM (2013) Novel agents in development for the treatment of depression. *CNS Spectr* 18: 37–40.
92. Gräf P, Förstermann U, Closs EI (2001) The transport activity of the human cationic amino acid transporter hCAT-1 is downregulated by activation of protein kinase C. *Br J Pharmacol* 132: 1193–1200.
93. Grubb NR, Fox KAA, Smith K, Best J, Blane A, Ebmeier KP, Glabus MF, O'Carroll RE (2000) Memory impairment in out-of-hospital cardiac arrest survivors is associated with global reduction in brain volume, not focal hippocampal injury. *Stroke* 31: 1509–1514.
94. Haack S, Pfennig A, Bauer M (2010) Bipolare Depression. *Epidemiologie, Ätiopathogenese und Verlauf. Nervenarzt* 81: 525–530.
95. Hampel H, Kötter HU, Möller HJ (1997) Blood-cerebrospinal fluid barrier dysfunction for high molecular weight proteins in Alzheimer disease and major depression: indication for disease subsets. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 11: 78–87.
96. Hanssen H, Brunini TMC, Conway M, Banning AP, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC, Mendes Ribeiro AC (1998) Increased L-arginine transport in human erythrocytes in chronic heart failure. *Clin Sci* 94: 43–48.
97. Harkin AJ, Bruce KH, Craft B, Paul IA (1999) Nitric oxide synthase inhibitors have antidepressant-like properties in mice. 1. Acute treatments are active in the forced swim test. *Eur J Pharmacol* 372: 207–213.

98. Harrison PJ (2004) The hippocampus in schizophrenia: a review of the neuropathological evidence and its pathophysiological implications. *Psychopharmacology* 174: 151–162.
99. Hazell AS, Norenberg MD (1998) Ammonia and manganese increase arginine uptake in cultured astrocytes. *Neurochem Res* 23: 869–873.
100. Hey C, Boucher JL, Vadon-Le Goff S, Ketterer G, Wessler I, Racké K (1997) Inhibition of arginase in rat and rabbit alveolar macrophages by N $\omega$ -hydroxy-D,L-inospicine, effects on L-arginine utilization by nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 121: 395–400.
101. Hill DLG, Schwarz AJ, Isaac M, Pani L, Vamvakas S, Hemmings R, Carrillo MC, Yu P, Sun J, Beckett L, Boccardi M, Brewer J, Brumfield M, Cantillon M, Cole PE, Fox N, Frisoni GB, Jack C, Kelleher T, Luo F, Novak G, Maguire P, Meibach R, Patterson P, Bain L, Sampaio C, Raunig D, Soares H, Suhy J, Wang H, Wolz R, Stephenson D (2014) Coalition Against Major Diseases/European Medicines Agency biomarker qualification of hippocampal volume for enrichment of clinical trials in predementia stages of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 10: 421–429.
102. Hillhouse TM, Porter JH (2015) A brief history of the development of antidepressant drugs: from monoamines to glutamate. *Exp Clin Psychopharmacol* 23: 1–21.
103. Hirschfeld RMA (2000) History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *J Clin Psychiatry* 61: 4–6.
104. Holsboer F (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology* 23: 477–501.
105. Huang Y, Kang BN, Tian J, Liu Y, Luo HR, Hester L, Snyder SH (2007) The cationic amino acid transporters CAT1 and CAT3 mediate NMDA receptor activation-dependent changes in elaboration of neuronal processes via the mammalian target of rapamycin mTOR pathway. *J Neurosci* 27: 449–458.
106. Ikenouchi-Sugita A, Yoshimura R, Hori H, Umene-Nakano W, Ueda N, Nakamura J (2009) Effects of antidepressants on plasma metabolites of nitric oxide in major depressive disorder: Comparison between milnacipran and paroxetine. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 33: 1451–1453.
107. Irwin MR, Miller AH (2007) Depressive disorders and immunity: 20 years of progress and discovery. *Brain Behav Immun* 21: 374–383.
108. Ito K, Groudine M (1997) A new member of the cationic amino acid transporter family is preferentially expressed in adult mouse brain. *J Biol Chem* 272: 26780–26786.
109. Iyer RK, Kim HK, Tsoa RW, Grody WW, Cederbaum SD (2002) Cloning and characterization of human agmatinase. *Mol Genet Metab* 75: 209–218.

110. Jäger K, Bönisch U, Risch M, Worlitzsch D, Paulsen F (2009) Detection and regulation of cationic amino acid transporters in healthy and diseased ocular surface. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 1112–1121.
111. Jäger K, Wolf S, Dobrowolny H, Steiner J, Nave H, Maronde E, Bogerts B, Bernstein HG (2013) Differential topochemistry of three cationic amino acid transporter proteins, hCAT1, hCAT2 and hCAT3, in the adult human brain. *Amino Acids* 44: 423–433.
112. Jahn H, Schick M, Kiefer F, Kellner M, Yassouridis A, Wiedemann K (2004) Metyrapone as additive treatment in major depression: a double-blind and placebo-controlled trial. *Arch Gen Psychiatry* 61: 1235–1244.
113. Janowsky DS, El-Yousef MK, Davis JM, Sekerke HJ (1972) A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *Lancet* 2: 632–635.
114. Jernigan CS, Goswami DB, Austin MC, Iyo AH, Chandran A, Stockmeier CA, Karolewicz B (2011) The mTOR signaling pathway in the prefrontal cortex is compromised in major depressive disorder. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 35: 1774–1779.
115. Joca SR, Guimarães FS (2006) Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in the rat hippocampus induces antidepressant-like effects. *Psychopharmacology* 185: 298–305.
116. Kanner AM (2004) Structural MRI changes of the brain in depression. *Clin EEG Neurosci* 35: 46–52.
117. Karolewicz B, Szebeni K, Stockmeier CA, Konick L, Overholser JC, Jurjus G, Roth BL, Ordway GA (2004) Low nNOS protein in the locus coeruleus in major depression. *J Neurochem* 91: 1057–1066.
118. Kaye DM, Ahlers BA, Autelitano DJ, Chin-Dusting JPF (2000) In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure. *Circulation* 102: 2707–2712.
119. Kaye DM, Parnell MM, Ahlers BA (2002) Reduced myocardial and systemic L-arginine uptake in heart failure. *Circ Res* 91: 1198–1203.
120. Kempton MJ, Salvador Z, Munafo MR, Geddes JR, Simmons A, Frangou S, Williams SCR (2011) Structural neuroimaging studies in major depressive disorder. Meta-analysis and comparison with bipolar disorder. *Arch Gen Psychiatry* 68: 675–690.
121. Kim JW, Closs EI, Albritton LM, Cunningham JM (1991) Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352: 725–728.

122. Koolschijn PCMP, Haren NEM van, Lensvelt-Mulders GJLM, Hulshoff Pol HE, Kahn RS (2009) Brain volume abnormalities in major depressive disorder: a meta-analysis of magnetic resonance imaging studies. *Hum Brain Mapp* 30: 3719–3735.
123. Krotova KY, Zharikov SI, Block ER (2003) Classical isoforms of PKC as regulators of CAT-1 transporter activity in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L1037-L1044.
124. Kuhn R (1958) The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *Am J Psychiatry* 115: 459–464.
125. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ, Morris SM Jr, Ratan RR (2003) Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4843–4848.
126. Li G, Regunathan S, Reis DJ (1995) Agmatine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 763: 325–329.
127. Li N, Lee B, Liu RJ, Banasr M, Dwyer JM, Iwata M, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2010) mTOR-dependent synapse formation underlies the rapid antidepressant effects of NMDA antagonists. *Science* 329: 959–964.
128. Li N, Liu RJ, Dwyer JM, Banasr M, Lee B, Son H, Li XY, Aghajanian G, Duman RS (2011) Glutamate N-methyl-D-aspartate receptor antagonists rapidly reverse behavioral and synaptic deficits caused by chronic stress exposure. *Biol Psychiatry* 69: 754–761.
129. Li YF, Gong ZH, Cao JB, Wang HL, Luo ZP, Li J (2003) Antidepressant-like effect of agmatine and its possible mechanism. *Eur J Pharmacol* 469: 81–88.
130. Lieb K, Frauenknecht S, Brunnhuber S, Wewetzer C (2012) *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie: 147-162. 7. Auflage.* Elsevier, Urban & Fischer, München.
131. Liu P, Fleete MS, Jing Y, Collie ND, Curtis MA, Waldvogel HJ, Faull RLM, Abraham WC, Zhang H (2014) Altered arginine metabolism in Alzheimer's disease brains. *Neurobiol Aging* 35: 1992–2003.
132. Lohoff FW (2010) Overview of the genetics of major depressive disorder. *Curr Psychiatry Rep* 12: 539–546.
133. Luss H, Li RK, Shapiro RA, Tzeng E, McGowan FX, Yoneyama T, Hatakeyama K, Geller DA, Mickle DAG, Simmons RL, Billiar TR (1997) Dedifferentiated human ventricular cardiac myocytes express inducible nitric oxide synthase mRNA but not protein in response to IL-1, TNF, IFN $\gamma$ , and LPS. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1153–1165.
134. Lutz PE, Kieffer BL (2013) Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* 36: 195–206.

135. Mai JK, Paxinos G, Voss T (2008) Atlas of the human brain: 45-72. 3rd edition. Elsevier, Academic Press, New York, London, Burlington, San Diego.
136. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104–9110.
137. Manner CK, Nicholson B, MacLeod CL (2003) CAT2 arginine transporter deficiency significantly reduces iNOS-mediated NO production in astrocytes. *J Neurochem* 85: 476–482.
138. McGuffin P, Katz R, Watkins S, Rutherford J (1996) A hospital-based twin register of the heritability of DSM-IV unipolar depression. *Arch Gen Psychiatry* 53: 129–136.
139. McGuffin P, Knight J, Breen G, Brewster S, Boyd PR, Craddock N, Gill M, Korszun A, Maier W, Middleton L, Mors O, Owen MJ, Perry J, Preisig M, Reich T, Rice J, Rietschel M, Jones L, Sham P, Farmer AE (2005) Whole genome linkage scan of recurrent depressive disorder from the depression network study. *Hum Mol Genet* 14: 3337–3345.
140. Mendes Ribeiro AC, Brunini TMC, Ellory JC, Mann GE (2001) Abnormalities in L-arginine transport and nitric oxide biosynthesis in chronic renal and heart failure. *Cardiovasc Res* 49: 697–712.
141. Mendes Ribeiro AC, Hanssen H, Kiessling K, Roberts NB, Mann GE, Ellory JC (1997) Transport of L-arginine and the nitric oxide inhibitor NG-monomethyl-L-arginine in human erythrocytes in chronic renal failure. *Clin Sci* 93: 57–64.
142. Mineur YS, Picciotto MR (2010) Nicotine receptors and depression: revisiting and revising the cholinergic hypothesis. *Trends Pharmacol Sci* 31: 580–586.
143. Mistry SK, Burwell TJ, Chambers RM, Rudolph-Owen L, Spaltmann F, Cook WJ, Morris SM Jr (2002) Cloning of human agmatinase. An alternate path for polyamine synthesis induced in liver by hepatitis B virus. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G375-G381.
144. Mombereau C, Kaupmann K, Froestl W, Sansig G, Putten H van der, Cryan JF (2004) Genetic and pharmacological evidence of a role for GABA(B) receptors in the modulation of anxiety- and antidepressant-like behavior. *Neuropsychopharmacology* 29: 1050–1062.
145. Morishita S, Aoki S (2002) Effects of tricyclic antidepressants on protein kinase C activity in rabbit and human platelets in vivo. *J Affect Disord* 70: 329–332.
146. Morris SM Jr (2004) Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* 134: 2743–2747.
147. Muller JC, Pryor WW, Gibbons JE, Orgain ES (1955) Depression and anxiety occurring during Rauwolfia therapy. *J Am Med Assoc* 159: 836–839.

148. Ng WXD, Lau IY, Graham S, Sim K (2009) Neurobiological evidence for thalamic, hippocampal and related glutamatergic abnormalities in bipolar disorder: a review and synthesis. *Neurosci Biobehav Rev* 33: 336–354.
149. Nowak G, Partyka A, Pałucha A, Szewczyk B, Wierońska JM, Dybała M, Metz M, Librowski T, Froestl W, Papp M, Pilc A (2006) Antidepressant-like activity of CGP 36742 and CGP 51176, selective GABAB receptor antagonists, in rodents. *Br J Pharmacol* 149: 581–590.
150. O'Leary OF, Dinan TG, Cryan JF (2015) Faster, better, stronger: towards new antidepressant therapeutic strategies. *Eur J Pharmacol* 753: 32–50.
151. Oliveira RMW, Guimarães FS, Deakin JFW (2008) Expression of neuronal nitric oxide synthase in the hippocampal formation in affective disorders. *Braz J Med Biol Res* 41: 333–341.
152. Öngür D, Drevets WC, Price JL (1998) Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13290–13295.
153. Orsetti M, Di Brisco F, Rinaldi M, Dallorto D, Ghi P (2009) Some molecular effectors of antidepressant action of quetiapine revealed by DNA microarray in the frontal cortex of anhedonic rats. *Pharmacogenet Genomics* 19: 600–612.
154. Otten M, Meeter M (2015) Hippocampal structure and function in individuals with bipolar disorder: a systematic review. *J Affect Disord* 174: 113–125.
155. Palaniyappan L, Cousins DA (2010) Brain networks: foundations and futures in bipolar disorder. *J Ment Health* 19: 157–167.
156. Pan A, Kumar R, Macey PM, Fonarow GC, Harper RM, Woo MA (2013) Visual assessment of brain magnetic resonance imaging detects injury to cognitive regulatory sites in patients with heart failure. *J Card Fail* 19: 94–100.
157. Pan M, Meng QH, Wolfgang CL, Lin CM, Karinch AM, Vary TC, Souba WW (2002) Activation of intestinal arginine transport by protein kinase C is mediated by mitogen-activated protein kinases. *J Gastrointest Surg* 6: 876–882.
158. Pan M, Stevens BR (1995) Protein kinase C-dependent regulation of L-arginine transport activity in Caco-2 intestinal cells. *Biochim Biophys Acta* 1239: 27–32.
159. Pan M, Wasa M, Lind DS, Gertler J, Abbott W, Souba WW (1995) TNF-stimulated arginine transport by human vascular endothelium requires activation of protein kinase C. *Ann Surg* 221: 590–600.
160. Perkins CP, Mar V, Shutter JR, Castillo J del, Danilenko DM, Medlock ES, Ponting IL, Graham M, Stark KL, Zuo Y, Cunningham JM, Bosselman RA (1997) Anemia and perinatal death result from loss of the murine ecotropic retrovirus receptor mCAT-1. *Genes Dev* 11: 914–925.

161. Peters D, Berger J, Langnaese K, Derst C, Madai VI, Krauss M, Fischer KD, Veh RW, Laube G (2013) Arginase and arginine decarboxylase - where do the putative gate keepers of polyamine synthesis reside in rat brain? PLoS One 8: e66735.
162. Philip NS, Carpenter LL, Tyrka AR, Price LH (2012) The nicotinic acetylcholine receptor as a target for antidepressant drug development. ScientificWorldJournal 2012: 104105.
163. Pilc A, Lloyd KG (1984) Chronic antidepressants and GABA "B" receptors: a GABA hypothesis of antidepressant drug action. Life Sci 35: 2149–2154.
164. Pollak DD, Rey CE, Monje FJ (2010) Rodent models in depression research: classical strategies and new directions. Ann Med 42: 252–264.
165. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. Arch Int Pharmacodyn Ther 229: 327–336.
166. Que LG, George SE, Gotoh T, Mori M, Huang YCT (2002) Effects of arginase isoforms on NO Production by nNOS. Nitric Oxide 6: 1–8.
167. Raison CL, Rutherford RE, Woolwine BJ, Shuo C, Schettler P, Drake DF, Haroon E, Miller AH (2013) A randomized controlled trial of the tumor necrosis factor antagonist infliximab for treatment-resistant depression: the role of baseline inflammatory biomarkers. JAMA Psychiatry 70: 31–41.
168. Rajkowska G (1997) Morphometric methods for studying the prefrontal cortex in suicide victims and psychiatric patients. Ann N Y Acad Sci 836: 253–268.
169. Ranft K, Dobrowolny H, Krell D, Bielau H, Bogerts B, Bernstein HG (2010) Evidence for structural abnormalities of the human habenular complex in affective disorders but not in schizophrenia. Psychol Med 40: 557–567.
170. Rao VLR, Audet RM, Butterworth RF (1997) Portacaval shunting and hyperammonemia stimulate the uptake of L-[3H]arginine but not of L-[3H]nitroarginine into rat brain synaptosomes. J Neurochem 68: 337–343.
171. Remmele W (1999) Rechtsfragen in der Pathologie. Einführung in die bioptische Diagnostik. Herz und Gefäßsystem, Hämatologie, Milz, Thymus. 2., neubearbeitete Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg.
172. Rotmann A, Simon A, Martiné U, Habermeier A, Closs EI (2007) Activation of classical protein kinase C decreases transport via systems y+ and y+L. Am J Physiol Cell Physiol 292: C2259-68.
173. Rotmann A, Strand D, Martiné U, Closs EI (2004) Protein kinase C activation promotes the internalization of the human cationic amino acid transporter hCAT-1. A new regulatory mechanism for hCAT-1 activity. J Biol Chem 279: 54185–54192.

174. Rush AJ, Trivedi MH, Wisniewski SR, Nierenberg AA, Stewart JW, Warden D, Niederehe G, Thase ME, Lavori PW, Lebowitz BD, McGrath PJ, Rosenbaum JF, Sackeim HA, Kupfer DJ, Luther J, Fava M (2006) Acute and longer-term outcomes in depressed outpatients requiring one or several treatment steps: a STAR\*D report. *The American journal of psychiatry* 163: 1905–1917.
175. Sanacora G, Treccani G, Popoli M (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders. *Neuropharmacology* 62: 63–77.
176. Schildkraut JJ (1965) The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 122: 509–522.
177. Schildkraut JJ, Kety SS (1967) Biogenic amines and emotion. *Science* 156: 21–30.
178. Schlaich MP, Parnell MM, Ahlers BA, Finch S, Marshall T, Zhang WZ, Kaye DM (2004) Impaired L-arginine transport and endothelial function in hypertensive and genetically predisposed normotensive subjects. *Circulation* 110: 3680–3686.
179. Schwartz IF, Ayalon R, Chernichovski T, Reshef R, Chernin G, Weinstein T, Litvak A, Levo Y, Schwartz D (2006) Arginine uptake is attenuated through modulation of cationic amino-acid transporter-1, in uremic rats. *Kidney Int* 69: 298–303.
180. Selley ML (2004) Increased (E)-4-hydroxy-2-nonenal and asymmetric dimethylarginine concentrations and decreased nitric oxide concentrations in the plasma of patients with major depression. *J Affect Disord* 80: 249–256.
181. Shore PA, Silver SL, Brodie BB (1955) Interaction of reserpine, serotonin, and lysergic acid diethylamide in brain. *Science* 122: 284–285.
182. Silva GDL da, Matteussi AS, Santos ARS dos, Calixto JB, Rodrigues ALS (2000) Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport* 11: 3699–3702.
183. Spiacci A Jr, Kanamaru F, Guimarães FS, Oliveira RMW (2008) Nitric oxide-mediated anxiolytic-like and antidepressant-like effects in animal models of anxiety and depression. *Pharmacol Biochem Behav* 88: 247–255.
184. Stathopoulos PB, Lu X, Shen J, Scott JA, Hammond JR, McCormack DG, Arnold JMO, Feng Q (2001) Increased L-arginine uptake and inducible nitric oxide synthase activity in aortas of rats with heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H859–H867.
185. Stevens BR, Kakuda DK, Yu K, Waters M, Vo CB, Raizada MK (1996) Induced nitric oxide synthesis is dependent on induced alternatively spliced CAT-2 encoding L-arginine transport in brain astrocytes. *J Biol Chem* 271: 24017–24022.



186. Stevens BR, Vo CB (1998) Membrane transport of neuronal nitric oxide synthase substrate L-arginine is constitutively expressed with CAT1 and 4F2hc, but not CAT2 or rBAT. *J Neurochem* 71: 564–570.
187. Stockmeier CA, Mahajan GJ, Konick LC, Overholser JC, Jurjus GJ, Meltzer HY, Uylings HBM, Friedman L, Rajkowska G (2004) Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression. *Biol Psychiatry* 56: 640–650.
188. Stoll J, Wadhvani KC, Smith QR (1993) Identification of the cationic amino acid transporter (System y<sup>+</sup>) of the rat blood-brain barrier. *J Neurochem* 60: 1956–1959.
189. Sullivan PF, Neale MC, Kendler KS (2000) Genetic epidemiology of major depression: review and meta-analysis. *Am J Psychiatry* 157: 1552–1562.
190. Suzuki H, Sumiyoshi A, Matsumoto Y, Duffy BA, Yoshikawa T, Lythgoe MF, Yanai K, Taki Y, Kawashima R, Shimokawa H (2014) Structural abnormality of the hippocampus associated with depressive symptoms in heart failure rats. *Neuroimage* 105: 84–92.
191. Szilagy K (1971) Serumarginaseaktivität bei phasischen Psychosen. *Arch Psychiatr Nervenkr* 214: 390–398.
192. Szmigielski A, Górska D (1997) The effect of prolonged imipramine treatment on the  $\alpha$ 1-adrenoceptor-induced translocation of protein kinase C in the central nervous system in rats. *Pharmacol Res* 35: 569–576.
193. Tatum WO 4th (2012) Mesial temporal lobe epilepsy. *J Clin Neurophysiol* 29: 356–365.
194. Trepel M (2012) Neuroanatomie. Struktur und Funktion: 214-219. 5. Auflage. Elsevier, Urban & Fischer, München.
195. Trullas R, Skolnick P (1990) Functional antagonists at the NMDA receptor complex exhibit antidepressant actions. *Eur J Pharmacol* 185: 1–10.
196. Uzbay TI (2012) The pharmacological importance of agmatine in the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 36: 502–519.
197. Vékony N, Wolf S, Boissel JP, Gnauert K, Closs EI (2001) Human cationic amino acid transporter hCAT-3 is preferentially expressed in peripheral tissues. *Biochemistry* 40: 12387–12394.
198. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacín M, Endou H, Kanai Y (2004) CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Arch* 447: 532–542.
199. Verteuil RL de, Lehmann HE (1958) Therapeutic trial of iproniazid (marsilid) in depressed and apathetic patients. *Can Med Assoc J* 78: 131–133.

200. Videbech P, Ravnkilde B (2004) Hippocampal volume and depression: a meta-analysis of MRI studies. *Am J Psychiatry* 161: 1957–1966.
201. Vural H, Sirin B, Yilmaz N, Eren I, Delibas N (2009) The role of arginine-nitric oxide pathway in patients with Alzheimer disease. *Biol Trace Elem Res* 129: 58–64.
202. Wang H, Kavanaugh MP, North RA, Kabat D (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352: 729–731.
203. White MF, Gazzola GC, Christensen HN (1982) Cationic amino acid transport into cultured animal cells. I. Influx into cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 257: 4443–4449.
204. Wiesinger H (2001) Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog Neurobiol* 64: 365–391.
205. Williams D, Venardos KM, Byrne M, Joshi M, Horlock D, Lam NT, Gregorevic P, McGee SL, Kaye DM (2014) Abnormal mitochondrial L-arginine transport contributes to the pathogenesis of heart failure and reoxygenation injury. *PLoS One* 9: e104643.
206. Willner P (1997) Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology* 134: 319–329.
207. Woo MA, Kumar R, Macey PM, Fonarow GC, Harper RM (2009) Brain injury in autonomic, emotional, and cognitive regulatory areas in patients with heart failure. *J Card Fail* 15: 214–223.
208. Wu G, Morris SM Jr (1998) Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 336: 1–17.
209. Yang C, Hu YM, Zhou ZQ, Zhang GF, Yang JJ (2013) Acute administration of ketamine in rats increases hippocampal BDNF and mTOR levels during forced swimming test. *Ups J Med Sci* 118: 3–8.
210. Yanik M, Vural H, Tutkun H, Zoroğlu SS, Savaş HA, Herken H, Koçyiğit A, Keleş H, Akyol Ö (2004) The role of the arginine-nitric oxide pathway in the pathogenesis of bipolar affective disorder. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254: 43–47.
211. Yildiz F, Erden BF, Ulak G, Utkan T, Gacar N (2000) Antidepressant-like effect of 7-nitroindazole in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology* 149: 41–44.

212. Young AH, Gallagher P, Watson S, Del-Estal D, Owen BM, Ferrier IN (2004) Improvements in neurocognitive function and mood following adjunctive treatment with mifepristone (RU-486) in bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 1538–1545.
213. Young LT (2002) Neuroprotective effects of antidepressant and mood stabilizing drugs. *J Psychiatry Neurosci* 27: 8–9.
214. Yu H, Iyer RK, Kern RM, Rodriguez WI, Grody WW, Cederbaum SD (2001) Expression of arginase isozymes in mouse brain. *J Neurosci Res* 66: 406–422.
215. Zakzanis KK, Leach L, Kaplan E (1998) On the nature and pattern of neurocognitive function in major depressive disorder. *Neuropsychiatry Neuropsychol Behav Neurol* 11: 111–119.
216. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, Brutsche NE, Ameli R, Luckenbaugh DA, Charney DS, Manji HK (2006) A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Arch Gen Psychiatry* 63: 856–864.
217. Zarate C Jr, Machado-Vieira R, Henter I, Ibrahim L, Diazgranados N, Salvatore G (2010) Glutamatergic modulators: the future of treating mood disorders? *Harv Rev Psychiatry* 18: 293–303.
218. Zhang GF, Wang N, Shi JY, Xu SX, Li XM, Ji MH, Zuo ZY, Zhou ZQ, Yang JJ (2013) Inhibition of the L-arginine-nitric oxide pathway mediates the antidepressant effects of ketamine in rats in the forced swimming test. *Pharmacol Biochem Behav* 110: 8–12.
219. Zhou W, Wang N, Yang C, Li XM, Zhou ZQ, Yang JJ (2014) Ketamine-induced antidepressant effects are associated with AMPA receptors-mediated upregulation of mTOR and BDNF in rat hippocampus and prefrontal cortex. *Eur Psychiatry* 29: 419–423.
220. Zhu MY, Iyo A, Piletz JE, Regunathan S (2004) Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim Biophys Acta* 1670: 156–164.
221. Zielińska M, Ruszkiewicz J, Hilgier W, Fręsko I, Albrecht J (2011) Hyperammonemia increases the expression and activity of the glutamine/arginine transporter y+ LAT2 in rat cerebral cortex: implications for the nitric oxide/cGMP pathway. *Neurochem Int* 58: 190–195.
222. Zomkowski ADE, Hammes L, Lin J, Calixto JB, Santos ARS, Rodrigues ALS (2002) Agmatine produces antidepressant-like effects in two models of depression in mice. *Neuroreport* 13: 387–391.

## 7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen

- 1 Mikroskopischer Frontalschnitt durch den Hippocampus (Trepel 2012)
- 2 Stoffwechselwege von Arginin (Liu et al. 2014)
- 3 Schematischer Aufbau von mCAT1 (Verrey et al. 2004)
- 4 Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) (Remmele 1999)
- 5 Mediane Darstellung der koronaren Schnittführung (Mai et al. 2008)
- 6 Koronarschnitt (Mai et al. 2008)
- 7 Schema des Hippocampus im Koronarschnitt (Duvernoy 2005)
- 8 MRT-Aufnahme des Hippocampus im Koronarschnitt (Duvernoy 2005)
- 9 Expression von hCAT1 im Telenzephalon
- 10 Expression von hCAT1 in Dienzephalon, Zerebellum, weißer Substanz und Plexus Choroideus
- 11 Grafische Darstellung der Zelldichten (Affektive Störungen versus Gesunde)
- 12 Grafische Darstellung der Zelldichten (Bipolar versus Unipolar versus Gesunde)
- 13 Grafische Darstellung der Korrelation zwischen der mittleren Tagesdosis der Antidepressiva und der Zelldichte hCAT1-immunreaktiver Neurone
- 14 Grafische Darstellung der Intrarater-Reliabilität
- 15 Grafische Darstellung der Interrater-Reliabilität

## **Tabellen**

- 1 Demografische Daten und Differenzstatistik der Untersuchungsgruppen
- 2 Expression von hCAT1 im menschlichen Gehirn
- 3 Deskriptive Statistik und Differenzstatistik der Zelldichten (Affektive Störungen versus Gesunde)
- 4 Deskriptive Statistik und Differenzstatistik der Zelldichten (Unipolar versus Bipolar versus Gesunde)
- 5 Korrelationen zwischen der numerischen Zelldichte und den konfundierenden Variablen Alter, Autolyse-dauer, Krankheitsbeginn und Krankheitsdauer
- 6 Korrelationen zwischen der numerischen Zelldichte und der Medikation

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Hans-Gert Bernstein für die Überlassung des Dissertationsthemas, die intensive und kontinuierliche Betreuung bei der Erarbeitung der Thematik und die wertvollen Ratschläge bei der Umsetzung der Doktorarbeit. Insbesondere bedanke ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen, das herausragende Engagement für die gemeinsame Arbeit, die konstruktive Kritik und die stetige Hilfestellung bei aufgetretenen Fragen.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei Herrn Dipl.-Ing. Henrik Dobrowolny für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Daten und der Gestaltung der Tabellen und Diagramme. Außerdem gilt mein Dank Frau Renate Stauch, Frau Bianca Jerzykiewicz, Frau Sieglinde Funke, Frau Kathrin Paelchen und dem gesamten Team im Labor für die Herstellung der histologischen Präparate und die gute Zusammenarbeit. Des Weiteren danke ich Frau Gabriela Meyer-Lotz für das Gegenzählen der Neurone zur Bestimmung der Interrater-Reliabilität.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Bogerts und Herrn Prof. Dr. Thomas Frodl, dem ehemaligen und aktuellen Leiter der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, für die Ermöglichung der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Ehemann und meiner Familie für die weitreichende Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

## **Ehrenerklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Immunhistochemische Untersuchung hCAT1-exprimierender Neurone im Hippocampus bei depressiven Patienten und Vergleichspersonen“**

in der Universitätsklinik für Psychiatrie und Psychotherapie mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. Hans-Gert Bernstein ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 11.04.2019

Susann Wolf

Der Lebenslauf ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.