# Untersuchungen von Motorik, Kognition und Verhalten bei Mausmodellen von Motoneuronerkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. nat.
an der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

**Kerstin E. Braunstein**

aus Ulm

2008

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler |
| Erstgutachter: | Prof. Dr. Günter Ehret |
| Zweitgutachter: | Prof. Dr. Harald Wolf |

| | |
|---|---|
| Abgabe der Doktorarbeit: | 02. Juni 2008 |
| Tag der Promotion: | 09. Juli 2008 |

*meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

**Verzeichnis der Abkürzungen ..... IV**

**1. Einleitung ..... 1**

1.1. Neurodegenerative Erkrankungen ..... 1
1.2. Motoneuronerkrankungen ..... 2
1.3. Amyotrophe Lateralsklerose ..... 4
1.4. Tauopathien ..... 7
1.5. Verhaltensanalysen ..... 8
1.6. Ziele dieser Arbeit ..... 10

**2. Material und Methoden ..... 12**

2.1. Verwendete Mäusestämme ..... 12
2.1.1. Der Mausstamm Cramping 1 (Cra1) ..... 12
2.1.2. Der Mausstamm SOD1-G93A (SOD1) ..... 12
2.1.3. Der Mausstamm P301L ..... 13
2.1.4. Weitere verwendete Mäusestämme ..... 13
2.2. Haltungsbedingungen ..... 13
2.3. Zuchtschemata ..... 14
2.3.1. Erhaltungszuchten ..... 14
2.3.1.1. Cra1 ..... 14
2.3.1.2. SOD1 ..... 14
2.3.1.3. P301L ..... 14
2.3.2. Zuchten für den Versuch ..... 15
2.3.2.1. Cra1/SOD1 Zucht ..... 15
2.3.2.2. Heterozygote P301L Zucht ..... 15
2.4. Genotypisierung der Versuchstiere ..... 15
2.4.1. DNA Isolierung ..... 15
2.4.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR) ..... 16
2.4.3. Quantitative *real-time* Rerverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ..... 16
2.4.4. Restriktionsspaltungen von DNA ..... 18
2.4.5. Gelelektrophorese ..... 18
2.5. Bestimmung der SOD1 Tiere ..... 19
2.6. Bestimmung der Cra1 Tiere ..... 21

2.7. Verhaltensuntersuchungen ..... 23
2.7.1. Modifizierter SHIRPA-Test ..... 24
2.7.2. Grip Strength Test ..... 25
2.7.3. String Agility ..... 26
2.7.4. Rotarod ..... 27
2.7.5. Open Field Test ..... 28
2.7.6. Y-Labyrinth ..... 29
2.7.7. Elevated Plus Labyrinth ..... 30
2.7.8. Morris Water Maze ..... 31
2.7.9. Video tracking und Datenanalyse ..... 33
2.8. Histologische Untersuchungen des Musculus rectus femoris ..... 34
2.8.1. Präparation des Musculus rectus femoris ..... 34
2.8.2. Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung der Muskelschnitte ..... 35
2.8.3. Gomori-Trichrom Färbung der Muskelschnitte ..... 35
2.8.4. Antikörper-Färbung der Muskelschnitte ..... 36
2.8.5. Befundung der Muskelschnitte ..... 37
2.8.6. Quantifizierung der Muskelfaserdurchmesser ..... 38

**3. Ergebnisse ..... 39**

3.1. Allgemeiner Gesundheitszustand ..... 39
3.2. Agilität und Muskelkraftmessung ..... 42
3.3. Motorische Koordination ..... 46
3.4. Motorische Aktivität ..... 47
3.5. Explorations- und Angstverhalten ..... 51
3.6. Lernverhalten ..... 57
3.7. Muskelhistologie ..... 69
3.7.1. Untersuchung der HE gefärbten Muskelschnitte des Musculus rectus femoris ..... 69
3.7.2. Untersuchung der Gomri-Trichrom gefärbten Muskelschnitte des Musculus rectus femoris ..... 72
3.7.3. Untersuchung des Musculus rectus femoris zur Unterscheidung der verschiedenen Muskelfasertypen ..... 73

**4. Diskussion ..... 76**

4.1. Allgemeine Bemerkungen zu den Versuchsmethoden und der Durchführung ..... 77
4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse ..... 79
4.3. Allgemeiner Gesundheitszustand ..... 80

4.4. Agilität und Muskelkraftmessung ..... 80
4.5. Motorische Koordination und Aktivität ..... 82
4.6. Explorations- und Angstverhalten ..... 84
4.7. Lernverhalten ..... 85
4.8. Muskelhistologie ..... 87
4.9. Schlussfolgerungen ..... 89

**5. Zusammenfassung ..... 92**

**6. Summary ..... 94**

**7. Literaturverzeichnis ..... 96**

**8. Anhang ..... 104**

8.1.Allgemeiner Gesundheitszustand ..... 104
8.1.1. Bewertungsschlüssel für den modifizierten SHIRPA-Test ..... 104
8.1.2. Allgemeiner Gesundheitszustand ..... 106
8.2. Agilität und Muskelkraftmessung ..... 106
8.3. Motorische Koordination ..... 107
8.4. Motorische Aktivität ..... 107
8.5. Explorationsverhalten und Angst ..... 108
8.6. Lernverhalten ..... 110
8.6.1. Y-Labyrinth ..... 110
8.6.2. Schwimmdauern im Morris Water Maze ..... 111
8.6.3. Schwimmstrecken im Morris Water Maze ..... 113
8.6.4. Durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit im Morris Water Maze ..... 115
8.7. Muskelfaserdurchmesser ..... 117
8.8. Anhangs-CD ..... 118

**Danksagung ..... 119**

**Erklärung ..... 120**

**Curriculum Vitae ..... 121**

**Veröffentlichungen ..... 122**

# Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|---|---|
| °C | Grad Celsius |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µmol | Mikromol |
| AD | Alzheimer's Disease (Morbus Alzheimer) |
| ALS | Amyotrophe Lateralsklersoe |
| ANOVA | analysis of variance (Varianzanalyse) |
| bp | Basenpaar |
| BSA | bovine serum albumine (Kälberserum) |
| CJD | Creuzfeldt-Jakob-Disease (Creuzfeldt-Jakob-Krankheit) |
| cm | Zentimeter |
| cm/s | Zentimeter pro Sekunde |
| Cra1 | Cramping legs Mausmodell |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| Dnchc1 | Dynein cytoplasmic heavy chain 1 |
| dNTP's | Desoxyribonukleotide |
| dsDNA | Doppelostrang-DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| fALS | familiäre ALS |
| FTD | frontotemporale Demenz |
| FTDP-17 | frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus |
| g | Gramm |

| | |
|---|---|
| HE | Hämatoxylin & Eosin |
| HD | Huntington's Disease (Chorea Huntington) |
| hSOD1 | humane Cu/Zn-Superoxid Dismutase 1 |
| K-W ANOVA | einfaktorielle Kruskal-Wallis ANOVA |
| Loa | Legs at odd angels Mausmodell |
| m | Meter |
| M | Mol |
| MAPT | Motorprotein-assoziiertes Protein Tau |
| mg | Milligramm |
| MHC | myosin heavy chain |
| mIL-2 | murines Interleukin-2 |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimol |
| MND | Motor neuron disease (Motoneuronerkrankung) |
| PCR | Polymerase Ketternreaktion |
| PD | Parkinson's Disease (Morbus Parkinson) |
| rpm | Rotationen pro Minute |
| RST | Mann-Whitney Rangsummentest |
| s | Sekunde |
| sALS | sporadische ALS |
| SMA | spinale Muskelatrophie |
| SOD1 | Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 |
| ssDNA | Einzelstrang-DNA |

| | |
|---|---|
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| V | Volt |
| WT | Wildtyp |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

# 1. Einleitung

## 1.1. Neurodegenerative Erkrankungen

Neurodegenerative Erkrankungen sind häufig sporadisch, selten erblich auftretende Prozesse, die vorwiegend das Zentralnervensystems (ZNS) betreffen. Die Ursache für die Erkrankungen, die ein oder mehrere Neuronensysteme oder das gesamte ZNS betreffen können, ist bisher ungeklärt. Sie gehen mit einem langsam fortschreitenden Funktionsverlust und einem Ausfall spezifischer Neuronenpopulationen und ihrer Verbindungen einher. Häufig sind damit auch Störungen des intrazellulären Ubiquitin-Proteosomensystems verbunden, die zu Veränderungen der Zytoskelettproteine, mit Ablagerung unlöslicher Eiweißbruchstücke oder Einschlusskörper im Zytoplasma oder dem Zellkern einhergehen. Dabei werden häufig Amyloidablagerungen, neurofibrilläre Bündel und Lewy-Körper in den Zellen gefunden. Die Erkrankungen zeigen alle einen progressiven Verlauf, bei dem es zu charakteristischen klinischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen kommt. Da diese meist im fortschreitenden Alter auftreten, führen die steigende Lebenserwartung und Zunahme des Anteils älterer Menschen, zu einem drastischen Anstieg dieser Erkrankungen. Bis 2030 wird in der EU voraussichtlich ein Drittel der Bevölkerung über 65 Jahre und ein Viertel über 80 Jahre alt sein und besitzt dadurch ein erhöhtes Risiko für neurodegenerative Krankheiten und Demenzen (Jellinger, 2005). Bei den neurodegenerativen Erkrankungen sind Morbus Alzheimer (Alzheimer-Syndrom, engl. *Alzheimer's disease*, AD) und Morbus Parkinson (engl. *Parkinson's disease*, PD) die am häufigsten auftretenden Leiden und nehmen weltweit stark zu. Typischerweise sind diese Krankheiten durch eine schleichende Entwicklung, die meist zwischen dem 50. und 75. Lebensjahr beginnt und durch einen langsamen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Der Tod erfolgt meist durch Sekundärkomplikationen (Pneumonie, Harnwegs- und andere Infekte, Lungenembolie u. a.), kardiovaskuläre Prozesse oder Ausfall lebenswichtiger zerebraler Funktionen. Neurodegenerative Erkrankungen werden traditionell nach klinisch-pathologischen Gesichtspunkten eingeteilt, wobei man sich nach den betroffenen Neuronengruppen und deren klinischen Auffälligkeiten richtet. Häufig kommen auch Überlappungen und Kombinationen der betroffenen Systeme vor. Man unterscheidet zwischen Demenz-Erkrankungen, wie dem Alzheimer-Syndrom, Prionen-Erkrankungen, wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. *Creutzfeldt-Jakob-Disease*, CJD), und

Neurodegenerationen des motorischen Systems. Letztere Gruppe wird noch weiter in Erkrankungen unterteilt, die bevorzugt die Stammganglien betreffen, wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington (engl. *Huntington disease*, HD) sowie Erkrankungen, die die Motoneurone betreffen wie die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und die Spinale Muskelatrophie (SMA).

Bei einer neueren Gliederung der Erkrankungen richtet man sich nach den molekularbiologischen Erkenntnissen wie den betroffenen Proteinablagerungen und –aggregaten. Für die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit wurden Ablagerungen von Prionen (Gonzalez et al., 2005), für Morbus Alzheimer Amyloide-Plaques (Sennvik et al., 2000), für Chorea Huntington polyglutaminhaltige Anreicherungen (Yang et al., 2002) und für Morbus Parkinson eine Ablagerung von alpha-Synuklein (Tofaris and Spillantini, 2005) beschrieben. Da eine Fehlfaltung von Zellproteinen den molekularen Grundmechanismus der meisten dieser Erkrankungen darstellt, werden sie als „Proteinopathien" zusammengefasst. Daneben unterscheidet man erbliche Erkrankungen, sog. Heredodegenerationen, für welche die moderne Neurogenetik das verantwortliche Gen identifiziert hat, wie etwa Chorea Huntington, familiäre Alzheimer- und Parkinsonformen, von sog. sporadischen Erkrankungen, für die bisher keine hereditären Grundlagen erhoben wurden.

## 1.2. Motoneuronerkrankungen

Bei den Motoneuronerkrankungen (engl. *Motor neuron Diseases*, MND) handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, die eine Schädigung der Motoneurone gemeinsam haben. Dabei kann es sich um erworbene oder hereditäre Krankheitsbilder handeln. Die Axone der Motoneurone bilden die efferenten Nervenbahnen, die direkt oder indirekt die Muskulatur des Körpers innervieren. Grundsätzlich kann man zwei verschiedene Gruppen von Motoneuronen unterscheiden. Als erstes Motoneuron bezeichnet man diejenigen motorischen Neurone, deren Zellkörper sich im motorischen Kortex der Großhirnrinde befinden und die Willkürmotorik steuern. Dabei handelt es sich um besonders große Pyramidenzellen, die als Betz-Riesenzellen bezeichnet werden und in der Lamina pyramidalis interna liegen. Die Axone dieser Neurone bilden die Pyramidenbahn und projizieren zum einen in das Vorderhorn des Rückenmarks und zum anderen in die motorischen Kerne des Stammhirns (in Abb. 1 blau). Dort werden diese auf das zweite Motoneuron verschaltet. Diese sind die eigentlichen Impulsgeber für die Muskeln. Im Vorderhorn der grauen Substanz befinden sich die

Zellkörper des zweiten Motoneurons. Die Axone verlassen über den Spinalnerv den Wirbelkanal und ziehen dann zu den entsprechenden Muskeln, die sie innervieren (in Abb. 1 rot). Die Zellkörper für die Muskulatur des Kopfes (z. B. die Kaumuskulatur) liegen in den motorischen Kernen (Nuclei motorii) der Hirnnerven im Hirnstamm.

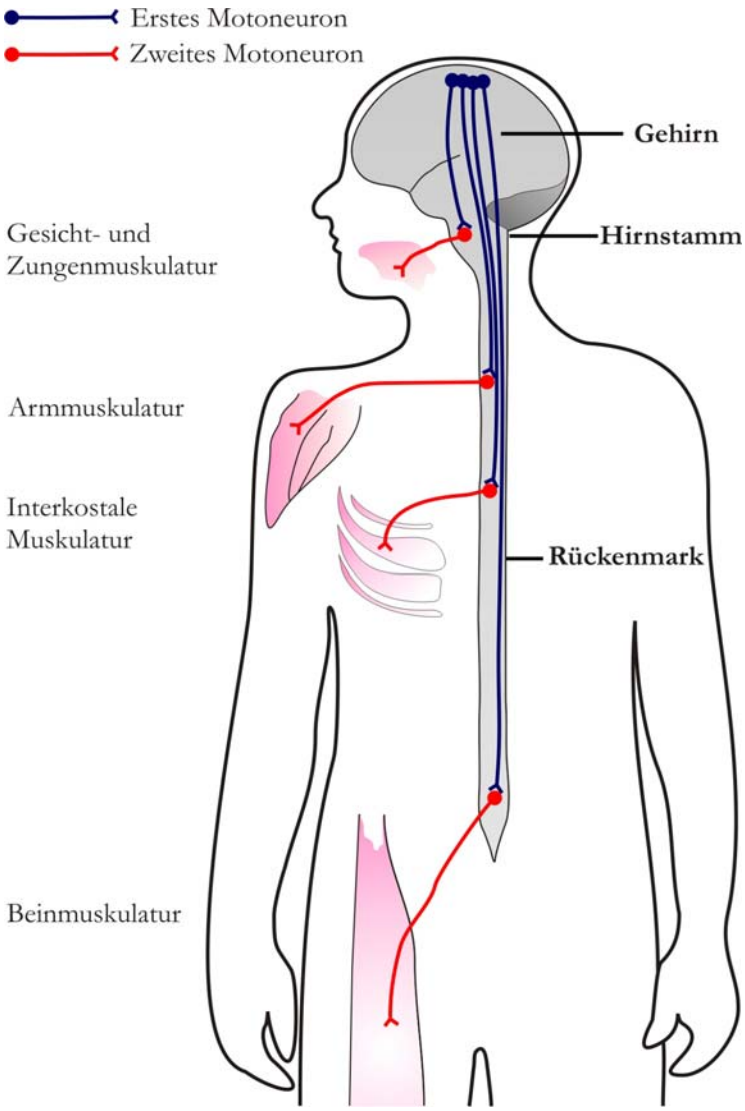



**Abbildung 1 Schematische Darstellung des Verlaufs der Motoneurone. (verändert nach www.education_als_memory.ucsf.edu)**

Je nachdem, welche der beiden Gruppen der motorischen Neurone betroffen ist, entwickeln sich verschiedene Erkrankungen. Sind die ersten Motoneurone betroffen, so kann es zu einer spastischen Spinalparalyse oder einer hereditären spastischen Paraparese kommen. Beispiele für Erkrankungen des zweiten Motoneurons sind die Spinale Muskelatrophie oder progressive Muskelatrophie. Sind beide Gruppen betroffen, so kommt es zur Amyotrophen Lateralsklerose.

## 1.3. Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist die am häufigsten auftretende Erkrankung innerhalb der Motoneuronerkrankungen. Als erster beschrieb der Arzt Charcot 1869 das Krankheitsbild der ALS mit dessen typischen Symptomen. Weltweit kann man von einer Prävalenz der Amyotrophen Lateralsklerose von 3-8 pro 100.000 Einwohner ausgehen, wobei die durchschnittliche Lebenserwartung nach Diagnosestellung zwischen 3 und 5 Jahren liegt. Die Inzidenz wird auf ca. 0,5-2,6 pro 100.000 Einwohnern und Jahr geschätzt (Dengler and Ludolph, 2000). Damit entsprechen diese Zahlen fast den Neuerkrankungen bei der Multiplen Sklerose (Inzidenz 3-5 pro 100.000 Einwohner und Jahr). Die ALS tritt hauptsächlich ab dem 50. Lebensjahr auf, wobei Männer durchschnittlich häufiger erkranken als Frauen (Verhältnis 3:2). Es gibt allerdings auch früher erkrankende Patienten, die zwischen 20 und 30 Jahre alt sind (Dengler and Ludolph, 2000). Die Ursachen der ALS ist bis heute nur teilweise geklärt.
Charakteristisch für die klassische ALS ist die Degeneration der beiden motorischen Neurone, das heißt des ersten und zweiten Motoneurons. Im Motorkortex überwiegt die axonale Degeneration von Betz-Riesenzellen. Ebenso können auch Veränderungen an den Dendriten im Sinne einer Verschmächtigung des Dendritenbaums ausgemacht werden. Im Bereich der Vorderwurzeln im Rückenmark kommt es meist zu einer Atrophie, die auf zervikalem und lumbalem Niveau besonders ausgeprägt ist. Die Schädigung der Motoneurone hat wahrscheinlich schon viele Jahre vor dem Auftreten der ersten neurologischen Symptome begonnen. Zu Beginn der Erkrankung zeigt sich bei den meisten Patienten eine Muskelschwäche, wobei sich diese je nachdem, welche Muskelpartie zuerst betroffen ist, völlig unterschiedlich darstellt. Bei der spinalen ALS ist bei den Patienten zunächst die periphere Extremitätenmuskulatur betroffen. Dies zeigt sich meist durch eine Ungeschicklichkeit der Hände, z.B. beim Schreiben, oder einer Gangunsicherheit, sowie einer Schwäche der Beine. Anschließend breiten sich die Symptome auf die Nacken-, Gesichts-, Sprach-, Kau-, Schluck- und Atemmuskulatur aus. Bei ca. 25 % der Patienten wird eine bulbäre Symptomatik diagnostiziert, dabei bemerkt der Patient als erstes Sprech- und Schluckstörungen. Bemerkenswert ist, dass der spinalen und der bulbären Verlaufsform die gleiche Ursache, sprich die Degeneration der Motoneurone, zugrunde liegt.
Neben der zu 90 % sporadisch auftretenden Form der ALS (sALS) existiert eine vererbbare, familiäre Form (fALS). Bisher kann die Krankheit nur unzureichend behandelt werden. So führt die Therapie mit Riluzol, dem bisher einzigen spezifischen ALS-Medikament, lediglich zu einer Verlängerung der Überlebenszeit um drei bis vier Monate bei einer durchschnittlichen

Restlebenserwartung von 18 Monaten (Miller et al., 2003). Einen neuen Forschungsansatz stellte die Entdeckung dar, dass ein Teil der fALS-Patienten eine Mutation (G93A) im Gen für das Enzym Cu/Zn Superoxid Dismutase 1 (SOD1) aufweist (Rosen et al., 1993). Bei dem Enzym handelt es sich um einen so genannten Radikalfänger, der die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in nicht-toxische Stoffwechselprodukte katalysiert. Da die Mutation in der SOD1 die normale Funktion, d.h. die Umwandlung von Superoxiden zu Sauerstoff und Hydrogenperoxid, nicht beeinträchtigt, wird vermutet, dass das Enzym eine unbekannte Funktion dazu gewinnt („gain of function") (Reaume et al., 1996).

1994 wurde ein transgenes Mausmodell (SOD1/+) entwickelt, das die mutierte Form (G93A) des humanen Cu/Zn SOD1 Proteins exprimiert und die klinischen und neuropathologischen Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration, ähnlich der ALS, entwickelt (Gurney et al., 1994). Seit diesem Zeitpunkt existiert ein genetisch definierter Modellorganismus (im Folgenden als Mausmodell bezeichnet), an dem die Pathogenese und eine mögliche Therapie der ALS untersucht werden kann (Dal Canto and Gurney, 1994; Gurney et al., 1994). Transgene Mäuse, die eine hohe Kopienzahl des mutierten Cu/Zn SOD1-Gens tragen, haben eine Lebenserwartung von ca. 130 Tagen. Die ersten ultrastrukturellen Zeichen der Erkrankung sind eine extensive Mikrovesikulation großer Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks, die offensichtlich von degenerierenden Mitochondrien hervorgerufen wird (Dal Canto and Gurney, 1994). Neuere Untersuchungen der ALS zeigten, dass die mutierte Form der humanen Cu/Zn SOD1, sowohl beim Menschen als auch in dem transgenen Mausmodell zu einer oxidativen Schädigung der Mitochondrien und nachfolgend zum Absterben der Motoneurone führt (Mattiazzi et al., 2002).

Bisher wurden bei der Charakterisierung des SOD1 Modells nur motorische Fähigkeiten, motorische Aktivität und Explorationsverhalten, sowie das Gewicht und die neuropathologischen Veränderungen im Gehirn und Rückenmark im Verlauf der Erkrankung beschrieben (Gurney et al., 1994; Miana-Mena et al., 2005; Bucher et al., 2007). Außerdem wird dieses Modell zur Erprobung möglicher neuer Therapieansätze für ALS verwendet (Schutz et al., 2005; Vlug et al., 2005). Noch völlig ungeklärt ist, ob die mutierte Form der humanen SOD1 eine Auswirkung auf das Lernvermögen oder das Angstverhalten der Tiere hat.

Seit 2003 stehen neben dem transgenen SOD1 Mausmodell zwei weitere Mausmodelle zur Erforschung neurodegenerativer Krankheiten zur Verfügung:

1. Loa (*Loa* = *Legs at odd angles*) Mausmodell (Loa/+)
2. Cra1 (*Cra* = *Cramping legs*) Mausmodell (Cra1/+) (Hafezparast et al., 2003)

Entstanden sind die beiden genetisch definierten Mausmodelle durch Behandlung mit mutagen wirkenden Substanzen. Beide Mausmodelle sind durch eine milde Form einer Motoneuronenerkrankung gekennzeichnet, die die Lebenserwartung nicht beeinträchtigt (Hafezparast et al., 2003). Sowohl das Loa als auch das Cra1 Mausmodell tragen eine Mutation in dem Dnchc1-Gen (Dynein cytoplasmic heavy chain 1). Dynein ist ein Motorprotein und gehört zu einer Gruppe von Mikrotubulus-aktivierten ATPasen. Dieses ist in Nervenzellen für Bewegungsvorgänge verschiedener Art, wie zum Beispiel des retrograden axonalen Transports, der Proteinverteilung zwischen apikaler und basolateraler Neuronenoberfläche, intrazellulärer Bewegungen von Vesikeln und Umlagerungen von Endosomen und Lysosomen, verantwortlich.

Die Cra1 Maus ist durch eine Punktmutation (Basenaustausch) im Dnchc1-Gen an Position 1056 (A1056G) gekennzeichnet. Diese Mutation führt zu der Synthese eines cytoplasmatischen Dyneinkomplexes mit gestörter Funktionalität, die sich in einem gestörten retrograden axonalen Transport zeigt. Die heterozygoten Tiere dieses Mausmodells zeigen Ähnlichkeiten zur humanen ALS-Pathologie, wie zum Beispiel altersabhängiger Muskelschwund und Einschränkungen der motorischen Fähigkeiten. Des Weiteren ist eine signifikante Abnahme der alpha-Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistertieren beschrieben worden (Hafezparast et al., 2003).

Bei der Cra1 Maus ist bereits am 10. Tag nach der Geburt ein krampfartiges Anziehen eines oder auch beider Hinterbeine an den Körper festzustellen, sobald die Maus am Schwanz gehoben wird. Dieser Phänotyp verschlimmert sich allerdings mit zunehmendem Alter nicht (Hafezparast et al., 2003). Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei der Loa Maus gemacht werden (Hafezparast et al., 2003), woraufhin die Arbeitsgruppe um E. Fisher das doppelt-transgene Loa/SOD1 Mausmodell entwickelte und damit einen weiteren Ansatz für die Erforschung der ALS-Pathogenese schaffte (Kieran et al., 2005). Man erwartete, dass die doppelt-transgenen Loa/SOD1 Tiere, die zusätzlich zu der mutierten humanen SOD1 einen gestörten retrograden axonalen Transport aufweisen, einen schwereren Phänotyp als die transgenen SOD1 Tiere entwickeln würden. Die doppelt-transgenen Loa/SOD1 Mäuse zeigten jedoch unerwarteterweise eine längere Überlebenszeit als die SOD1 Mäuse. Immunhistochemische Untersuchungen der doppelt-transgenen Loa/SOD1 Tiere zeigten eine verringerte Abnahme der alpha-Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks im Vergleich zu den SOD1 Tieren (Kieran et al., 2005). Aufgrund dieser Tatsache wurden in unserer Arbeitsgruppe doppelt-transgene Cra1/SOD1 Tiere gezüchtet und untersucht. Dabei konnte auch bei diesen Tieren eine Lebensverlängerung um ca. 20 Tage festgestellt werden (Teuchert et al., 2006). Die Ursachen für diese Befunde sind bisher unbekannt. Insgesamt gibt es über

die Cra1 Maus nur zwei Arbeiten, wobei sich die Untersuchungen auf die neuropathologischen Veränderung im Rückenmark, die motorische Koordination und die Muskelkraft der Tiere beschränkten (Hafezparast et al., 2003; Teuchert et al., 2006). Bei dem Vergleich der beiden Arbeiten kommt es allerdings bezüglich der Anzahl der Motoneurone im Rückenmark zu unterschiedlichen Ergebnissen.

## 1.4. Tauopathien

Tauopathien sind neurodegenerative Erkrankungen, die als gemeinsames Merkmal die Ansammlung des Tau-Proteins haben. Die Hauptfunktion des Proteins Tau ist die Stabilisierung der Mikrotubuli, indem es die Bindung an das Tubulin erleichtert. Allerdings hat Tau wahrscheinlich auch noch andere Funktionen, insbesondere die Regulation des Kinesin-abhängigen anterograden axonalen Transports von Vesikeln entlang der Mikrotubuli (Sato-Harada et al., 1996). Bei der mikroskopischen Untersuchung des Hirngewebes von Patienten mit einer Tauopathie findet man diese Tau-Protein-Ablagerungen als neurofibrilläre Bündel in Nerven- und Gliazellen. Die Ursache der meisten Tauopathien ist unbekannt. Zu der Gruppe der Tauopathien zählen unter anderem Morbus Alzheimer, Morbus Pick und frontotemporale Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17). Einige Tauopathien sind erblich, und so findet man bei Patienten der hereditären Form von FTDP-17 Mutationen im Tau-Gen. Klinisch wird dieses Syndrom durch eine schwere Störung von Kognition und Verhalten sowie durch einen Parkinsonismus beschrieben. In der neuropathologischen Untersuchung fand sich korrespondierend dazu ein Neuronenverlust im frontalen Kortex, sowie in der Substantia nigra und anderen Hirnregionen. Dabei waren sehr viele neurofibrilläre Bündel mit hyperphosphoryliertem Tau nachzuweisen. Heute sind mehr als 40 Mutationen in dem MAPT (Motorprotein-assoziiertes Protein Tau) beschrieben worden, die in 117 Familien mit einer Tauopathie auftreten (Rademakers et al., 2003). Bei anderen Untersuchungen wurde bei Patienten mit ALS eine Beeinträchtigung vor allem frontaler kognitiver Funktionen festgestellt (Ludolph et al., 1992; Wilson et al., 2001; Schreiber et al., 2005). Der Nachweis einer Dynaktinmutation in einer Familie, in welcher sowohl frontotemorale Demenzen als auch typische Motoneuronerkrankungen auftreten (Munch et al., 2005), ist ein Hinweis auf den fließenden Übergang zwischen Motoneuronerkrankungen und Demenzen.

Diese neue Erkenntnis legt die Vermutung nahe, dass es auch bei Mäusen mit Motoneuronerkrankungen, wie bei Mäusen mit frontotemporalen Demenzen (FTD), es zu einer Beeinträchtigung der kognitiven Funktionen kommen könnte.
Nach der Identifikation von pathogenen Mutationen von Tau bei FTDP-17 Patienten wurden von mehreren Arbeitsgruppen transgene Mäuse mit diesen Tau-Mutationen etabliert. Diese Mäuse wiesen sowohl in den Neuronen (Lewis et al., 2000; Gotz et al., 2001b; Tanemura et al., 2001; Allen et al., 2002; Tatebayashi et al., 2002) als auch in den Gliazellen (Gotz et al., 2001a; Higuchi et al., 2002) neurofibrilläre Bündel auf.
Ein Tiermodell mit einer FTDP-17 Mutation ist die transgene Maus, welche die pathogene Mutation P301L (Austausch von Lysin durch Prolin an der Stelle 301) des humanen Tau-Gens unter der Kontrolle des neuronen-spezifischen mThy1.2 Promotors exprimiert (Pennanen et al., 2004). Dieses Mausmodell weist eine hohe Expression des mutierten P301L Tau im Hippocampus, Neokortex, Rückenmark und in der Amygdala auf, wobei es zu keiner Schädigung der Motoneurone im Rückenmark kommt. Eine schwächere Expression wird im Hirnstamm und dem Striatum gefunden. Dieses Expressionsmuster hat eine Ähnlichkeit mit den Mutationen, die zu neurofibrillären Anreicherungen bei verschiedenen humanen neurodegenerativen Krankheiten, wie Morbus Alzheimer oder frontotemporalen Demenzen, führen (Gotz et al., 2001b; Pennanen et al., 2004). Es zeigte sich, dass die Tiere eine Steigerung des Explorationsverhaltens, sowie deutlich gesteigerte motorische Aktivität im Open Field aufwiesen. Des Weiteren waren Defizite des räumlichen Referenzgedächtnisses sowie ein reduziertes Angstverhalten nachweisbar (Pennanen et al., 2004; Pennanen et al., 2006).

## 1.5. Verhaltensanalysen

Die Gentechnologie, welche heute eine *in vivo* Modulation von Genexpressionen in Modellorganismen ermöglicht, lieferte den Forschern die einzigartige Möglichkeit, mit Hilfe von Verhaltensanalysen die Funktion von einzelnen Genen in biologischen Systemen unter normalen (gesunden) oder pathologischen Bedingungen zu studieren. Obwohl es verschiedene Labortiere gibt, ist die Maus eines der bevorzugten experimentellen Modelle um neurobiologische Prozesse, sowie die Neuropathologie des Zentralen Nervensystems und des Verhaltens zu untersuchen. Mäuse haben auf der anatomischen, zellulären, biochemischen und molekularen Ebene viele Eigenschaften mit dem Menschen gemeinsam. Außerdem

besitzen sie, wie der Mensch, kortikale und subkortikale Funktionen wie Angst, Hunger, Tagesrhythmus, Aggression, Gedächtnis und andere emotionale Reaktionen. Folglich werden Maumodelle in vielen Studien genutzt, um menschliche Verhaltensweisen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu simulieren. Die Modelle werden zum Beispiel genutzt um neue therapeutische Interventionen zu entwickeln oder toxikologische Screenings durchzuführen. Das Verhalten der Versuchstiere wird durch viele genetische und umweltbedingte Faktoren beeinflusst. Die Wahl der einzelnen Experimente ist genau so wichtig wie die Durchführung des Verhaltenstests selbst. Daher ist es eine große Herausforderung, Verhaltenstests so durchzuführen, dass diese in anderen Laboren reproduzierbar sind und die gewonnenen Daten vergleichbar bleiben. Ein wichtiges Hilfsmittel bei der objektiven Beobachtung des Verhaltens von Versuchstieren ist daher eine automatisierte Messung mittels eines Videoerfassungs-Systems. Ein weiterer Vorteil einer solchen Aufzeichnung der Daten ist, dass diese mit veränderten oder neuen Parametern erneut analysiert und quantifiziert werden können. Wird hingegen das Verhalten durch einen Beobachter bewertet, muss vorher ein eindeutiges Protokoll zur Durchführung festgelegt werden. Bei der Durchführung von Verhaltensuntersuchungen muss aber noch weit mehr beachtet werden. Eine Grundvoraussetzung ist der Vergleich der Experimentaltiere mit passenden Kontrolltieren, die unter identischen Bedingungen gehalten und gleich behandelt werden müssen. Ein Kontrolltier ist dann passend, wenn es das gleiche Alter, das gleiche Geschlecht und den gleichen allgemeinen genetischen Hintergrund besitzt. Die Wichtigkeit des genetischen Hintergrunds wird bei der Beobachtung von bestimmten Verhaltensweisen deutlich, da sich verschiedene Mausstämme unterscheiden können. Hier zeigen zum Beispiel die DBA/2J und DBA/2N Tiere im Gegensatz zu den C57BL/6 Mäusen eine deutliche Beeinträchtigung in Hippocampus-abhängigen Lernparadigmen (Upchurch and Wehner, 1988; Stiedl et al., 1999).

Der genetische Hintergrund, der emotionale Zustand der Tiere vor Versuchsbeginn und die Umgebung beeinflussen das Verhalten der Versuchstiere, daher ist es wichtig, dass man auf standardisierte Experimente zurückgreift, und so für alle Versuchstiere gleiche Voraussetzungen schafft.

## 1.6. Ziele dieser Arbeit

Aufgrund der aktuellen Diskussion um den Zusammenhang von Motoneuronerkrankungen (MND), im speziellen der ALS, und frontotemporalen Demenzen (FTD) wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene motorische und nicht-motorische Funktionen in genotypisch gut charakterisierten MND Mausmodellen untersucht. Damit wird zum ersten Mal systematisch in den Mausmodellen Cra1, Cra1/SOD1 und SOD1 mit Hilfe von Verhaltenstests nicht nur motorische Koordination (Weydt et al., 2003; Teuchert et al., 2006), sondern auch der allgemeine Gesundheitszustand, die sensorisch-motorischen Fähigkeiten, die motorische Aktivität, die kognitiven Fähigkeiten und das Explorations- und Angstverhalten untersucht. Die Daten werden ebenfalls bei gleichaltrigen Wildtyp- (WT) und P301L Tieren unter parallelisierten Versuchbedingungen erhoben und mit den oben erwähnten MND Mausmodelldaten verglichen. Mit der Parallelisierung soll gewährleistet werden, dass die eventuell zu beobachtenden Verhaltensänderungen von der jeweiligen genetischen Veränderung des Genoms und nicht aufgrund von Umweltfaktoren, wie beispielsweise den Haltungsbedingungen, herrühren. Der Vergleich der drei MND Modelle mit dem P301L Modell, welches eine Tauopathie widerspiegelt und damit im Zusammenhang mit kognitiven Einschränkungen zu sehen ist, soll klären, inwieweit die Mutationen in den MND Tieren die kognitiven Fähigkeiten beeinflussen. Dieser Aspekt ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass bei Patienten, die eine Mutation im Motorprotein-Komplex des Dynein-Dynaktins haben, auch frontotemporalen Demenzen auftreten können. Daher war ein Ziel dieser Untersuchungen die Charakterisierung der Cra1 Tiere im Hinblick darauf, wie sich die Dyneinmutation auf verschiedene Verhaltensweisen und das Lernen auswirkt. Aufgrund der Ergebnisse soll eine bessere Zuordnung des Cra1 Modells zu einem bestimmten Krankheitsbild möglich sein. Durch diese Zuordnung könnte das Cra1 Modell gezielter für Untersuchungen von Therapieansätzen eingesetzt werden.

Des Weiteren soll mit Hilfe dieser Arbeit geklärt werden, ob das am häufigsten für die ALS verwendete SOD1 Mausmodell, neben den schon bekannten motorischen Defiziten und dem verminderten Explorationsverhalten (ab Tag 100) (Weydt et al., 2003; Bucher et al., 2007), auch ein verändertes Angstverhalten und Lerndefizite aufweist. Letzteres ist auch bei Patienten mit ALS beschrieben (Takeda et al., 2007). Diese Klärung ist wichtig, da so die Wirkung der Mutation des SOD1 Gens auf weitere neuronale Gruppen im Gehirn neben den bekannten Beeinträchtigungen der Motoneurone untersucht wird. Dadurch könnte dieses Modell neben der Erforschung der Mechanismen, die zu einer MND führen, auch für

Untersuchungen einer gleichzeitig auftretenden FTD dienen. Es ist bekannt, dass die Dyneinmutation der Cra1 Tiere die zusätzlichen Funktionen der mutierten SOD1 („gain of function"-Theorie) im SOD1 Modell mildert und es zu einer Neuroprotektion der Motoneurone kommt (Teuchert et al., 2006). Daher soll in dieser Arbeit geklärt werden, ob die Cra1 Mutation neben dieser neuroprotektiven Wirkungen auf die Motoneurone, auch Effekte auf das Verhalten, wie beispielsweise Exploration, Angst, Aktivität oder Lernen der SOD1 Maus hat. So soll der Einfluss der Mutation auf weitere erwartete Defizite der SOD1 Maus, wie das oben erwähnte Lernen, untersucht werden.

# 2. Material und Methoden

## 2.1. Verwendete Mäusestämme

### 2.1.1. Der Mausstamm Cramping 1 (Cra1)

Der Mausstamm mit einer Mutation in dem Dynein-Gen Dnchc1 (Dynein cytoplasmic heavy chain 1) wurde 2003 der neurologischen Abteilung der Universität Ulm von der Firma Ingenium Pharmaceuticals, München, zur Verfügung gestellt. Diese Tiere haben den genetischen Inzuchthintergrund C3He. Heterozygote Träger der Mutation (*Cra1*/+) sind im Gegensatz zu homozygoten Tieren (*Cra1*/*Cra1*), die aufgrund der Unfähigkeit Nahrung aufzunehmen innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt sterben, überlebensfähig und werden kurz Cra1 genannt. Diese Mutation wird autosomal dominant vererbt und heterozygote Tiere weisen einen frühen Phänotyp auf, indem sie eine unübliche Körperdrehung und ein Verkrampfen der Hinterbeine zeigen. Histopathologische Untersuchungen haben offensichtlich gezeigt, dass heterozygote Tiere in einem Alter von 16 Monaten signifikant weniger alpha-Motoneurone besitzen, wobei die Autoren den untersuchten Bereich nicht genauer benennen (Hafezparast et al., 2003).

### 2.1.2. Der Mausstamm SOD1-G93A (SOD1)

Der transgene Mausstamm B6.CG-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J, kurz SOD1, wird von der Firma The Jackson Laboratories kommerziell vertrieben und in der Tierhaltung der Universität Ulm mittels einer Erhaltungszucht gezüchtet. Diese Tiere tragen multiple Genkopien des mutanten Allels der humanen SOD1 (hSOD1), welches anstatt des Glycins an der Stelle 93 ein Alanin trägt. Dieser Faktor wird autosomal dominant vererbt, und da den Tieren das korrespondierende mutierte Allel des humanen SOD1 Transgens fehlt, werden diese als hemizygot bezeichnet. Hemizygote transgene Mäuse dieses Stammes zeigen eine Lähmung in einem oder beiden Hinterbeinen und haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von 19-

23 Wochen (Teuchert et al., 2006). Die Lähmungen treten aufgrund des Verlusts der alpha-Motoneurone im lumbalen Teil des Rückenmarks auf.

### 2.1.3. Der Mausstamm P301L

Dieses transgene Mausmodell wurde der neurologischen Abteilung der Universität Ulm von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Götz (Universität Zürich) zur Verfügung gestellt. Diese Tiere exprimieren das humane Protein Tau mit der pathogenen Mutation P301L, bei der Leucin gegen Prolin in der Aminosäuresequenz an der Stelle 301 ausgetauscht ist. Die längste im Gehirn vorkommende humane Tau Isoform (htau40) wurde unter Kontrolle des neurospezifischen mThy1.2 Promotors in Tiere mit dem C57Bl/6 Hintergrund eingebracht.
Diese Tiere tragen eine Mutation, die bei Patienten mit einer frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17) gefunden wurde. Die Tiere weisen aufgrund dieser genetischen Veränderung eine erhöhte Expression des Proteins Tau in der Amygdala auf (Gotz et al., 2001c; Pennanen et al., 2006).

### 2.1.4. Weitere verwendete Mäusestämme

Die Mäusestämme C57Bl/6J und C3HeB/FeJ wurden von der Firma The Jackson Laboratories bezogen und für die Erhaltungszuchten der Cra1 bzw. SOD1 Tiere genutzt.

## 2.2. Haltungsbedingungen

Alle Tiere wurden in Plastikkäfigen (26,5 cm x 20 cm x 14 cm) bei einer Raumtemperatur von 22°C gehalten. Als Nahrung wurde Wasser und das Maus-/ Rattenzuchtfutter Altromin 1310 (ad libitum) gegeben. Im Zuchtraum lag ein 12h Tag-Nacht-Rhythmus mit Licht von 7.00 - 19.00 Uhr vor.

## 2.3. Zuchtschemata

### 2.3.1. Erhaltungszuchten

#### 2.3.1.1. Cra1

Bei der Erhaltungszucht der Cra1 Tiere wurden Wildtyp (WT) Weibchen des Stammes C3HeB/FeJ mit Männchen des gleichen Stammes, die allerdings die Dyneinmutation trugen, verpaart. Dabei wurden je zwei Weibchen mit einem Männchen kontinuierlich in einem Zuchtkäfig gehalten. Die Nachkommen wurden wie in Abschnitt 2.6 beschrieben genotypisiert.

#### 2.3.1.2. SOD1

Für die Erhaltungszucht der SOD1 Tiere auf dem Hintergrund C57Bl/6 wurden SOD1 Männchen mit WT Weibchen des gleichen Hintergrundes verpaart. Auch hier wurden jeweils zwei Weibchen und ein Männchen in einem Zuchtkäfig gehalten. Die Nachkommen dieser Zucht wurden wie in 2.5 beschrieben genotypisiert. Bei den SOD1 Männchen, die weiter für das Züchten eingesetzt werden sollten, wurde mittels einer quantitativen RT-PCR die SOD1-Kopienzahl semiquantitativ bestimmt (siehe Abschnitt 2.4.3), damit nur Tiere in die Zucht eingingen, die in genügend hoher Anzahl die SOD1-Kopien trugen.

#### 2.3.1.3. P301L

Für die homozygoten P301L Tiere auf dem B6-Hintergrund wurden ebenfalls konstant zwei WT Weibchen mit einem homozygoten P301L Männchen verpaart.

### 2.3.2. Zuchten für den Versuch

#### 2.3.2.1. Cra1/SOD1 Zucht

Für die doppelt-transgene Zucht der Tiere wurden transgene SOD1 Männchen mit dem genetischen Hintergrund C57Bl/6 (siehe Abschnitt 2.3.1.2) mit heterozygoten Cra1 Weibchen des Hintergrundes C3He (siehe Abschnitt 2.3.1.1) verpaart. Ein Zuchtkäfig bestand auch hier aus zwei Cra1 Weibchen und einem SOD1-Männchen. Bei den Nachkommen gab es folgende vier verschiedene Genotypen: Cra1/SOD1, Cra1, SOD1 und WT, die je zu 25 % auftraten.
Für die Versuche wurde nur die F1 Generation genutzt, da diese den eindeutig bestimmten genetischen Hintergrund C3HB6 besaß.

#### 2.3.2.2. Heterozygote P301L Zucht

Zur Zucht der heterozygoten P301L Tiere wurden homozygote P301L Männchen des Hintergrundes C57Bl/6 (siehe Abschnitt 2.3.1.3) mit WT C3He Weibchen verpaart.
Hier wurden ebenfalls nur die genetisch eindeutig bestimmte F1 Generation in den Versuchen genutzt, die wie Tiere aus der Cra1/SOD1 Zucht (siehe Abschnitt 2.3.2.1) den genetischen Hintergrund C3HB6 besaß.

## 2.4. Genotypisierung der Versuchstiere

### 2.4.1. DNA Isolierung

Für die Diagnostik des Genotyps wurde von jedem Tier eine DNA-Probe benötigt. Dazu wurde den Jungtieren, nachdem sie von der Mutter isoliert wurden, ein 3 mm langes Stück der Schwanzspitze abgetrennt. Damit eine eindeutige Zuordnung des Genotyps zu jedem Tier gewährleistet werden konnte, wurden jedem Tier spezifische Ohrmarkierungen gesetzt.
Mit Hilfe eines DNA-Isolations-Kits (DNeasy Tisssue Kit, Quiagen) wurde die DNA aus jeder Schwanzspitze nach Anleitung isoliert. Die gewonnene DNA wurde bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert.

### 2.4.2. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine einfache *in vitro*-Technik mit deren Hilfe man spezifische DNA-Sequenzen amplifizieren kann. Zur Vervielfältigung eines DNA-Fragments definierter Länge verwendet man mindestens zwei Oligonukleotide, so genannte Primer, die zu den Randstücken des gewünschten DNA-Stücks jeweils komplementär sind und in gegenläufiger Richtung an den komplementären DNA-Strang binden können. Nach einer Hitze-Denaturierung werden die Primer an die DNA angelagert (Annealing) und von einer hitzebeständigen DNA-Polymerase verlängert (Elongation). Dieser Zyklus (Denaturierung, Annealing, Elongation) wird bis zu 35-mal wiederholt. Bei jedem Zyklus entstehen so die gewünschten Fragmente, die im nächsten Zyklus als Matrize dienen, und so findet eine exponentielle Amplifikation statt.
Essentiell für diese Reaktion ist eine hitzestabile Polymerase, da die Denaturierung der DNA-Templates bei 94°C stattfindet. In aller Regel wird die Taq-Polymerase aus dem Organismus Thermus aquaticus verwendet.
Nach der Beendigung der PCR werden in der Regel 5-10 µl des Endprodukts auf ein Agarosegel aufgetragen.

### 2.4.3. Quantitative *real-time* Rerverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Für die quantitative *real-time* RT-PCR wurde das *QuantiTec SYBR green RT-PCR Kit* (Qiagen, Hilden) und das *LightCycler*-System der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Das Grundprinzip der *LightCycler* (*real-time*) RT-PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR mit zusätzlicher Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung kann unter zu Hilfenahme von Fluoreszenz-Messungen am Ende eines PCR-Zykluses durchgeführt und ausgewertet werden. Die in dieser Arbeit verwendete Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Nutzung von *SYBR green I*, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, der sich wie Ethidiumbromid unspezifisch in die Doppelstrang-DNA einlagert und nach dem Einbau in der doppelsträngigen DNA fluoresziert. Durch diese Bindung wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Anzahl der gebildeten doppelsträngen DNA ist und das wie auch die Menge an DNA exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums ansteigt. Zur Quantifizierung wurde mittels der *LightCylcer* Software 3.5 von jeder

Probe der Wendepunkt (crossing point, $C_T$) in der log-Phase der sigmoiden Fluoreszenzkurve bestimmt. Um Pipettierfehler und andere Schwankungen bei den Messungen zu minimieren, wurde für jede Probe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der verwendete Standard-Ansatz sah wie folgt aus: 20 µl *SYBR-green* Mastermix, je 0,5 µl Primer (50 µmol/µl) (Tab. 1), 10 µl H2O und 10 µl DNA-Template der zu bestimmenden SOD1-Tiere.

**Tabelle 1: Primer für die quantitative *real-time* RT-PCR**

| Primer | Sequenz |
|---|---|
| mIL2-f | 5'-CCTTACAGAGGACAGGGAGTG-3' |
| mIL2-r | 5'-TTCTGTGGCCTAGAGGAGTAATAAG-3' |
| hSOD1-G93A-f | 5'-CCGATGTGTCTATTGAAGATTCTG-3' |
| hSOD1-G93A-r | 5'-CCGCGACTAACAATCAAAGTG-3' |

Von diesen 40,5 µl sind je 20 µl in eine für den *LigthCycler* vorgesehene Glaskapillare (Roche) gegeben worden. Nach dem Schließen und Zentrifugieren der Kapillaren bei 3000 g für 10 s wurde das Gerät beladen und gestartet. Die PCRs wurden nach dem Standardprogramm in Tab.2 durchgeführt. Dabei wurden der Zyklus nach der Initialdenaturierung 70-mal wiederholt. Im Anschluss an die letzte Elongationsphase führte das Gerät eine Schmelzkurvenanalyse durch, so dass die Ergebnisse der PCR ohne Nebenprodukte identifiziert und ausgewertet werden konnten.

**Tabelle 2: Protokoll für die quantitative *real-time* RT-PCR**

| Schritt | Temperatur | Dauer | Bemerkung |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95°C | 15 min | Initiale Denaturierung der DNA |
| Denaturierung | 95°C | 15 s | |
| Annealing | 55°C | 30 sec | 70 Zyklen |
| Elongation | 72°C | 30 sec | |

Für die Quantifizierung der Genexpression der hSOD1 diente als internes Referenz-Gen das murine IL-2 (mIL-2). Dieses wurde bei jedem Lauf mit gemessen, um einen relativen Mengenvergleich der einzelnen Proben durchzuführen. mIL-2 zeigte sich als ideale interne Kontrolle, da es leicht zu detektieren war, konstitutiv exprimiert und nicht reguliert wurde. Bei allen durchgeführten Untersuchungen basierte die Normalisierung der Datenmenge auf der

Expression des mIL-2 (relative Quantifizierung). Zur Berechnung der normalisierten Transkriptmenge von hSOD1 und mIL-2 wurde folgende Formel verwendet:
$\Delta C_T = C_T(\text{mIL-2}) - C_T(\text{hSOD1})$.
Die relative Transkriptmenge (X) der einzelnen Tiere wurde dann wie folgt berechnet: $X = 2^{\Delta CT}$.

### 2.4.4. Restriktionsspaltungen von DNA

Bei einer Restriktionsspaltung schneidet ein Restriktionsenzym den DNA-Strang an einer für es spezifischen Nukleotidabfolge der DNA. Je nach Menge der zu spaltenden DNA wurde das Gesamtvolumen bestimmt. Hierbei wurden für jede Probe ca. 0,5 µg DNA, 0,5 µl Restriktionsenzym und 2 µl 10-fach Restriktions-Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Optional wurde Kälberserum (engl. bovine serum albumine: BSA) in einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl dem Ansatz zugegeben. Die Ansätze wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert.

### 2.4.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, die DNA-Fragmente ihrer Größe nach auftrennt und durch die Einlagerung eines Farbstoffs, wie Ethidiumbromid, sichtbar macht. Dabei wandert die DNA im elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols, der Anode, da die DNA fast im gesamten pH-Bereich negativ geladen vorliegt.
Zur Herstellung der verwendeten Gele wurde eine entsprechende Menge Agarose (Biozym) in 1x TAE-Puffer (0,04 M TrisAcetat; 1 mM EDTA pH 8,0) eingewogen und in einem Mikrowellengerät (AEG) bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Nach der Abkühlung auf ungefähr 60°C wurden ca. 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) pro 100 ml Gel-Lösung hinzugefügt und das Gel in der gewünschten Größe gegossen.
Als Laufpuffer wurde standardmäßig 1x TAE-Puffer verwendet. Die Proben wurden zu 1/5 mit 10x DNA-Ladepuffer (40 mg Bromphenolblau und 5 ml Glycerin in 15 ml Aqua dest., mit 0.5 M EDTA auf pH = 8 eingestellt) vermischt und aufgetragen. Zudem wurde ein Längenstandard (Gene Ruler, 100 bp DNA Ladder, Fermentas) mitgeführt. Die angelegte

Spannung betrug 80 V. Die Agarosegele wurden im Anschluss mit Hilfe von UV-Durchsicht im Gel DOC 1000 (Bio-Rad) fotografiert.

## 2.5. Bestimmung der SOD1 Tiere

Dazu wurde nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema jede Probe mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, wobei hier zwei Primer-Paare (beide Thermo Electron, Ulm) benutzt wurden, ein Primerpaar für die humane SOD1 (hSOD1) und das andere für das murine IL-2 (mIL-2) als Kontrolle (Tab.4).

**Tabelle 3: Protokoll für den Ansatz einer SOD1-PCR**

| Reagenz | Volumen |
|---|---|
| Aqua dest. | 27,0 µl |
| 10x PCR-Puffer | 5,0 µl |
| $MgCl_2$ | 1,5 µl |
| dNTP`s | 4,0 µl |
| Primer mIL2-f | 2,0 µl |
| Primer mIL2-r | 2,0 µl |
| Primer hSOD1-G93A-f | 2,0 µl |
| Primer hSOD1-G93A-r | 2,0 µl |
| Taq | 0,5 µl |
| DNA-Template | 4,0 µl |
| Gesamtvolumen | 50 µl |

**Tabelle 4: Primer für die SOD1 PCR**

| Primer | Sequenz |
|---|---|
| mIL2-f | 5`-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3 |
| mIL2-r | 5`-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC-3` |
| hSOD1-G93A-f | 5`-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3` |
| hSOD1-G93A-r | 5`-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3` |

Die Ansätze wurden in einen Thermocycler (T3, Biometra) gegeben und mit dem in Tabelle 5 aufgeführtem Programm amplifiziert.

**Tabelle 5: PCR Programm für die SOD1 PCR**

| Schritt | Temperatur | Dauer | Bemerkung |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | Initiale Denaturierung der DNA: dsDNA → ssDNA |
| Denaturierung | 95°C | 60 sec | |
| Annealing | 60°C | 60 sec | |
| | primerspezifisch | | 30 Zyklen |
| Extension | 72°C | 50 sec | |
| Extension | 72°C | 10 min | |
| Kühlung | 4°C | unendlich | Kühllagerung |

Das PCR-Produkt wurde dann auf ein 1% Ethidiumbromid-Agarosegel aufgetragen, welches bei konstanten 80 V für 30 min in einer Gelkammer lief. Das fertige Gel wurde unter UV-Licht interpretiert.

Als transgen wurde eine Maus bezeichnet, wenn neben der Kontrollbande von IL-2 in Höhe von 300 bp eine zweite Bande in der Höhe von ca. 230 bp (hSOD1 Amplifikat) auf dem Agarosegel erkennbar war. Als Wildtyp-Maus wurden Tiere bezeichnet, bei denen nur eine Bande im Bereich von 300 bp (mIL-2) zu erkennen war (Abb. 2).

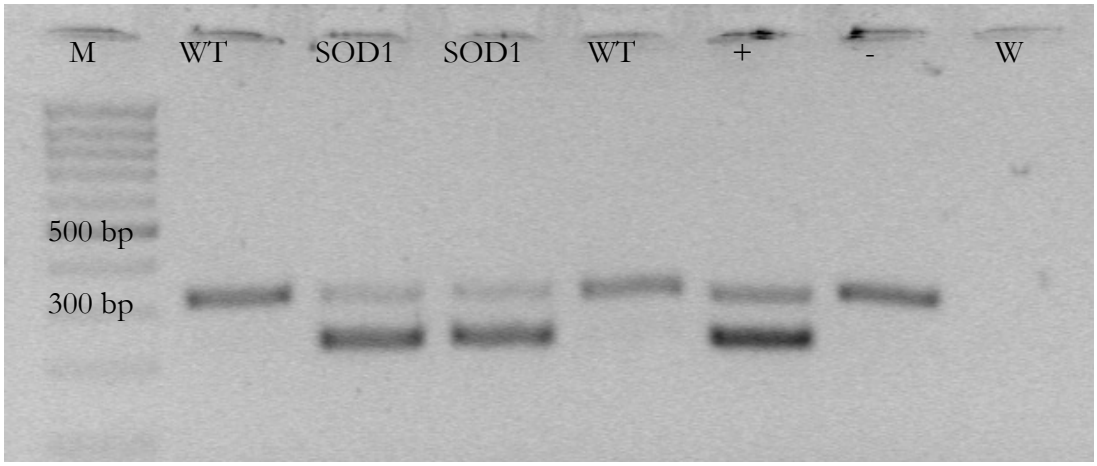



**Abbildung 2: Aufnahme eines Agarosegels mit verschiedenen Proben einer SOD1 PCR. M: Marker, WT: Wildtyp-Probe, SOD1: SOD1-Probe, +: Positivkontrolle, -: Negativkontrolle, W: Wasserprobe**

Bei den männlichen Tieren der Erhaltungszucht wurde des Weiteren vor dem Verpaaren mit Weibchen der relative Gehalt der SOD1-Kopienzahl mit Hilfe der in 2.3.4. beschriebenen *real-time* RT-PCR bestimmt. Zur Bestimmung des Gehalts wurde der Quotient aus hSOD1 und mIL-2 gebildet und alle Tiere, die bei diesem Wert >6,5 waren, wurden in der Zucht eingesetzt.

## 2.6. Bestimmung der Cra1 Tiere

Als zweites erfolgte eine PCR zur Bestimmung der Cra1 Tiere. Dazu wurde nach dem in Tabelle 6 aufgeführten Schema jede Probe für die PCR angesetzt, wobei die DNA-Sequenzen für die Primer zur Amplifikation der Muationsstelle des Dnchc1-Gens in Tabelle 7 aufgeführt sind.

**Tabelle 6: Protokoll für den Ansatz einer Cra1-PCR**

| Reagenz | Volumen |
|---|---|
| Aqua dest. | 27,0 µl |
| 10x PCR-Puffer | 5,0 µl |
| $MgCl_2$ | 1,5 µl |
| dNTP's | 4,0 µl |
| Dnchc-1-f Primer | 2,0 µl |
| Dnchc-1-r Primer | 2,0 µl |
| Taq | 0,5 µl |
| DNA-Template | 4,0 µl |
| Gesamtvolumen | 50 µl |

**Tabelle 7: Primer für die Cra1 PCR**

| Primer | Sequenz |
|---|---|
| Dnchc-1-f | 5'-TCCAAGACTTTGAAGTGAGGTTC-3' |
| Dnchc-1-r | 5'-CAGGGCCAAACACCAATACT-3' |

Die Ansätze wurden auch hier in den Thermocycler gegeben und mit Hilfe des in Tabelle 8 beschriebenen Programms amplifiziert.

**Tabelle 8: PCR Programm für die Cra1 PCR**

| Schritt | Temperatur | Dauer | Bemerkung |
|---|---|---|---|
| Denaturierung | 95°C | 5 min | Initiale Denaturierung der DNA: dsDNA → ssDNA |
| Denaturierung | 95°C | 60 sec | |
| Annealing | 55°C | 60 sec | |
| | primerspezifisch | | 30 Zyklen |
| Extension | 72°C | 50 sec | |
| Extension | 72°C | 10 min | |
| Kühlung | 4°C | unendlich | Kühllagerung |

RsaI-Restriktionsverdau

Um ein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich des Cra1 Genotyps zu erhalten, wurden die in der PCR amplifizierten Dnchc1 Fragmente einem Restriktionsverdau (Ansatz siehe Tabelle 9) mit dem Enzym RsaI (aus Rhodopseudomonas sphaeroides; Promega) unterzogen.

Das native Dnchc1 Fragment besitzt eine Schnittstelle für RsaI (GTAC) wohingegen die mutierte Form (GTGC) diese durch eine Punktmutation (A1056G) verloren hat. Daher kann das native Fragment in zwei Teilfragmente von 229 bp und 135 bp gespalten werden. Das mutierte Dnchc1 Fragment kann hingegen nicht gespalten werden und behält die Länge von 364 bp.

**Tabelle 9: Protokoll für den Ansatz des RsaI-Restriktionsverdaus**

| Reagenz | Volumen |
|---|---|
| Aqua dest. | 13,3 µl |
| Puffer C (10x) | 2,0 µl |
| BSA (100x) | 0,2 µl |
| RsaI (10 u/µl) | 0,5 µl |
| Amlifikat | 4,0 µl |
| Gesamtvolumen | 20 µl |

Dieser Reaktionsansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend mittels Gelelektrophorese der Größe nach in einem 2,5%igem Agarosegel in die einzelnen DNA-Fragmente aufgetrennt. Als heterozygote Maus wurde ein Tier bezeichnet, wenn dieses drei Banden in den Höhen 135 bp, 229 bp und 364 bp aufwies (Abb. 3).

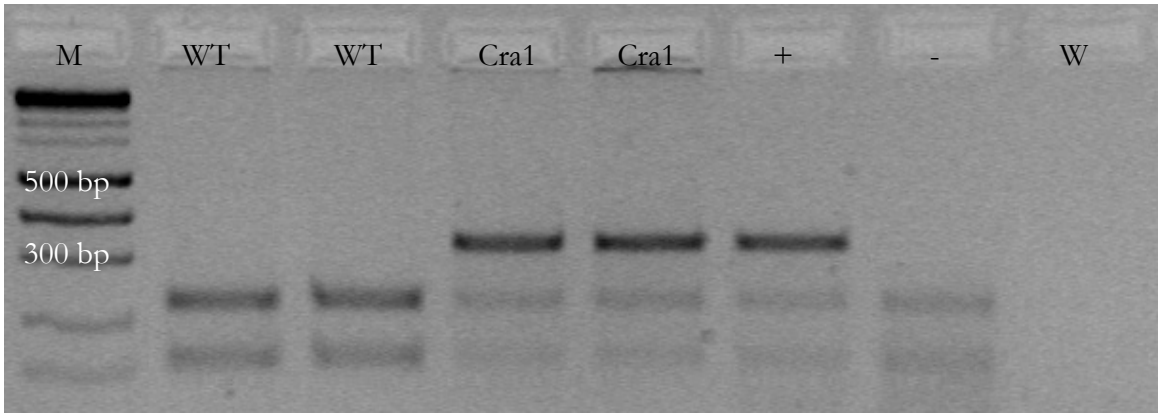



**Abbildung 3: Aufnahme eines Agarosegels mit verschiedenen Proben einer Cra1 PCR mit anschließendem RsaI-Restriktionsverdau. M: Marker, WT: Wildtyp-Probe, Cra1: Cra1-Probe, +: Positivkontrolle, -: Negativkontrolle, W: Wasserprobe**

## 2.7. Verhaltensuntersuchungen

Im Rahmen der Verhaltensuntersuchungen wurden mehrere Aspekte des Verhaltens getestet. Zunächst wurde der Gesundheitszustand der Tiere mit Hilfe des modifizierten SHIRPA-Tests (SmithKline Beecham Pharmaceuticals; Harwell, MRC Mouse Genome Centre and Mammalian Genetics Unit; Imperial College School of Medicine at St Mary's; Royal London Hospital, St Bartholomew's and the Royal London School of Medicine; Phenotype Assessment) bestimmt. Es folgten zur Analyse der motorischen Fähigkeiten mehrere Tests sowie Experimente zur Bestimmung des Angstverhaltens und der Gedächtnisfunktion.

Für die Untersuchungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit nur männliche Tiere verwendet, da von den SOD1 Tieren bekannt ist, dass sich bei motorischen Untersuchungen die weiblichen und männlichen Tiere nicht gleich verhalten (Miana-Mena et al., 2005). Die Tiere wurden zwei Wochen vor Versuchsbeginn in die Räume der Verhaltensversuche gebracht und in Einzelkäfigen gehalten. Damit die Tiere durch eventuelle Duftmarken des Vorgängers in den verschiedenen Apparaturen bei den Versuchen nicht beeinflusst wurden,

wurden alle benutzen Geräte und Labyrinthe zwischen den Versuchsdurchläufen mit 70%-igem Ethanol gereinigt.

Alle Tests wurden mit Tieren in zwei verschiedenen Altersklassen durchgeführt, damit bei den Cra1 Tieren der Verlauf der Verhaltensänderungen bestimmt werden konnte. Daher wurden die beiden Altersklassen drei und zwölf Monate gewählt. Der erste Zeitpunkt wurde so festgelegt, dass die zu untersuchenden SOD1 Tiere noch keine Paresen hatten und somit alle Tests durchlaufen konnten. Der zweite Zeitpunkt wurde aufgrund von vorhandenen Verhaltensdaten der P301L Tiere ausgewählt. Im Alter von drei Monaten testete ich Männchen der Genotypen WT, Cra1, Cra1/SOD1, SOD1 und P301L. In der Altersklasse der zwölf Monate alten Tiere waren die Genotypen WT, Cra1 und P301L Tiere vertreten, da die Cra1/SOD1 und SOD1 Mäuse nicht so lange überleben. Damit eventuelle Gedächtniseffekte ausgeschlossen werden konnten, war es für die Untersuchung wichtig, dass nur Tiere zum Einsatz kamen, die keinerlei Erfahrung mit den Verhaltensexperimenten hatten. Daher handelte es bei den Tieren in der Altersklasse zwölf Monate um andere Tiere als in der drei Monate alten Gruppe. Alle Versuche wurden mit der Genehmigung des Regierungspräsidiums Tübingen durchgeführt.

### 2.7.1. Modifizierter SHIRPA-Test

Um einen ersten Eindruck von dem Gesundheitszustand der Tiere zu erhalten, wurde ein modifizierter SHIRPA-Test (Rogers et al., 1997) durchgeführt. Dieser beinhaltete insgesamt 22 verschiedene Bewertungskriterien. Die verschiedenen Parameter wurden mit Hilfe einer festgelegten numerischen Skala erfasst, wobei es die Auswahl von zwei bis vier verschiedenen Abstufungen gab. Eine genaue Erklärung der einzelnen Untersuchungsparameter kann bei (Rogers et al., 1997) nachgelesen werden, wobei die hier verwendete modifizierte Version unter http://empress.har.mrc.ac.uk/browser/ erhältlich ist. Dieser Test begann bei jedem Tier mit der Feststellung des Körpergewichts und einer Observation des ungestörten Verhaltens in einem zylindrischen Beobachtungsbehälter (14 cm im Durchmesser, 18 cm hoch) aus klarem Plexiglas für etwa drei Minuten. Hierbei wurden der Aktivitätszustand (inaktiv, aktiv oder hyperaktiv), Tremor (vorhanden oder nicht vorhanden), Lidöffnung (Augen geöffnet oder Augen geschlossen), Aussehen des Fells (ordentlich gepflegt oder struppiges, stumpfes Aussehen), Barthaare (vorhanden oder nicht vorhanden), Tränenfluss (vorhanden oder nicht vorhanden) und Kotabsatz (vorhanden oder nicht vorhanden)

bewertet. Die Tiere wurden dann zur Beobachtung des motorischen Verhaltens für fünf Minuten in eine Arena (58 lang, 35 cm breit, 18 cm hoch) überführt, welche in 15 Quadrate mit einer Seitenlänge von 11 cm eingeteilt war. Hierbei wurden folgende Parameter beurteilt: Erregung nach dem Transfer (Körperstarre > 3 s, kurze Körperstarre mit anschließender Bewegung oder sofortiger Bewegung), spontane lokomotorische Aktivität (die ersten 30 s in der neuen Arena), Gang (flüssige Bewegung oder Mangel an flüssiger Bewegung), Schwanzstellung (horizontal, erhoben oder am Boden schleifend), Schreckreflex verursacht durch einen akustischen Reiz (kein Reflex, Zucken der Ohrmuscheln oder Zucken des ganzen Körpers) und Fluchtverhalten aufgrund einer Berührung (lässt Berührung zu, flieht nach Berührung oder lässt sich nicht berühren). Abschließend wurden noch folgende Parameter untersucht: Passivität (zappelt wenn man es am Schwanz hebt, zappelt wenn man es im Nacken hält, zappelt wenn man es auf den Rücken dreht oder zappelt bei keinem der vorher genannten Aktionen), Hautfarbe an den Pfoten (rot, rosa oder gebleicht), Rotation des Rumpfes wenn man das Tier am Schwanz hebt (vorhanden oder nicht vorhanden), Stellung der Hinterbeine wenn man es am Schwanz hebt (ausgestreckt oder angezogen), Ohrmuschelreflex (vorhanden oder nicht vorhanden), Lidschlussreflex (vorhanden oder nicht vorhanden), Aufstellreflex in einem Zylinder durch Drehung des Zylinders um 45° (vorhanden oder nicht vorhanden), Versuch den Experimentator während des Tests zu beißen (vorhanden oder nicht vorhanden) und Vokalisation während des Versuchs (vorhanden oder nicht vorhanden). Der genaue Bewertungsschlüssel kann dem Anhang (siehe Abschnitt 8.1.1. und 8.1.2.) entnommen werden.

### 2.7.2. Grip Strength Test

Der Grip Strength Test dient der Ermittlung der Muskelkraft der Vorderbeinmuskulatur bzw. der Kombination von Vorder- und Hinterbeinmuskulatur. Hierbei wird die Stärke des Haltevermögens der Maus auf einem Gitter untersucht. Das Grip-Strength-Meter (Bioseb, France) bestand aus einem Drahtgitter (8 cm x 8 cm) das mit einem isometrischen Kraftmesser verbunden war. Das Tier wurde für diesen Test vorsichtig am Schwanz gehalten und von oben an das Gitter geführt, damit dieses sich zunächst nur mit den Vorderpfoten festhalten konnte. Der Körper wurde, wie in Abbildung 4 exemplarisch vorgeführt, in einer horizontalen Position gehalten und gleichmäßig rückwärts über die komplette Länge des Gitters gezogen. Wenn die Tiere das Gitter los ließen, hatten sie die maximale Griffstärke

erreicht. Die gleiche Prozedur wurde auch mit allen vier Pfoten auf dem Gitter durchgeführt. Sowohl die Messung der Kraft der Vorderbeine als auch aller Beine wurde bei jeder Maus drei Mal wiederholt und anschließend für jedes Tier gemittelt. Diese Werte wurden dann noch für jedes Tier auf das Körpergewicht normiert, um dieses als Einflussgröße ausschließen zu können. Dies ist wichtig, da es bei einigen Tieren zu einer erhöhten Verfettung kam.



**Abbildung 4: Körperhaltung einer Maus bei der Messung der Muskelkraft der Vorderbeine**

### 2.7.3. String Agility

Um die Agilität und die Griffstärke der Versuchstiere zu ermitteln, wurden die Tiere in die Mitte einer gespannten 50 cm langen und 2,5 mm dicke Schnur gehängt. Diese wurde zwischen zwei Säulen mit je einer Plattform in einer Höhe von 30 cm gespannt. Jedes Tier durfte den Faden nur mit den Vorderpfoten greifen und wurde anschließend für 60 s beobachtet (Abb. 5). Mit Hilfe eines Bewertungssystems wurde die Agilität eines jeden Tieres quantifiziert: „0“ wenn sich die Maus nicht für die Versuchsdauer an dem Faden halten konnte, „1“ wenn das Tier für die Versuchsdauer nur an den Vorderpforten hing, „2“ wenn das Tier den Versuch unternahm, sich auf den Faden zu ziehen, „3“ wenn das Tier beide Vorderpfoten und mindestens eine Hinterpfote auf der Schnur hatte, „4“ wenn das Tier alle vier Pfoten am Faden hatte und zusätzlich den Schwanz um die Schnur schlang, und „5“ wenn das Tier eine Plattform erreichte.



**Abbildung 5: Maus bei dem String Agility Test. Hierbei versuchte das Tier sich auf die Schnur zu ziehen und wurde mit 1 bewertet.**

### 2.7.4. Rotarod

Um die lokomotorische Koordination zu untersuchen, wurde das Paradigma des akzelerierenden Rotarods (Rotarod Version 1.2.0. MED Associates Inc., Vermont USA) genutzt. Dieses besteht aus einem 3 cm dicken rotierenden Zylinder. Die Tiere wurden zunächst auf den Zylinder bei der geringsten Geschwindigkeit von 4 Rotationen pro Minute (rpm) gesetzt (Abb.6). Wenn je drei Mäuse auf dem Rotarod saßen, wurde der Durchgang gestartet. Hierbei wurde das Rotarod kontinuierlich von 4 rpm auf 40 rpm innerhalb von fünf Minuten beschleunigt. Die Dauer, welche die Maus auf dem rotierenden Zylinder laufen konnte, wurde gemessen. Hielt sich die Maus an dem Zylinder fest und drehte sich eine Runde auf dem Zylinder passiv mit, so wurde dies ebenfalls als ein Herunterfallen der Maus gewertet und der Versuch bei dieser Zeit gestoppt. Jede Maus musste diesen Versuch 3 Mal absolvieren, wobei zwischen den einzelnen Läufen 10 Minuten Pause lagen. Die drei gemessenen Laufdauern wurden für jede Maus gemittelt und auf das eigene Körpergewicht normiert (Pennanen et al., 2004).

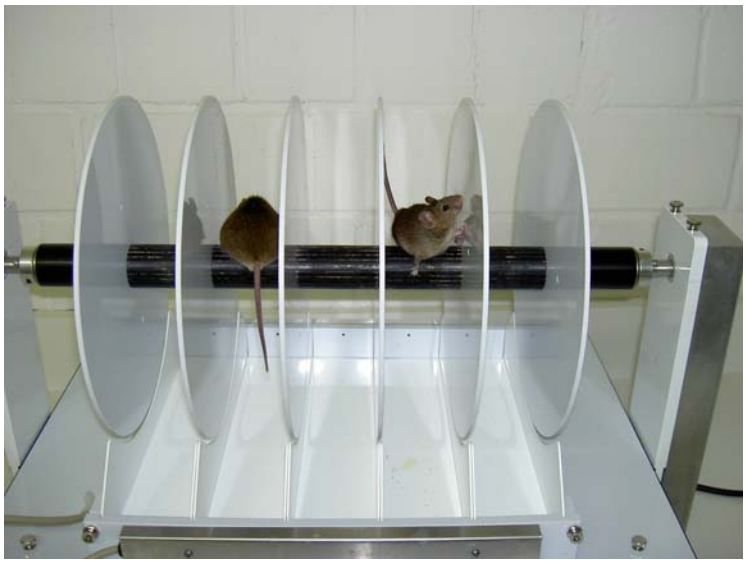


**Abbildung 6: Das akzelerierte Rotarod mit zwei Tieren: Die Mäuse wurden auf den rotierenden Zylinder bei der langsamsten Geschwindigkeit gesetzt und anschließend wurde der Beschleunigungsmodus aktiviert, wobei die Laufdauer der Mäuse auf dem Zylinder aufgezeichnet wird (max. 300 s).**

### 2.7.5. Open Field Test

Mit diesem Versuch wird eine Kombination aus der lokomotorischen Aktivität und des Erkundungs- und Angstverhaltens der Mäuse erfasst.

Dazu wurden die Versuchstiere in eine Ecke einer quadratischen Arena (50 cm Seitenlänge) gesetzt und durften diese für 30 Minuten frei erkunden. Die Arena wurde in eine Randzone (ab dem Rand 8 cm breit), eine Zentrumszone (20 cm x 20 cm) und eine dazwischen liegende Zone unterteilt. Die lokomotorische Aktivität wurde durch die Messung der insgesamt zurückgelegten Distanz und der durchschnittliche Laufgeschwindigkeit erhoben. Um das Angst- und Erkundungsverhalten zu erfassen, wurden folgende Parameter gemessen: Anzahl der Besuche im Zentrum, die Anzahl des Aufstellens auf die Hinterbeine (Rearing) und die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit in der Zentrumszone. Bei der Laufgeschwindigkeit wurde nur in der Zeit gemessen, in welcher die Tiere sich vor- bzw. rückwärts bewegten, wobei dies erst ab einer Geschwindigkeit von 1 cm/s als Fortbewegung zählte. Die Werte der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit eines jeden Tieres wurden für die Berechnung der Laufgeschwindigkeit der Gruppen gemittelt.

### 2.7.6. Y-Labyrinth

Das Hauptziel der Untersuchung der Tiere in dem dreiarmigen Y-Labyrinth war die Bewertung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses mit Hilfe des spontanen Alternationsverhaltens. Bei dieser Apparatur war jeder Arm 40 cm lang, 9 cm breit und 16 cm hoch (Abb. 7). Für dieses Experiment wurden die Versuchstiere jeweils für einen Durchgang am Ende eines Armes in das Y-Labyrinth gesetzt. Von hier aus durften diese das Labyrinth für fünf Minuten frei erkunden.

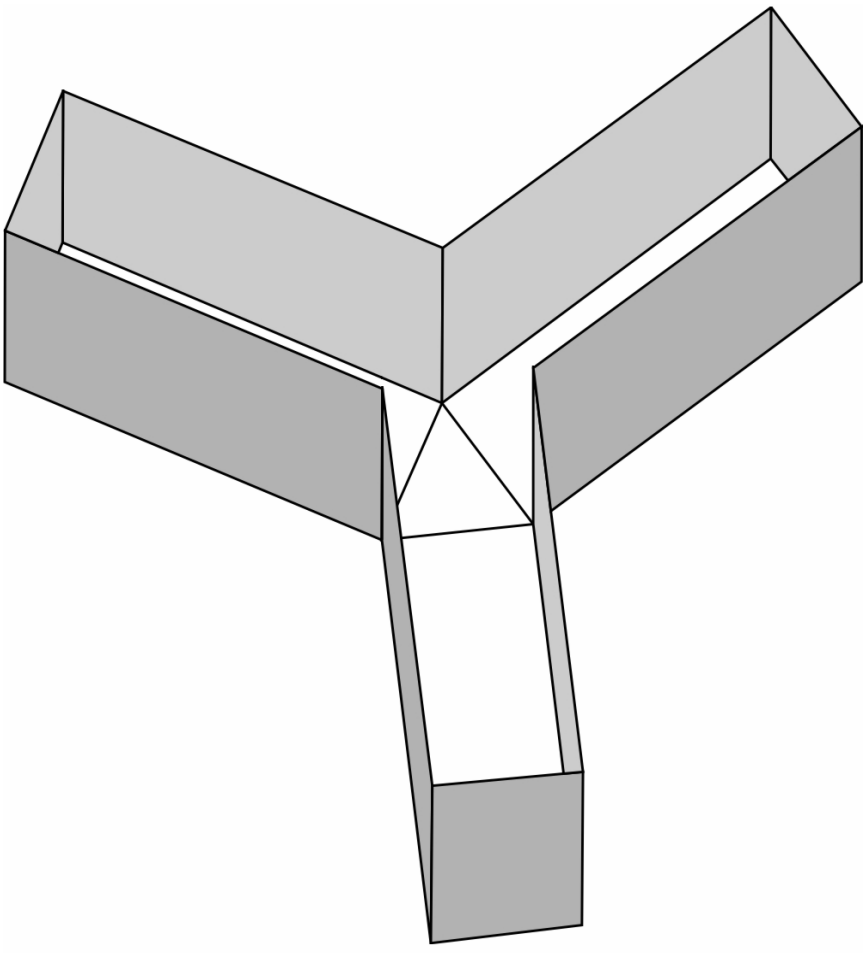


**Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Y-Labyrinths mit drei gleich großen Armen**

Dieser Versuch basiert auf der natürlichen Neigung von Nagern eine neue Umgebung zu erkunden. Dabei bevorzugt das Tier die Erkundung des bisher am wenigsten besuchten Arms. Durch diese Verhaltensweise kommt es zu alternierenden Besuchen der drei Arme. Für die Untersuchung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses wurden die Parameter Gesamtzahl der

Armbesuche und Abfolge der besuchten Arme erfasst. Ein Arm galt als besucht, wenn sich das Tier mit allen vier Beinen in dem Arm befand. Durch die Abfolge der Armbesuche konnte das prozentuale spontane Alternationsverhalten durch den Quotienten der „Anzahl der Armbesuche (die sich von den zwei vorherigen Armen unterschieden)“ und der „Gesamtzahl der Armbesuche – 2“ berechnet werden. Wurde zum Beispiel die Armabfolge C, B, A, B, C, B, A, C von dem Tier abgelaufen, so hat das Tier bei dieser Abfolge insgesamt vier mal drei verschiedene Arme nacheinander besucht (CBA, ABC, CBA, BAC) und insgesamt acht Arme besucht. Die Berechnung des spontanen Alternationsverhaltens für das Tier würde somit 4/(8-2) = 0,67 ergeben. Das Tier würde ein prozentuales spontanes Alternationsverhalten von 67 % zeigen.

Eine Maus mit einem beeinträchtigten Arbeitsgedächtnis kann sich nicht erinnern, welchen Arm sie gerade besucht hatte. Daher kommt es zu einer verminderten spontanen Alternation (Holcomb et al., 1999; Wall and Messier, 2002).

Die neue Umgebung des Labyrinths erzeugt bei den Mäusen Angst, welche durch die Zeit, die die Maus benötigt, um den Startarm zu verlassen, gemessen wurde. Als dritter Aspekt wurde die motorische Aktivität durch die Messung der gelaufenen Distanz und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit der Maus bestimmt.

Somit wurden in diesem Versuch die fünf Parameter spontanes Alternationsverhaltens, Gesamtzahl der Armeinläufe, Dauer bis zum Verlassen des Startarms, sowie Laufdistanz und durchschnittliche Laufgeschwindigkeit gemessen.

### 2.7.7. Elevated Plus Labyrinth

Das Elevated Plus Labyrinth ist ein klassisches Paradigma zur Untersuchung von Angstverhalten bei Nagern. Hierbei befinden sich die Tiere in dem Zwiespalt, ihrem Trieb der Erkundung nachzugeben, wobei sie dafür die Sicherheit der geschlossenen Arme verlassen müssten. Wie in Abbildung 8 schematisch dargestellt, bestand das Elevated Plus Labyrinth aus vier gleich großen Armen (30 cm lang, 5 cm breit) die über ein Zentrum (5 x 5 cm) miteinander verbunden waren. Zwei gegenüberliegende Arme waren offen, die anderen beiden gegenüberliegenden Arme waren von Seitenwänden (Höhe 16 cm) umschlossen. Zu Beginn des Tests wurden die Tiere mit dem Kopf in Richtung eines geschlossenen Armes in das Zentrum des Elevated Plus Labyrinth gesetzt und durften von hier ausgehend das Labyrinth

für fünf Minuten frei erkunden. Zur Erfassung des Angstverhaltens wurden die Aufenthaltsdauern in den offenen und geschlossenen Armen gemessen.

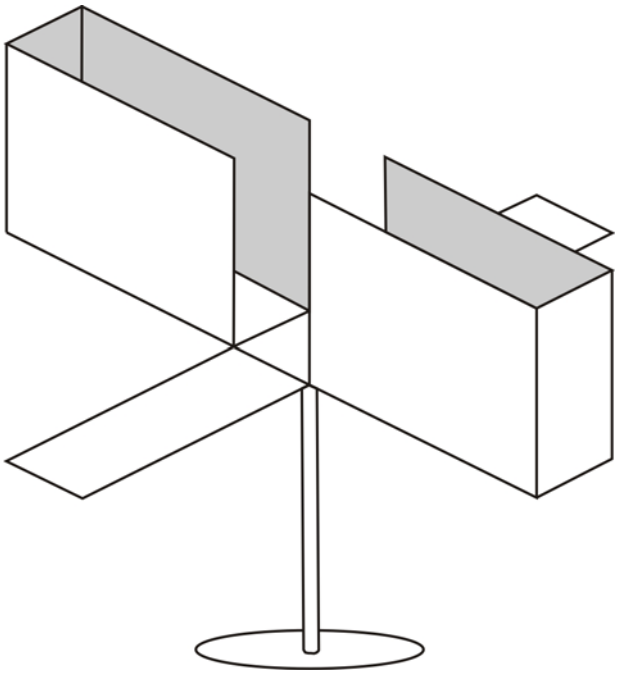


**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Elevated Plus Labyrinths**

### 2.7.8. Morris Water Maze

Mit dem Morris Water Maze (Morris et al., 1982) wird das Lernverhalten und die räumliche Orientierung der Tiere untersucht. Hierbei sollen die Mäuse lernen, eine für sie unsichtbare Plattform unter der Wasseroberfläche in einem Schwimmbecken zu finden, anschließend auf diese Plattform zu klettern, um dann aus dem Becken herausgeholt zu werden.
Dafür wurden die Mäuse in einem Wasser gefüllten (45 cm tief), gleichmäßig beheizten (22°C ± 1°C) runden Becken (Fa. Biobserve, Bonn, Germany) mit einem Durchmesser von 120 cm trainiert. Das Wasser wurde mit zwei Liter handelsüblicher Vollmilch eingefärbt. Um das Wasserbecken wurden einfarbige Vorhänge mit verschiedenen optischen Landmarken zur räumlichen Orientierung angebracht. An jeder Seite des Water Maze war je eine Landmarke angebracht, deren Position sich während des Versuches nicht änderte. Als Landmarken dienten ein Dreieck, ein Quadrat, ein Kariertes Rechteck und ein schraffierter Pfeil, die alle einen Mindestdurchmesser von 50 cm hatten. Die runde Zielplattform befand sich bei diesem Versuch immer 0,5 cm unterhalb der Wasseroberfläche und mit ihrem Mittelpunkt 35 cm vom

Beckenrand entfernt. Um eine optische Orientierung der Maus vor Beginn des Versuchs zu vermeiden, wurde beim Transport in das Versuchsareal der Kopf der Maus in die Armbeuge des Experimentators gehalten.

Es wurden vor dem Start des Versuchs vier symmetrisch angeordnete Startpunkte am Beckenrand, die jeweils in der Mitte eines Quadranten lagen, festgelegt, von welchen aus die Mäuse wie in Abb. 9 aufgeführt in einer festgelegten Reihenfolge die Versuchsläufe absolvierten. Die Tiere durften im Wasserbecken maximal 60 s oder bis zum Erreichen der Zielplattform schwimmen.

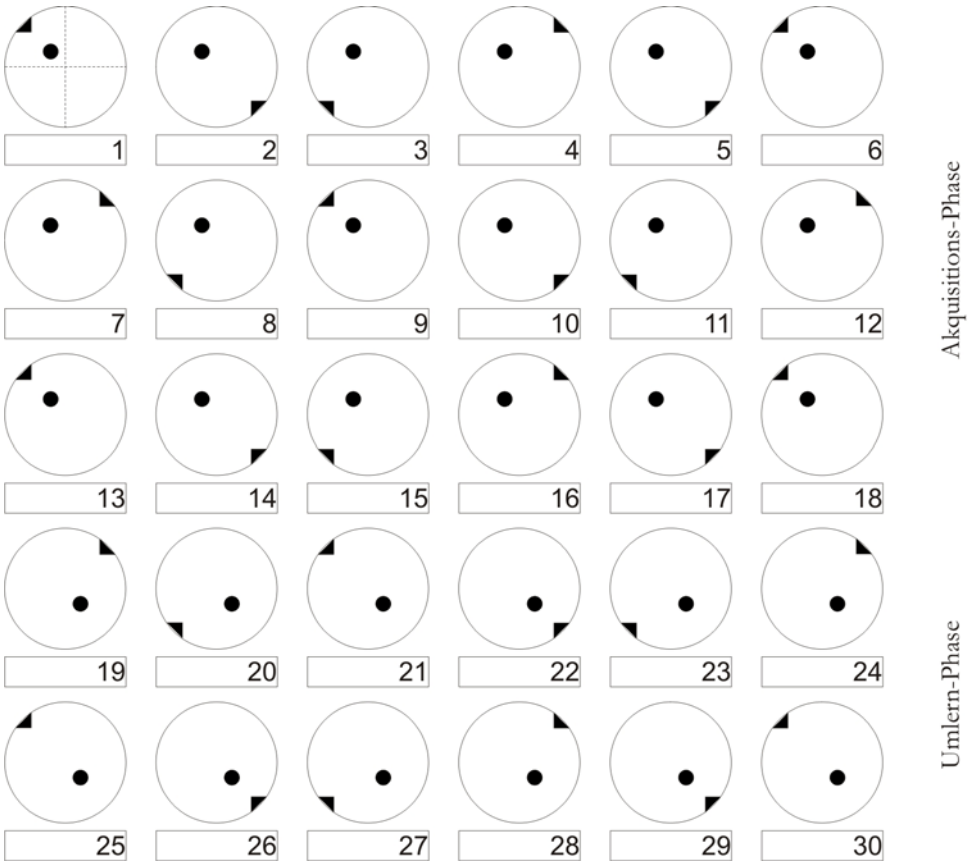



**Abbildung 9: Versuchsabfolge des Morris Water Maze Tests. Die Dreiecke symbolisieren die Startpunkte bei den einzelnen Versuchen. Die Kreise zeigen die Position der Zielplattform im Schwimmbecken an. Die gestrichelten Linien bei der ersten Startposition zeigen exemplarisch für alle Versuche die Einteilung des Schwimmbeckens in die Quadranten an.**

Als Erreichen der Zielplattform wurde das Besteigen dieser mit allen vier Pfoten gewertet. Wurde die Plattform nicht innerhalb der 60 s erreicht, so wurde die Maus vorsichtig zu der Plattform geleitet, damit diese dann hinaufklettern und für 15 s dort verbleiben konnte.

Nach Beendigung eines Durchgangs wurde die Maus zum Abtrocknen des Bauches auf ein in der Hand befindliches Küchentuch gesetzt, in ihren Käfig gegeben und unter eine Wärmelampe gestellt.
Der Test wurde in zwei Phasen unterteilt, eine Akquisitions-Phase (18 Durchgänge / sechs pro Tag) gefolgt von einer Umlernphase, in der die Plattform in den gegenüberliegenden Quadranten verrückt wurde (12 Durchgänge / sechs pro Tag). Je zwei Durchgänge wurden direkt nacheinander durchgeführt und zu einem Block zusammengefasst. Die Pause zwischen 2 Blöcken war zwischen 30 und 50 min lang.
Als so genannter „Probe-Trail" wurde der 19. Durchgang ausgewertet, da bei diesem Durchgang das erste Mal die Plattformposition verändert wurde (siehe Abb. 9). Das Ziel dieses Laufs ist die Überprüfung der Gedächtnisfunktion der Tiere. Daher wurden bei der Suche der neuen Plattformposition die prozentualen Aufenthaltsdauern der Tiere in den verschiedenen Quadranten berechnet und miteinander verglichen. Die Aufenthaltsdauer in dem neuen Zielquadranten wurde nicht bestimmt, da dort die Plattform stand.

### 2.7.9. Video tracking und Datenanalyse

Alle Versuche in den verschiedenen Arenen und Labyrinthen wurden mit dem elektronischen Tracking System Viewer 2 (Fa. Biobserve GmbH, Bonn, Germany) mit einer Bildfrequenz von 15 Hz und einer Auflösung von 720 x 576 Pixel aufgenommen und mit der integrierten Bearbeitungssoftware analysiert.
Die statistische Analyse der Daten wurde mit SigmaStat 3.1 und SigmaPlot 9.0 (SYSTAT Software, Inc.) angefertigt. Hierbei wurde zum Vergleich der verschiedenen Genotypen einer Altersklasse bei normalverteilten Datensätzen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA), bei nicht normalverteilten Datensätzen eine einfaktorielle Kruskal-Wallis ANOVA (K-W ANOVA) durchgeführt. Signifikante Effekte wurden hierbei post hoc bei der ANOVA mit dem Bonferroni t-Test bzw. bei der K-W ANONVA mit der Dunn's Methode zum paarweisen Vergleich analysiert. Zum Vergleichen des gleichen Genotyps in den zwei verschiedenen Altersklassen, wurde bei normalverteilten Daten ein t-Test, bei nicht normalverteilten Daten ein Mann-Whitney Rangsummentest (RST) durchgeführt.
Die Datensätze zur Erfassung der Schwimmdauer und -strecke des Morris Water Maze wurden wie folgt ausgewertet. Die Lernkurven der Akquisitionsphase (siehe Ergebnisse 3.6) wurden in eine Lernphase (Block 1-5) und eine Plateauphase (Block 6-9) unterteilt. Die

Lernphasen der verschiedenen Gruppen wurden mittels einer linearen Regression angenähert und mit Hilfe der Regressionskoeffizienten paarweise verglichen (Sachs, 1999). Mit der anschließenden Bonferroni-Korrektur (Lienert et al., 1982) wurden die signifikante Unterschiede bestimmt. Zum Vergleichen des gleichen Genotyps in den zwei verschiedenen Altersklassen, wurde je ein Regressionskoeffizienten-Vergleich durchgeführt.
Alle Daten wurden mit Mittelwert ± Standardabweichung, bzw. mit Median dargestellt und mit einem Signifikanzniveau von * $p<0,05$; ** $p<0,01$ oder *** $p<0,001$ ausgewiesen.

## 2.8. Histologische Untersuchungen des Musculus rectus femoris

### 2.8.1. Präparation des Musculus rectus femoris

Nach Beendigung der Versuche wurden die Tiere mittels einer Zervikaldislokation getötet. Den Tieren wurde der gesamte Musculus quadriceps des rechten Hinterbeins entnommen, auf ein Stückchen Papier gelegt und in ein Becherglas mit 2-Methylbuthan (Merck) gegeben, welches bereits 20 min vorher mit Trockeneis gekühlt wurde.
Nach 2 min wurden die Muskeln wieder mit einer kalten Pinzette aus dem Becherglas herausgenommen und zum Verdampfen des restlichen 2-Methylbuthans auf Trockeneis gegeben, anschließend wurden sie in einem vorgekühlten Gefäß bei -80°C aufbewahrt.
Die Muskeln wurden dann in einen auf -21°C gekühltem Cryostaten (Fa. Microm, Modell: HM 505 E) gegeben, damit diese sich der Schneidetemperatur angleichen konnten. Daraufhin wurden sie mittels eines Tropfens TissueTek® (Fa. Sakura, Zoeterwoude, NL) auf dem Gewebehalter fixiert, in 10 µm dicke Querschnitte geschnitten und auf SuperFrost®Plus Objektträger (Fa. Menzel GmbH &Co KG) gegeben. Auf jeden Objektträger wurden vier Schnitte eines Muskels aufgezogen. Die fertigen Objektträger wurden bis zum Anfertigen der verschiedenen Färbungen bei -80°C aufbewahrt.

### 2.8.2. Hämatoxylin & Eosin (HE) Färbung der Muskelschnitte

Nach der Entnahme der Schnitte aus dem Gefrierschrank (Temperatur -80°C) wurden die Objektträger zum Trockenen unter den Abzug gelegt. Je Muskel wurde ein Objektträger nach einem Standardprotokoll gefärbt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst für 10 min in einer wässrigen 4% Formalin-Lösung (37%-ig Formalin; Merck) fixiert. Nach kurzem Spülen in Leitungswasser wurden die Objektträger für zwei min in Aqua dest. überführt und daraufhin für die Kernfärbung fünf Minuten in frisch filtriertem Hämalaun (Mayers Hämalaun; Merck) inkubiert. Danach wurden die Schnitte kurz in 0,75%igem Salzsäure-Alkohol (Merck) differenziert und anschließend für zehn Minuten in fließendem Leitungswasser gebläut. Nach erneutem Spülen in Aqua dest. erfolgte die Zytoplasmafärbung für 15 min in Eosin (Eosin G-Lösung 0,5% wässrig; Roth). Nach weiterem Spülen der Schnitte in Aqua dest. wurden diese in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30 s in 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, 2x100% Ethanol, je 10 min 2x100% Xylol (Merck)) entwässert und mit Entellan (Merck) eingebettet.

### 2.8.3. Gomori-Trichrom Färbung der Muskelschnitte

Zur Untersuchung feinerer Einzelheiten, insbesondere mitochondrialer Veränderungen, wurde eine Trichromfärbung nach Gomori durchgeführt. Nach vollständigem Auftauen und Trocknen der Muskelschnitte wurden die Objektträger für fünf Minuten in frisch filtriertes Papanicolaous (Papanicolaous Lösung 1a Harris Hämatoxylinlösung, Merck) gebracht. Die Objektträger wurden für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser und anschließend kurz in Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden diese für drei Stunden in die Gomori-Färbelösung (0,3 g Fast-Green FCF; Merck, 0,6 g Chromotrope 2R; SIGMA, 0,8 g Wolframatophosphorsäure-Hydrat; Merck, 1 ml 100% Essigsäure in 100 ml Aqua dest.) überführt und danach mit Aqua dest. abgespült. Sobald im anschließenden Bad in einer 0,5 %-igen Essigsäure keine „Farbwolken“ von den Schnitten abgingen, wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 30 s in 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, 2 x 100% Ethanol, je 10 min 2 x 100% Xylol (Merck)) entwässert und mit Entellan (Merck) eingebettet.

### 2.8.4. Antikörper-Färbung der Muskelschnitte

Zur Beurteilung der Verteilung der Muskelfasertypen, wurden die Muskelschnitte aller Versuchsgruppen mit Hilfe von verschiedenen spezifischen Antikörpern gefärbt.
Aus der Zuordnung von metabolischen Merkmalen zur Charakteristik resultieren drei Fasertypen: FG oder fast twitch glycolytic fiber, FOG oder fast twitch oxidative-glycolytic fiber und SO oder slow twitch oxidative fiber. Die langsam kontrahierenden Fasern werden auch als Typ I-Faser oder slow twitch high oxidative low glycolytic fibers bezeichnet. Die Typ I-Fasern haben eine geringe ATPase-Aktivität, die Typ II-Fasern eine hohe. Die schnell kontrahierenden Fasern werden in Typ IIA-Fasern oder fast twitch oxidative-glycolytic fibers und Typ IIB-Fasern oder fast twitch high glycolytic low oxidative fibers weiter unterteilt. In jeder Muskelfaser können Isoformen der Myosin Heavy Chain (MHC) histochemisch nachgewiesen werden, wobei man die Fasertypen MHC I, MHC IIa und MHC IIb unterscheiden kann.
Die Objektträger wurden aufgetaut und vollständig getrocknet. Die Muskelschnitte wurden daraufhin mit 5%igem Ziegenserum (Normal Goat Serum, Serotec) für zwei Stunden blockiert. Nach einem fünfminütigen Waschschritt in Phosphat-Puffer wurden die aus Hybridoma-Zelllinien (DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) gewonnenen monoklonalen Erstantikörper (Tab. 10) direkt auf die Schnitte gegeben und über Nacht bei 4°C unter langsamem Schütteln inkubiert.

**Tabelle 10: Erstantikörper für die verschiedenen Muskelfasertypen.**

| Muskelfasertyp | Antikörper aus |
|---|---|
| MHC I | BA-F8 (IgG2b) |
| MHC IIa | SC-71(IgG1) |
| MHC IIb | BF-F3 (IgM) |

Am nächsten Tag wurden alle Schnitte drei Mal für fünf Minuten in Phosphat-Puffer gewaschen. Danach wurden diese mit den in Tabelle 11 aufgeführten fluoreszierenden Zweitantikörpern (Jackson Immuno Research) und Verdünnungen gemeinsam für weitere zwei Stunden inkubiert. Als Zweitantikörper wurden IgG2b gegen den Erstantikörper BA-F8, IgG1 gegen den Erstantikörper SC-71 und IgM gegen den Erstantikörper BF-F3 genutzt. Diese Zweitantikörper wurden vor dem Gebrauch nach Protokoll mit dem DyLight Antibody

Labeling Kits 549, 405 und 488 (Pierce) behandelt, so dass diese anschließend fluoreszierten. Nach der Inkubation mit den Zweitantikörpern wurden die Objektträger erneut drei Mal für 5-10 Minuten in Phosphat-Puffer gewaschen, bevor die Schnitte mit GVA-Mount (Zymed) eingebettet wurden. Bei der Betrachtung mit einem Fluoreszenzmikroskops konnte man die drei verschiedenen Fasertypen deutlich unterscheiden, da die Muskelfasern des Typs I rot, die des Typs IIa blau und die des Typs IIb grün fluoreszierten.

**Tabelle 11: Floureszierende Zweitantikörper.**

| Antikörper | gelabelt mit DyLight Kit | Verdünnung |
|---|---|---|
| IgG2b | 549 | 1:500 |
| IgG1 | 405 | 1:300 |
| IgM | 488 | 1:500 |

### 2.8.5. Befundung der Muskelschnitte

Die Schnitte der verschiedenen Färbungen wurden mittels eines Mikroskops (Fa. Olympus, Modell BX51TF) untersucht und fotografiert (Fa. Olympus, Soft Imaging System CC12) und ein Befund erstellt (Fa. Olympus, cell$^{F}$, Version 2.5). Bei der Befundung der Muskelschnitte wurden die Kriterien der Form und Größe der Muskelfaser (entspricht einer Muskelzelle mit mehreren Zellkernen), die Beschaffenheit der Septen, das Aussehen und die Stellung des Zellkerns und die Verteilung der Fasertypen betrachtet. Ein gesunder Muskel hat polygonale und dicht gepackte Muskelfasern. Die Septen sind gut erkennbar und die Zellkerne liegen spindelförmig dicht unter der Zellmembran der Muskelzelle (Sarkolemm). Die verschiedenen Fasertypen sind mehr oder weniger schachbrettartig im Muskel verteilt. Weist dagegen ein Muskel eckig elongierte Muskelfasern auf, so ist das meist ein Zeichen für eine Schädigung des innervierenden Motoneurons (Frey et al., 2000; Fischer and Glass, 2007) und wird als neurogene Veränderung bezeichnet. Je nach Erkrankung treten diese neurogen veränderten Muskelzellen vereinzelt oder in einer Gruppenatrophie auf (Dubowitz and Sewry, 2007). Zweiteres kommt durch eine Degeneration des innervierenden Motoneurons zustande. Bei neurogen veränderten Muskeln kann es auch zu einer Gruppierung der Fasertypen kommen. Kompensatorisch können auch hypertrophierte Muskelzellen mit einem vergrößerten Kaliber dazwischen liegen (Dubowitz and Sewry, 2007). Bei myogen veränderten Muskeln zeigen sich

kleine abgerundete Muskelzellen, die oft einen mittelständigen Zellkern zeigen. Mit fortschreitender Erkrankung lagern sich an der Stelle der vorherigen Muskelfasern Bindegewebe ein.

### 2.8.6. Quantifizierung der Muskelfaserdurchmesser

Die bei 20facher Vergrößerung aufgenommenen Bilder der H&E gefärbten Muskelschnitte wurden morphometrisch ausgewertet. Um den Durchmesser einer Zelle zu bestimmen, wurde der größte Querschnitt, der orthogonal auf dem absolut größten Querschnitt steht, gemessen (siehe Abb. 10). Um eine genaue Messung zu erhalten, wurden mindestens 100 Fasern je Tier vermessen (Dubowitz and Sewry, 2007).

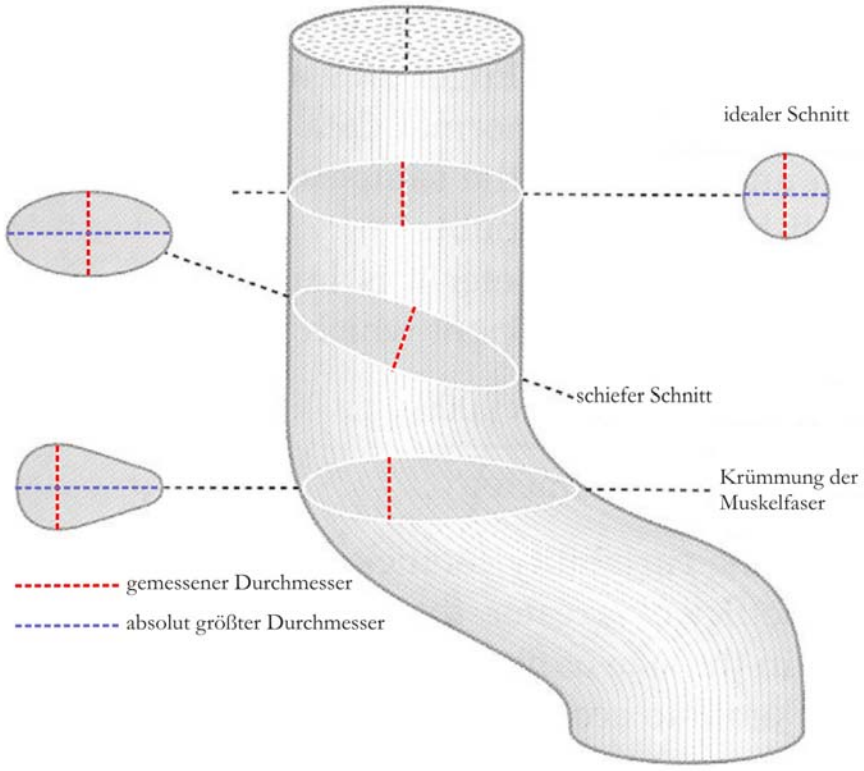



**Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Muskelfaser. Dabei ist mit der roten Linie der gemessene Querschnitt und der blauen Linie der absolut größte Querschnitt der Muskelfaser markiert. Als Beispiele für die verschiedenen Orientierungsmöglichkeiten, sind ein idealer und ein schiefer Schnitt, sowie ein Schnitt einer gekrümmten Muskelfaser eingezeichnet. (verändert nach Dubowitz and Sewry, 2007)**

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Allgemeiner Gesundheitszustand

Der allgemeine Gesundheitszustand wurde mittels des modifizierten SHIRPA Tests ermittelt, wobei in der Alterklasse drei Monate 15 WT, 12 Cra1, 13 Cra1/SOD1, 15 SOD1 und 15 P301L Tiere untersucht wurden. Bei den zwölf Monate alten Tieren waren es 13 WT, 13 Cra1 und 15 P301L Mäuse. Dieser Test wurde mit Hilfe einer numerischen Beurteilung von verschiedenen Parametern durchgeführt. Dabei haben sich Unterschiede in den vier Parametern Körpergewicht, Beinstellung, Aufstellreflex und spontane Aktivität gezeigt.

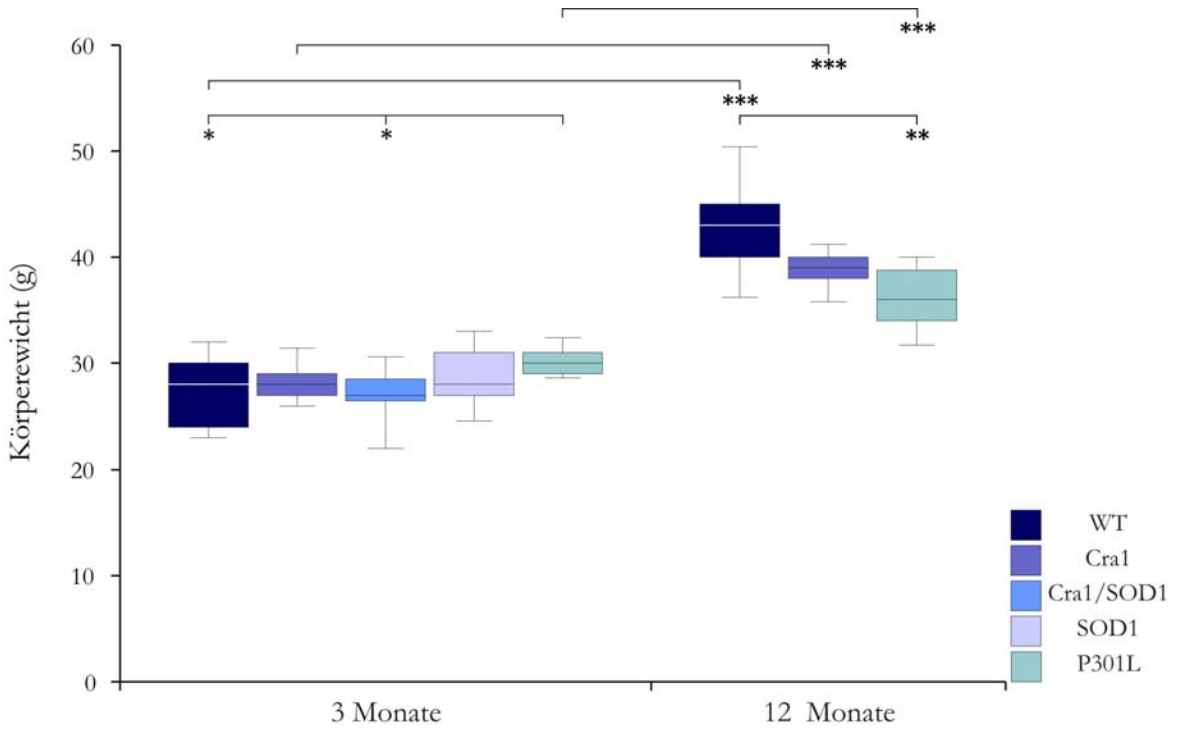



**Abbildung 11: Körpergewichte der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0,05), ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet**

Die Körpergewichte der verschiedenen Genotypen in den zwei Altersklassen sind in Abbildung 11 mit Hilfe von Boxplots dargestellt. Bei Betrachtung der drei Monate alten

Mäuse ergaben sich signifikante Unterschiede (p=0,006; K-W ANOVA) zwischen den Gruppen. Beim paarweisen Vergleich wogen die P301L Mäuse mit durchschnittlich 30 g signifikant mehr als die WT Tiere mit 28 g (p<0,05) und die Cra1/SOD1 Tiere mit 27 g (p<0,05). Dahingegen war kein signifikanter Unterschied zwischen den P301L Tieren im Vergleich zu den Cra1 und SOD1 Tieren vorhanden.

Bei der Untersuchung der zwölf Monate alten Tiere ergab sich ein Unterschied mit p<0,001 zwischen den Gruppen. Hierbei wogen die WT Tiere mit 43 g signifikant mehr als die P301L Tiere (36 g; p<0,05). Die Cra1 Tiere unterschieden sich bezüglich des Gewichts mit 39 g nicht von den WT und P301L Tieren.
Bei dem Vergleich der Tiere des gleichen Genotyps der zwei Altersklassen zeigte sich, dass bei allen Genotypen, die im Alter von drei und zwölf Monaten getestet wurden, eine signifikante Zunahme (p<0,001; RST) des Gewichts zu verzeichnen war.

**Tabelle 12: Ergebnisse des modifizierten SHIRPA Tests bezüglich der Parameter Beinstellung, Aufstellreflex und spontane Aktivität. Die Werte sind als Mediane dargestellt, wobei die 25 % und 75 % Quartile in den eckigen Klammern angegeben sind. Beim Vergleich der Genotypen in einer Altersklasse mit K-W ANOVA: * p<0,05 vs. Cra1; # p<0,05 vs. Cra1/SOD1. Beim Vergleich der Altergruppen mit dem gleichen Genotyp mit RST: †: p<0,05 vs. Cra1 (3 Monate)**

| **3 Monate** | **Beinstellung** | **Aufstellreflex** | **spontane Aktivität** |
|---|---|---|---|
| WT | 0 [0-0] * # | 0 [0-0] * # | 15 [8,25-17,75] |
| Cra1 | 1 [1-1] | 1 [0,5-1] | 14,5 [11-17] |
| Cra1/SOD1 | 1 [1-1] | 1 [1-1] | 16 [9,25-17,25] |
| SOD1 | 0 [0-0] * # | 0 [0-0,75] | 13 [10,25-17,5] |
| P301L | 0 [0-0] * # | 0 [0-0] * # | 16 [9,5-19,75] |
| **12 Monate** | | | |
| WT | 0 [0-0] * | 0 [0-0] * | 15 [13,75-16] * |
| Cra1 | 1 [1-1] | 1 [1-1] | 10 [7,75-10,5] † |
| P301L | 0 [0-0] * | 0 [0-0] * | 12 [8-14,75] |

Der nächste Parameter, in welchem sich Unterschiede zeigten, war die Beinstellung. Die Mediane und dazugehörigen Quartile sind in Tabelle 12 aufgelistet. Sowohl bei der Untersuchung der drei Monate als auch der zwölf Monate alten Mäuse wurden signifikante Unterschiede bezüglich des Genotyps festgestellt (je p<0,001; K-W ANOVA). Dabei fiel auf, dass die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere, wenn man sie am Schwanz anhob, die Hinterbeine an

den Körper zogen und nicht wie die WT Tiere ihre Hinterbeine zum Balancieren benutzten (Abb. 12). Daher wurden diese beiden Gruppen mit 1 bewertet. Sie unterschieden sich signifikant von den anderen Gruppen in den jeweiligen Altersklassen, die mit 0 bewertet wurden. (je $p<0,05$). Beim Vergleich des gleichen Genotyps in den beiden Altersklassen zeigten sich keine Unterschiede.

Beim Aufstellreflex zeigten alle Tiere ein ähnliches Verhalten auf, wobei dieser in einer engen Plexiglasröhre getestet wurde. Dabei konnten wieder in beiden Altersklassen signifikante Unterschiede bezüglich des Genotyps festgestellt werden (je $p<0,001$; K-W ANOVA). Bei den drei Monate alten Mäusen hatten die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere einen verzögerten Aufstellreflex und wurden überwiegend mit 1 bewertet. Da die WT und P301L Mäuse hingegen keine Schwierigkeiten bei diesem Versuch zeigten und ausschließlich mit 0 bewertet wurden, unterschieden sich diese Gruppen signifikant voneinander (je $p<0,05$). Die SOD1 Tiere zeigten ein gemischtes Verhalten, wurden durchschnittlich mit 0 bewertet, da allerdings einige Tiere leichte Probleme aufwiesen, zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zu den Cra1 und Cra1/SOD1 Tieren. Beim Vergleich des gleichen Genotyps in den beiden Altersklassen zeigten sich keine Unterschiede.



**Abbildung 12: Körperposition einer Cra1 (links) und WT Maus (rechts)**

Bei dem Parameter „spontane Aktivität“ wurden die Eintritte in auf dem Boden markierte Quadrate (= Besuche) innerhalb von 30 Sekunden gezählt. In der Altersklasse der drei Monate alten Tiere wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. In der Altersklasse der zwölf

Monate alten Tiere konnte hingegen bei der K-W ANOVA ein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p<0,001$). Die Cra1 Tiere überquerten mit durchschnittlich 10 Besuchen signifikant weniger Quadrate als die WT Tiere mit 15 Besuchen ($p<0,05$). Die P301L Tiere lagen mit durchschnittlich 12,5 Besuchen zwischen den WT und Cra1 Tieren.
Bei dem Vergleich der Cra1 Tiere in den beiden Altersklassen durchquerten die jungen Tiere signifikant öfter die Quadrate als die zwölf Monate alten Tiere ($p<0,05$).

## 3.2. Agilität und Muskelkraftmessung

Die motorische Agilität und Griffstärke wurden mittels des String agility Tests ermittelt. Hierzu wurden die Versuchstiere an den Vorderbeinen an eine gespannte Schnur gehängt und die Fähigkeit, sich auf die Schnur zu ziehen, mittels einer numerischen Bewertung festgestellt.
Die Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse dieses Tests in Boxplots.
Bei der Untersuchung der drei Monate alten Tiere ergab sich ein signifikanter Unterschied innerhalb dieser Altersklasse ($p<0,001$; K-W ANOVA). Hierbei war deutlich erkennbar, dass die Cra1 Tiere ($N=12$) mit einer durchschnittlichen Bewertung von 2 die schwächste Leistung erbrachten. Diese Tiere unterschieden sich signifikant von der WT (4; $N=14$; $p<0,001$), SOD1 (4; $N=15$; $p<0,001$) und P301L Gruppe (5; $N=15$; $p<0,001$). Die doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Tiere zeigten in diesem Versuch im Vergleich zu den gleichaltrigen Gruppen keine signifikante Veränderung der Agilität.
Bei den zwölf Monate alten Tieren wurde ein signifikanter Unterschied bezüglich des Genotyps festgestellt ($p<0,001$; K-W ANOVA). Die Cra1 Tiere ($N=13$) konnten sich nicht für 60 Sekunden an dem Strang festhalten und wurden daher mit einer Bewertung von 0 geführt. Daher sind sowohl die WT Tiere ($N=12$) mit einer durchschnittlichen Bewertung von 4 als auch die P301L Tiere ($N=14$) mit einem Wert von durchschnittlich 5 signifikant (je $p<0,001$) agiler als die Cra1 Tiere.

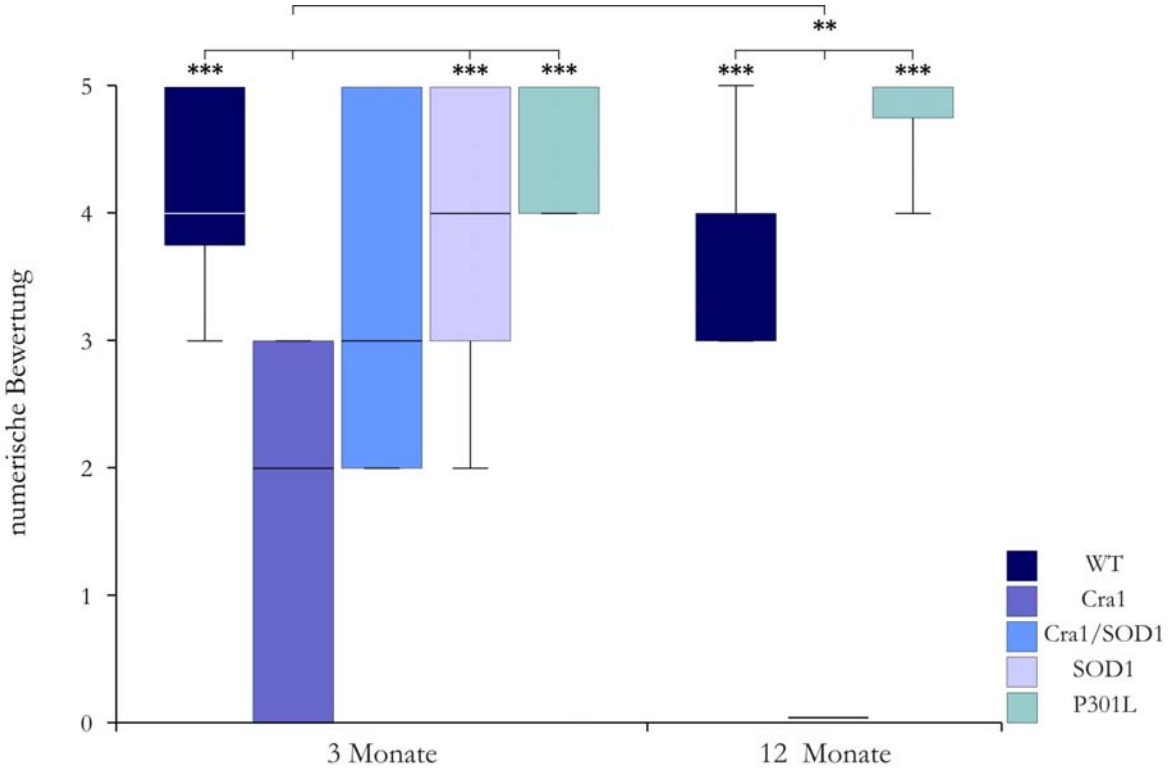



**Abbildung 13: Bewertung des String Agility Tests der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Beim Vergleich der Tiere gleichen Genotyps in den zwei Altersklassen fiel auf, dass sich die Cra1 Tiere mit zunehmendem Alter signifikant (p<0,01; RST) verschlechterten.

Zum Erfassen der Muskelstärke der Tiere wurde die Kraft der Vorderbeine mit Hilfe des Grip Strength Meters gemessen. Um das Gewicht der Tiere als eine Einflussgröße auszuschließen, wurden zunächst die gemessenen Kraftwerte der Vorderbeine bzw. aller Beine auf das Gewicht normiert und in Boxplots (Abb.14) aufgetragen. Die Normierung hatte den Zweck, dass die erhöhte Verfettung mancher Tiere die Ergebnisse nicht beeinträchtigten sollten.

Der Vergleich der drei Monate alten Tiere ergab einen statistisch signifikanten Unterschied mit p<0,001 (K-W ANOVA). Die WT Tiere (N=15) wiesen mit einem Wert von 3,8 die größte Kraft auf. Somit hatten diese Tiere signifikant mehr Kraft als die Cra1 (2,6; N=12; p<0,001), Cra1/SOD1 (2,3; N=13; p<0,001) und P301L Tiere (2,7; N=15; p<0,001) in dieser Altersklasse. Dahingegen zeigten die SOD1 Tiere (3,3; N=14) keine signifikanten Unterschiede zu den anderen vier Gruppen.

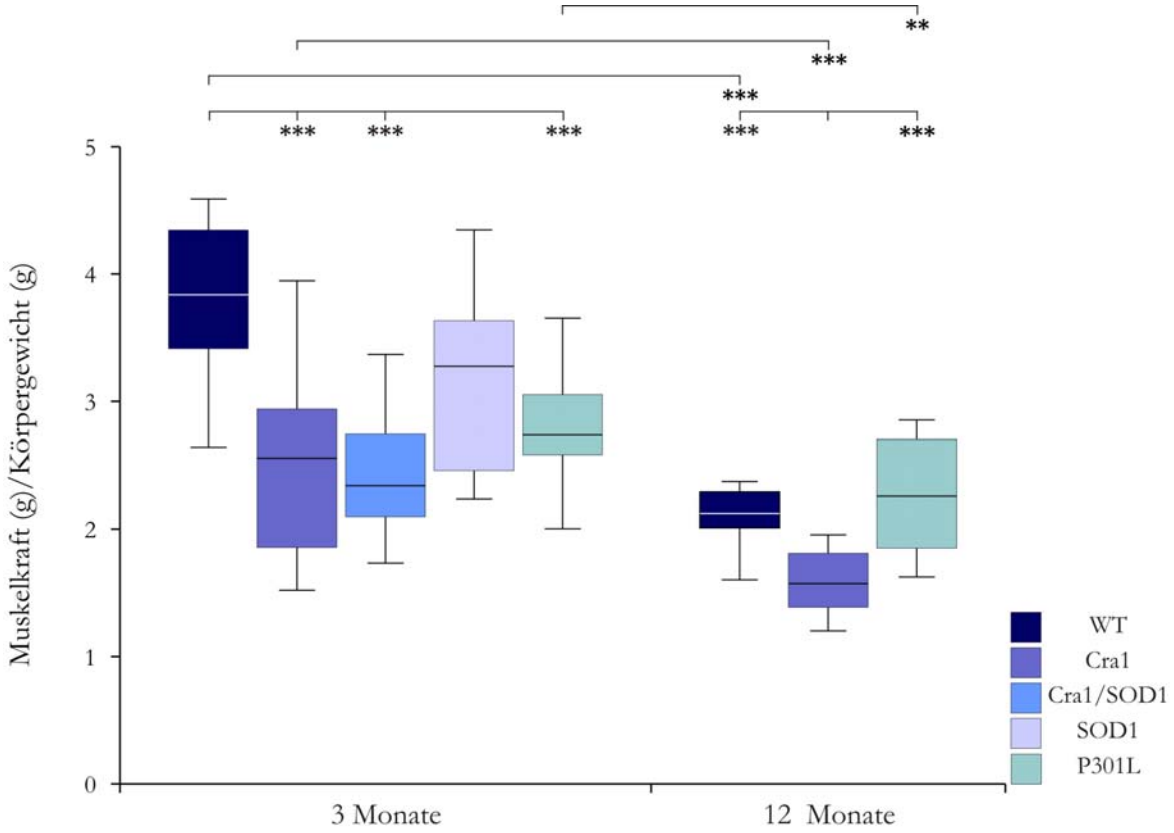



**Abbildung 14: Muskelkraft der Vorderbeine der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Die Werte sind der Quotient aus der Muskelkraft und dem Körpergewicht. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Bei Betrachtung der Muskelstärke der verschiedenen Gruppen im Alter von zwölf Monaten konnte festgestellt werden, dass Cra1 Tiere (1,6; N=13) im Vergleich zu WT (2,1; N=13; p<0,001) und P301L Tieren (2,3; N=15; p<0,001) signifikant weniger Kraft in den Vorderbeinen hatten.

Betrachtete man die Entwicklung im Alter, so nahm die Kraft bei allen drei untersuchten Genotypen signifikant ab (p<0,001; RST).

Die Muskelstärke aller vier Beine der Tiere ergab ein ähnliches Bild wie bei den Messungen der Vorderbeine allein. In den zugehörigen Boxplots in Abb. 15 erkennt man, dass hier wiederum bei den drei Monate alten Mäusen die WT Tiere mit einem Wert von 7,1 die größte Muskelkraft im Vergleich zu den Cra1 (5,2; p<0,001), Cra1/SOD1 (5,0; p<0,001) und P301L Tieren (5,2; p<0,001) besaßen. Die SOD1 Tiere mit einem Wert von 6,3 wiesen im Vergleich zu den WT Tieren keinen Unterschied auf. Die Cra1/SOD1 Tiere hatten die geringste Muskelkraft und waren damit nicht nur im Vergleich zu den WT Tieren sondern auch zu den SOD1 Tieren signifikant schwächer (p<0,001).

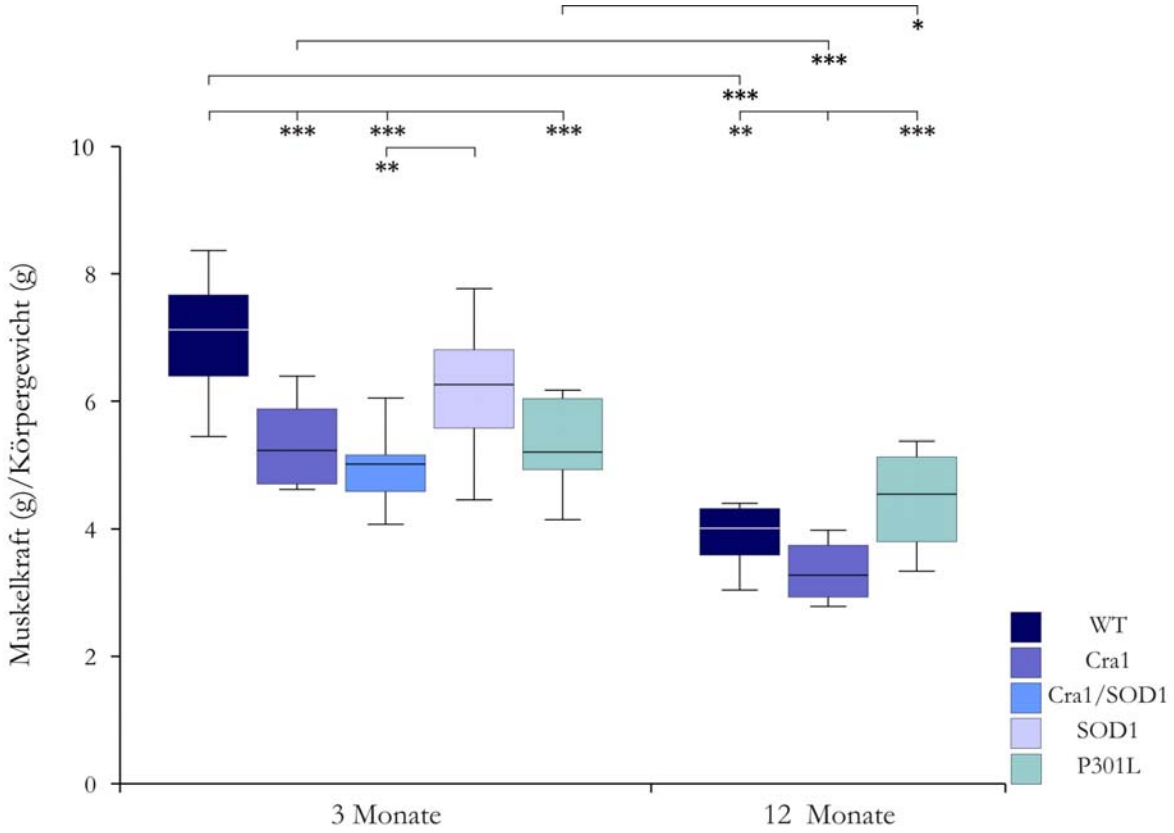



**Abbildung 15: Muskelkraft aller Beine bei den verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Die Werte sind der Quotient aus der Muskelkraft und dem Körpergewicht. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0,05), ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Bei Betrachtung der Tiere im Alter von zwölf Monaten waren die Cra1 Tiere (3,3), wie auch schon bei den Messungen der Vorderbeine, am schwächsten und somit sowohl zu den WT mit einem Wert von 4,0 ($p<0,01$) als auch zu den P301L Tieren (4,5; $p<0,001$) signifikant verschieden.

Genau wie bei den Messungen der Kraft in den Vorderbeinen, wiesen hier die zwölf Monate alten Tiere im Vergleich zu den jüngeren Tieren alle einen signifikanten Kraftverlust (WT: $p<0,001$; Cra1: $p<0,001$; P301L: $p<0,05$; alle RST) auf.

## 3.3. Motorische Koordination

Das Gleichgewicht und die Balance kann man sehr gut mit dem Rotarod untersuchen. Hierzu werden die Tiere auf den rotierenden Zylinder gesetzt, der kontinuierlich beschleunigt wird. Die Dauer, wie lange das Tier auf dem rotierenden Zylinder laufen kann, wird hierbei gemessen. Damit das Gewicht als eine mögliche Einflussgröße ausgeschlossen werden kann, wird bei diesem Versuch die Dauer auf dem Laufrad durch das Körpergewicht der Tiere geteilt und der dadurch entstandene Quotient miteinander verglichen (Abb.16) (Pennanen et al., 2004). Diese Normierung wurde wie schon bei dem Grip Strength Test beschrieben und aufgrund einer Verfettung mancher Tiere durchgeführt.

Dabei wurde bei den drei Monate alten Tieren beim Vergleich der Genotypen ein signifikanter Unterschied von $p<0,001$ (ANOVA) gefunden. In Abbildung 16 ist deutlich zu erkennen, dass die Tiere mit einer Mutation im Dynein, Cra1 (2,6 ± 1,4; N=12) und Cra1/SOD1 Tiere (2,7 ± 1,0; N=13) sich signifikant schlechter auf dem Rotarod halten können als WT (5,2 ± 1,2; N=15; $p<0,001$) und SOD1 Tiere (4,6 ± 1,5; N=15; $p<0,01$). Im Vergleich zu den P301L Tieren (3,9 ± 1,5; N=15) gab es keinen signifikanten Unterschied, jedoch waren die WT und Cra1 Tiere tendenziell besser bei dieser Aufgabe.

Betrachtet man die älteren Tiere mit einer ANOVA ($p<0,001$), wiesen hier die Cra1 Tiere mit einem Wert von 1,2 (± 0,6; N=14) sowohl zu den WT Tieren mit 2,3 (± 0,8; N=12; $p<0,001$) als auch zu den P301L-Tieren mit 2,9 (± 0,8; N=15; $p<0,001$) stark signifikant schlechteres Laufvermögen auf dem Rotarod auf.

Im Altersvergleich (t-Test) der Gruppen gleichen Genotyps zeigten sowohl die WT ($p<0,001$) als auch die Cra1 Tiere ($p<0,01$) einen statistisch signifikanten Abfall des Laufvermögens auf dem Rotarod.

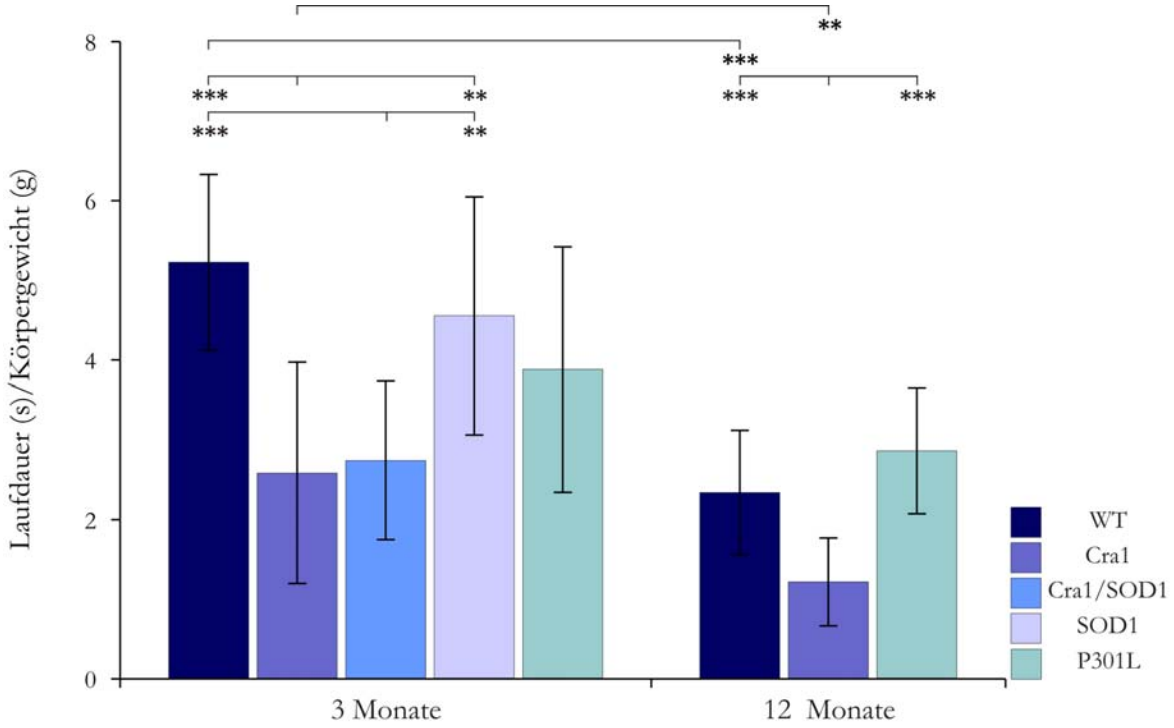



**Abbildung 16: Laufdauer auf dem Rotarod bei den verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Die Werte sind der Quotient aus der Laufdauer und dem Körpergewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

## 3.4. Motorische Aktivität

Mit dem Paradigma des Open Fields kann man mehrere Aspekte des Verhaltens parallel untersuchen. Ein wichtiger Aspekt ist hier die motorische Aktivität, die mit den Parametern der gelaufenen Strecke und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit erfasst werden kann. Hierbei habe ich bei den drei Monate alten Tieren 16 WT, 12 Cra1, 12 Cra1/SOD1, 14 SOD1 und 14 P301L Tiere untersucht. Bei den zwölf Monate alten Tieren gingen 12 WT, 11 Cra1 und 16 P301L Tiere in die Messung ein.

Die zurückgelegten Wegstrecken sind in dem Balkendiagramm in Abbildung 17 aufgetragen. Beim Vergleich der Genotypen in der Altersklasse der drei Monate alten Tiere ergab die ANOVA einen signifikanten Unterschied ($p<0,001$). Beim paarweisen Vergleich durch den post hoc durchgeführten Bonferroni-t-Test zeigte sich, dass die Cra1 (8662 ± 1237 cm; $p<0,01$), Cra1/SOD1 (8842 ± 1152 cm; N=12; $p<0,001$) und P301L (9234 ± 1365 cm;

p<0,001) Tiere signifikant mehr liefen, als die gleichaltrigen WT (6685 ± 1334 cm) und SOD1 (6837 ± 1109 cm) Tiere.

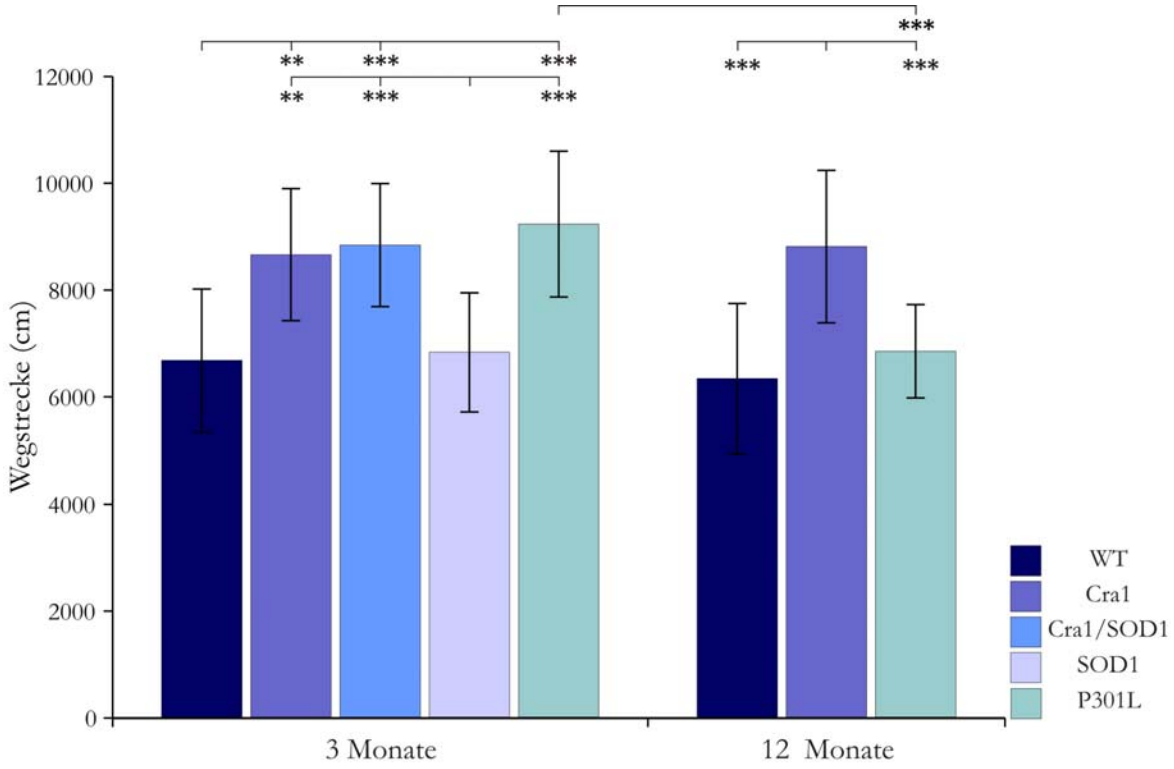



**Abbildung 17: Mittlere Wegstrecke der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate, die in der gesamten Open Field Arena gelaufen wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Die zwölf Monate alten P301L Tiere liefen dagegen mit einer Strecke von 6853 ± 873 cm deutlich weniger als die Cra1 Tiere mit 8813 ± 1427 cm und ähnelten damit eher den WT Tieren, die eine durchschnittliche Strecke von 6343 ± 1405 cm zurücklegten.

Beim Vergleich der Tiere bezüglich der Altersgruppen mit dem t-Test kam es zu einer signifikanten Verringerung der gelaufenen Wegstrecke mit zunehmendem Alter bei den P301L Tieren (p<0,001).

Als zweiter Parameter für die motorische Aktivität wurde beim Open Field die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit erhoben (Abb.18). Der Genotypenvergleich in der Altersklasse drei Monate mittels einer ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied (p<0,001). Die WT (3,7 ± 0,7 cm/s) und SOD1 Tiere (3,8 ± 0,6 cm/s) liefen signifikant langsamer als die anderen drei Genotypen diesen Alters. Dabei waren die P301L Tiere mit 5,1 ± 0,8 cm/s (p<0,001) am schnellsten, gefolgt von den Cra1/SOD1 Tieren mit 4,9 ± 0,6 cm/s

(p<0,001) und den Cra1 Mäusen mit 4,8 ± 0,7 cm/s (p<0,01).

Bei der Betrachtung der zwölf Monate alten Tiere ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied (ANOVA, p<0,001). Die Cra1 Tiere liefen mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 4,9 ± 0,8 cm/s im Vergleich zu den WT (3,5 ± 0,8 cm/s; p<0,001) und P301L Tieren (3,8 ± 0,5 cm/s; p<0,001) signifikant schneller.

Beim Altersvergleich liefen die 12 Monate alten P301L Mäuse signifikant langsamer als die jungen Tiere (p<0,001; t-Test). Bei den WT und Cra1 Tieren war kein Unterschied bezüglich des Alters erkennbar.

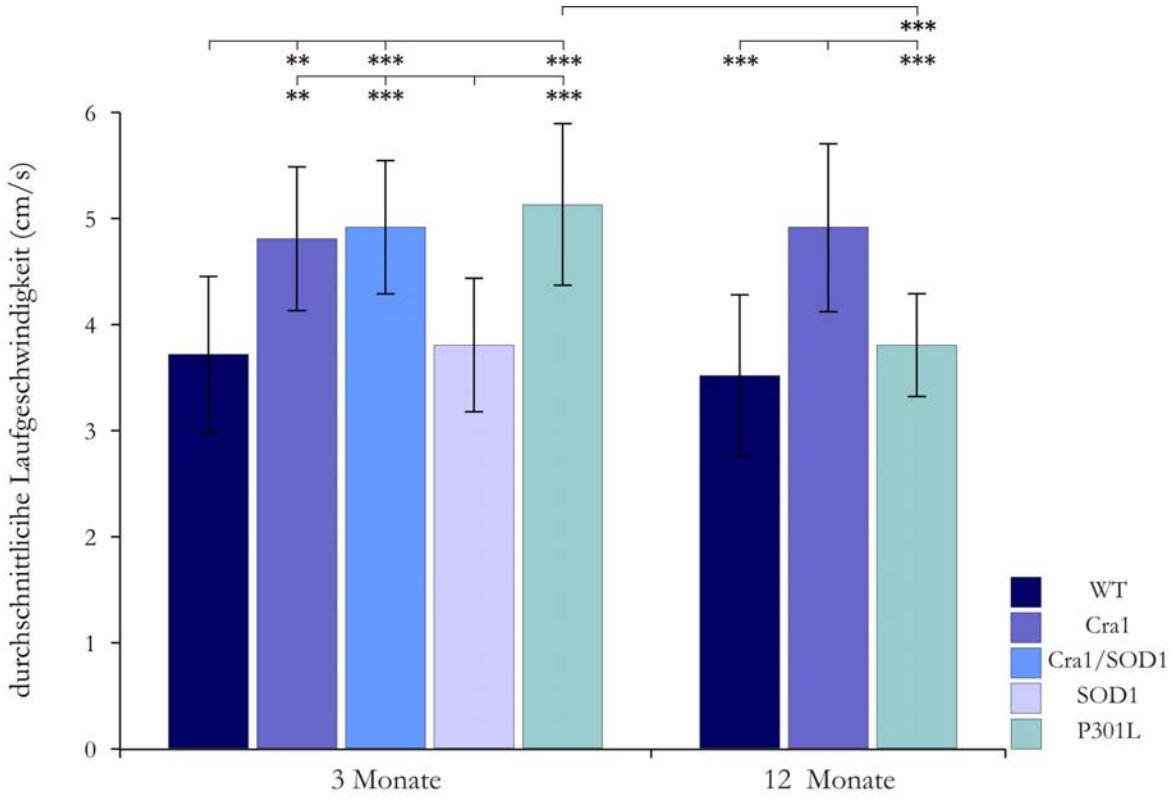



**Abbildung 18: Durchschnittliche Laufgeschwindigkeit der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate in der gesamten Open Field Arena. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Bei dem Test mit dem Y-Labyrinth kann man ebenfalls die motorische Aktivität messen, welche mit den beiden Parametern gelaufene Strecke und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit beschrieben wurde. Für diesen Versuch habe ich bei den drei Monate alten Tieren 16 WT, 12 Cra1, 13 Cra1/SOD1, 15 SOD1 und 15 P301L Tiere untersucht. Bei den zwölf Monate alten Tieren gingen 15 WT, 15 Cra1 und 16 P301L Tiere in die Messung

ein. Abbildung 19 zeigt die in fünf Minuten zurückgelegte Wegstrecke. Die K-W ANOVA ergab bei dem Vergleich der Genotypen der drei Monate alten Tiere einen signifikanten Unterschied (p=0,008). Die Cra1 Tiere liefen mit 2319 cm signifikant mehr als die gleichaltrigen WT Tiere (p<0,01).

Bei den zwölf Monate alten Tieren lagen alle drei Gruppen nahe zusammen, so dass kein signifikanter Unterschied erkennbar war. Der Altersvergleich zeigte sich eine signifikante Verringerung der gelaufenen Strecke um 670 cm bei den Cra1 Tieren (p<0,001; RST). Die alten P301L Tiere liefen ebenfalls signifikant weniger als die jüngeren Tiere (p<0,01; RST).

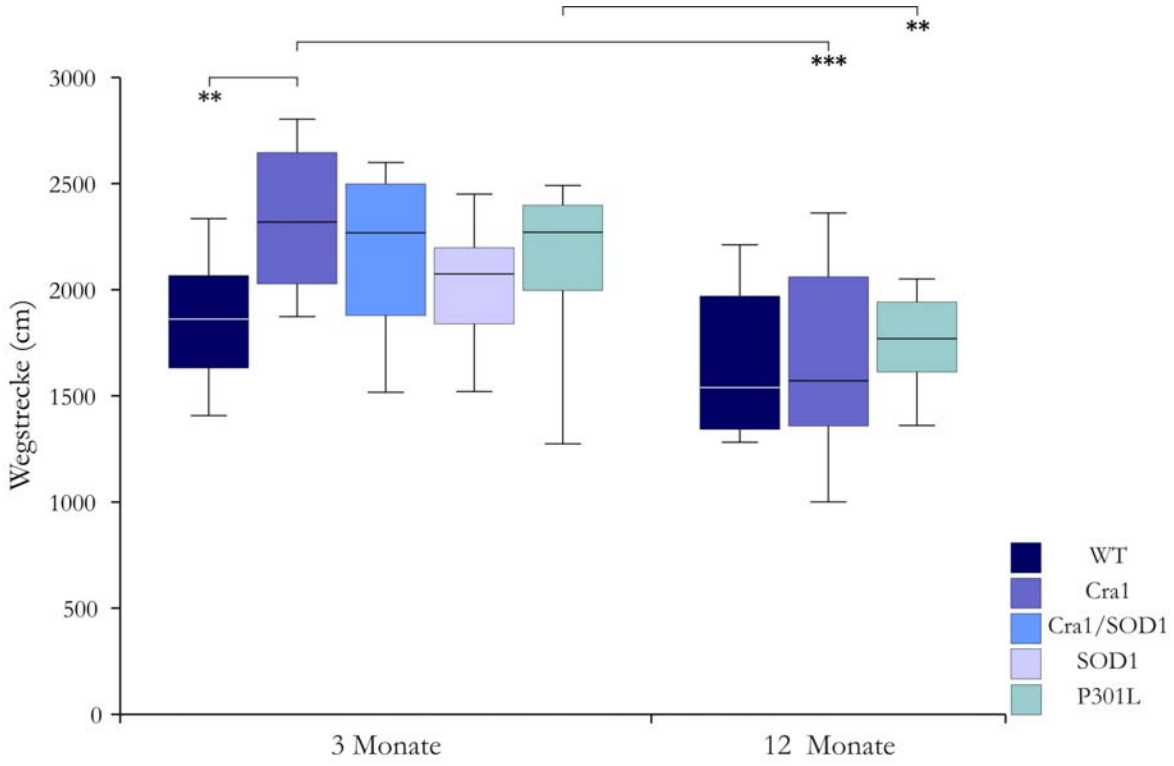



**Abbildung 19: Mittlere Wegstrecke der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit der Mäuse im Y-Labyrinth ist in Abbildung 20 dargestellt. Beim Vergleich der Genotypen in der Altersklasse der drei Monate alten Tiere ergab die K-W ANOVA einen signifikanten Unterschied (p=0,009).

In der Altersgruppe der drei Monate alten Tiere wiesen als einzige die Cra1 Tiere mit 7,8 cm/s eine erhöhte Laufgeschwindigkeit auf, wobei sich diese nur von den WT Tieren, die sich durchschnittlich mit 6,2 cm/s im Y-Labyrinth bewegten, signifikant unterschieden (p<0,01).

Die Cra1/SOD1 und P301L Tiere erreichten eine Geschwindigkeit von 7,6 cm/s, gefolgt von den SOD1 Mäusen mit 6,9 cm/s.

Bei den zwölf Monate alten Mäusen waren die P301L Tiere mit 5,9 cm/s am schnellsten, jedoch gab es hier keinen Unterschied zu den WT (5,1 cm/s) und Cra1 (5,2) Tieren.

Im Altersvergleich reduzierten sowohl die Cra1 ($p<0,001$, RST) als auch die P301L Tiere ($p<0,01$, RST) ihre durchschnittliche Geschwindigkeit mit zunehmendem Alter.

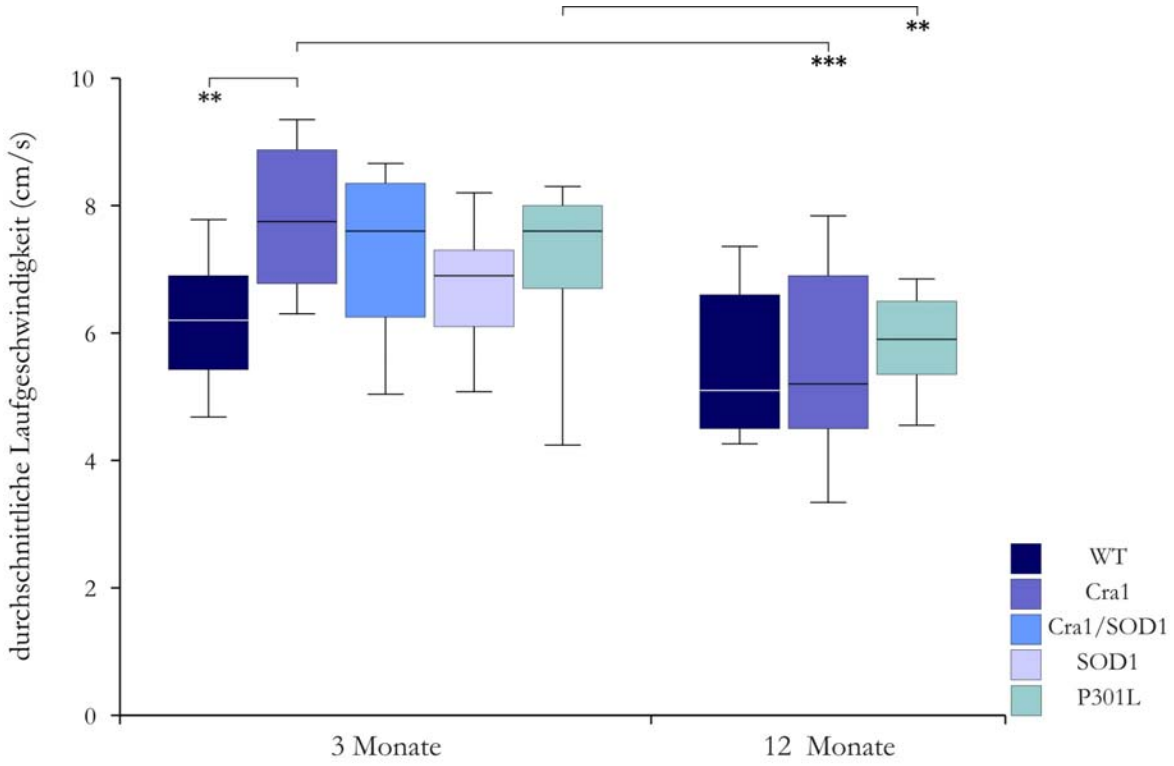



**Abbildung 20: Durchschnittliche Laufgeschwindigkeit der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p<0,01$) und *** ($p<0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

## 3.5. Explorations- und Angstverhalten

Mit dem Open Field Test kann neben der Aktivität auch Explorationsverhalten und Angst gemessen werden. Das Explorationsverhalten wurde durch die Anzahl des Aufstellens auf die Hinterbeine (Rearing) ermittelt, die Angst durch die Anzahl der Besuche in der Zentrumszone und die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit im Zentrum der Arena. Hierbei habe ich bei

den drei Monate alten Tieren 16 WT, 12 Cra1, 12 Cra1/SOD1, 15 SOD1 und 14 P301L Mäuse untersucht. Bei den zwölf Monate alten Tieren gingen 11 WT, 12 Cra1 und 16 P301L Tiere in die Messung ein.
Die Tiere in der Alterklasse von drei Monaten zeigten beim Rearing keine signifikanten Unterschiede (Abb. 21).

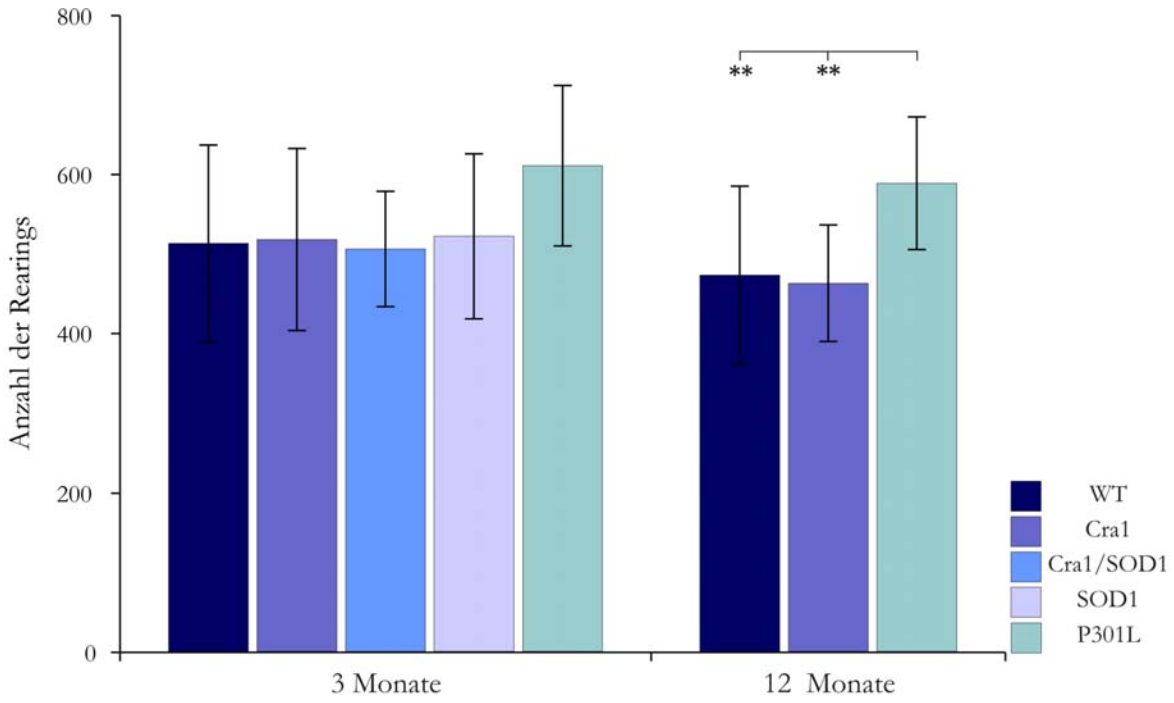



**Abbildung 21: Mittlere Anzahl der Rearings der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate in der Open Field Arena. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Lediglich die P301L Tiere stellten sich mit einer Anzahl von 611± 101 etwas häufiger auf die Hinterbeine als die WT (513 ± 124), Cra1 (518 ± 114), Cra1/SOD1 (506 ± 72) und SOD1 Tiere (522 ± 104). In der Altersklasse der zwölf Monate alten Tiere ergab sich beim Vergleich der Genotypen ein signifikanter Unterschied (p<0,001; ANOVA). Dabei stach hervor, dass sich die P301L Tiere mit 589 ± 83 Rearings signifikant häufiger auf den Hinterbeine stellten, als die WT (473 ± 112; p<0,01) und Cra1 Tiere (463 ±73; p<0,01).
Der Altersklassenvergleich erbrachte keine signifikanten Unterschiede.

Der erste Parameter des Angstverhaltens, die Anzahl der Besuche im Zentrum (Abb. 22), zeigte in der Alterklasse der drei Monate alten Tiere einen signifikanten Unterschied (p<0,001;

ANOVA). Der paarweise Vergleich innerhalb dieser Altersklasse ergab, dass die WT Tiere mit 77 ± 30 Besuchen am seltensten in das Zentrum einliefen und sich somit signifikant von den Cra1 Tiere mit durchschnittlich 115 ± 29 Besuchen ($p<0,01$; Bonferroni t-Test) gefolgt von den Cra1/SOD1 (107 ± 30; $p<0,05$; Bonferroni t-Test) und P301L Tieren (106 ± 15; $p<0,05$; Bonferroni t-Test) unterschieden. Die SOD1 Tiere verhielten sich bei diesem Parameter ähnlich wie die WT Mäuse und besuchten das Zentrum mit 87 ±21 nur geringfügig öfter. Die Altersklasse der zwölf Monate alten Tiere zeigte keine Unterschiede, da sich die WT (74 ± 25), Cra1 (80 ± 34) und P301L Tiere (80 ± 24) hier nahezu identisch verhielten.

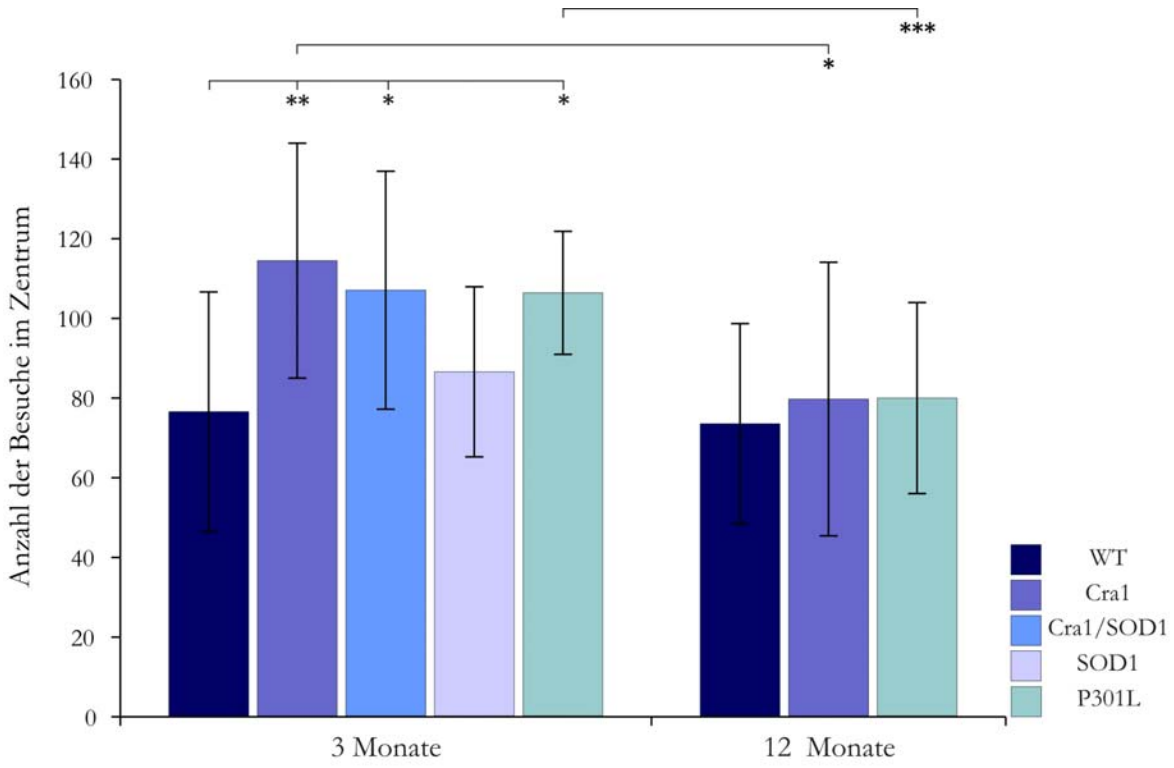



**Abbildung 22: Mittlere Anzahl der Besuche im Zentrum der Open Field Areana der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$), ** ($p<0,01$) und *** ($p<0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Der Vergleich der beiden Altersklassen zeigte, dass sowohl die Cra1 ($p<0,05$, t-Test) als auch die P301L Tiere ($p<0,001$, t-Test) im Alter signifikant seltener in das Zentrum liefen.

Der zweite Parameter des Angstverhaltens, die durchschnittliche Geschwindigkeit im Zentrum, ist in Abbildung 23 abgebildet. Der Genotypenvergleich bei den drei Monate alten Mäusen wies signifikante Unterschiede auf ($p<0,001$; ANOVA). Der anschließende Bonferroni t-Test zeigte, dass sich dabei die Cra1 Tiere mit einer durchschnittlichen

Geschwindigkeit von 8,9 ± 1,9 cm/s signifikant schneller im Zentrum bewegten, als die WT Tiere (6,8 ± 2,0 cm/s). Die Cra1/SOD1 (8,3 ± 1,1 cm/s), SOD1 (7,4 ± 1,4 cm/s) und P301L Tiere (8,5 ± 1,6 cm/s) wiesen keine Unterschiede auf. Bei den zwölf Monate alten Tieren gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied ($p<0,001$; ANOVA). Der anschließende Vergleich der Genotypen zeigte, dass sich die Cra1 Tiere mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 9,7 ± 2,1 cm/s signifikant schneller im Zentrum fortbewegten, als die WT (6,0 ± 1,3 cm/s; $p<0,001$) und P301L Mäuse (6,9 ± 1,4 cm/s; $p<0,001$). Der Vergleich der beiden Altersgruppen miteinander zeigte nur bei den P301L Tieren einen signifikanten Abfall der Fortbewegungsgeschwindigkeit der Tiere im Zentrum mit zunehmendem Alter ($p<0,001$).

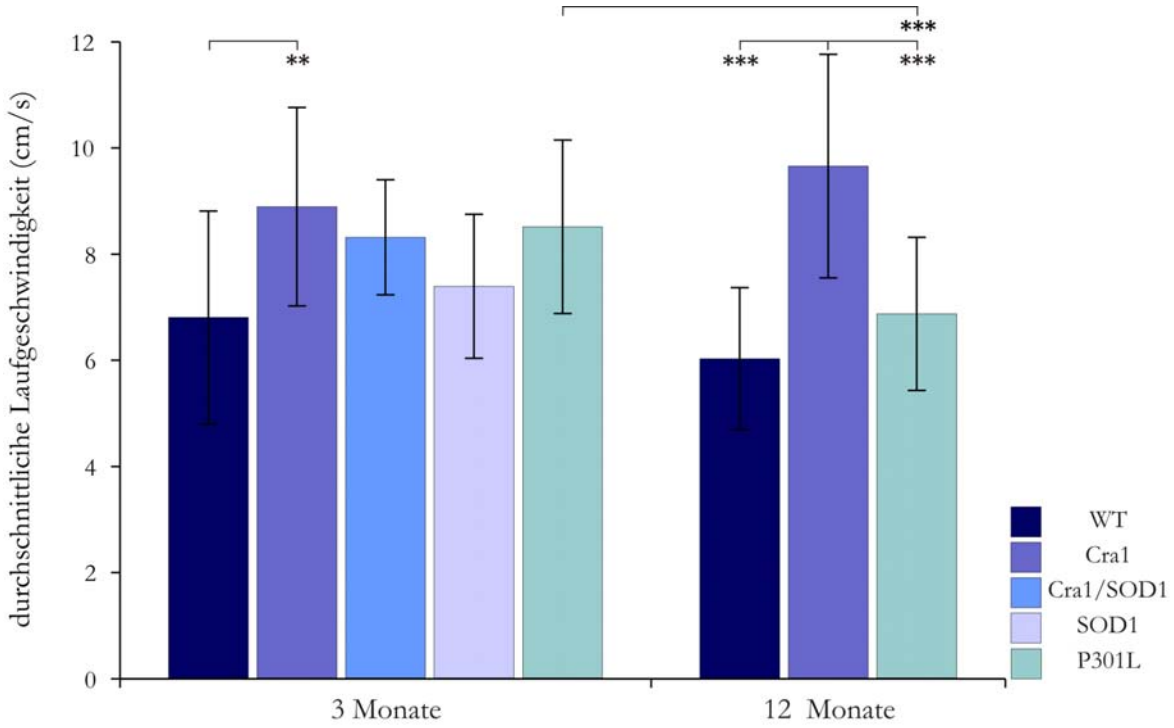



**Abbildung 23 Durchschnittliche Laufgeschwindigkeit im Zentrum der Open Field Arena der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p<0,01$) und *** ($p<0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet**

Bei dem Y-Labyrinth Versuch kann mit der Dauer, wie lange sich die Maus in dem Startarm aufhält (Abb. 24), ein weiterer Parameter gemessen werden, der Angst bzw. Neugierde widerspiegelt, welche die neue Umgebung bei der Maus verursacht. Diese Latenzzeit wurde bei 16 WT, 12 Cra1, 13 Cra1/SOD1, 15 SOD1 und 15 P301L Tieren im Alter von drei Monaten gemessen. Bei den zwölf Monate alten Tieren dienten 15 WT, 15 Cra1 und 16

P301L Tiere der Datenerhebung. Die Altergruppe der drei Monate alten Tiere lieferte ein sehr homogenes Bild bezüglich der Latenzzeit, wobei die WT 9,0 s, Cra1 8,0 s, Cra1/SOD1 8,5 s, SOD1 5,4 s und die P301L Tiere 4,6 s brauchten.
Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den zwölf Monate alten Tieren, da die WT 7,5 s, Cra1 8,8 s und P301L 7,8 s benötigten, um den Startarm zu verlassen.
Auch der Vergleich des Alters eines Genotyps zeigte keinerlei Unterschiede auf.

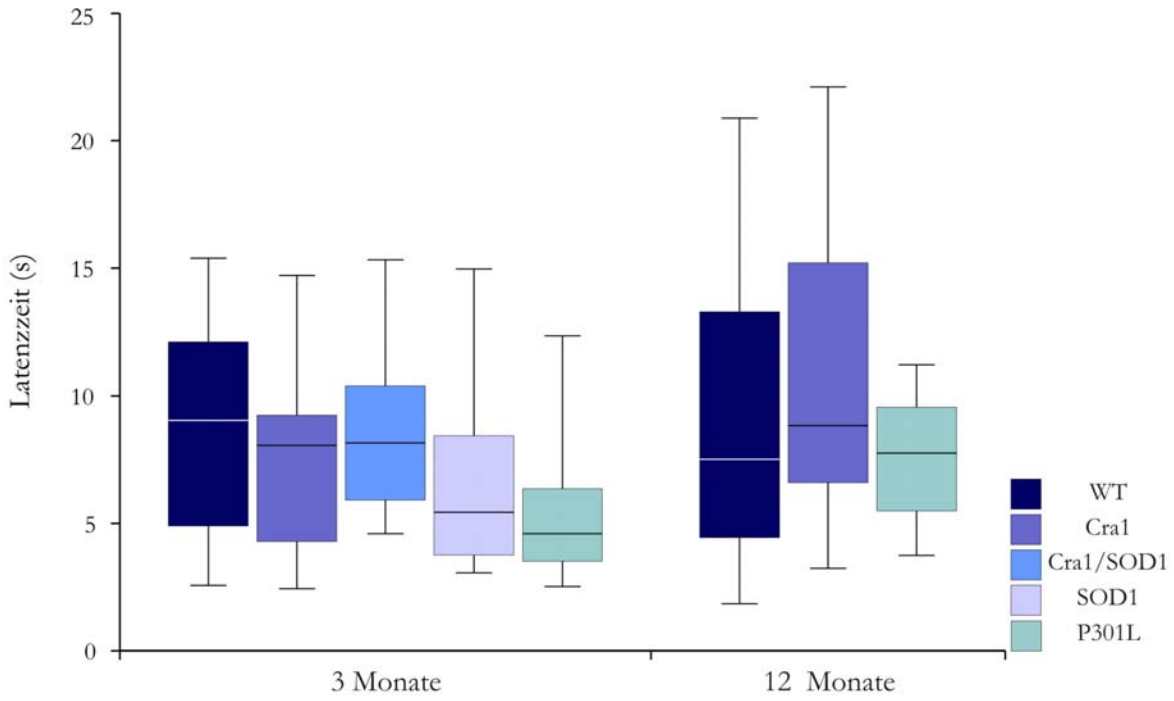



**Abbildung 24: Latenzzeit der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate bis zum Verlassen des Startarms im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten.**

Das klassische Paradigma, um bei Nagern Angst zu messen, ist das Elevated Plus Labyrinth. Bei diesem Versuch wurde die prozentuale Aufenthaltsdauer in den geschlossenen und offenen Armen aufgezeichnet (Abb. 25). Die Tiere konnten sich auch in dem Zentrum des Labyrinths aufhalten, welches weder zu den offenen noch den geschlossenen Armen gezählt wurde. Die fehlende prozentuale Aufenthaltsdauer verbrachten die Tiere daher im Zentrum des Labyrinths. Der Vergleich der Genotypen in der Altersklasse drei Monate wies bezüglich der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen keine Unterschiede auf (K-W ANOVA). Die P301L Tiere (89,7 %; N=15) hielten sich tendenziell am meisten in den geschlossenen Armen auf, gefolgt von den SOD1 (81,4 %; N=13) und WT Tieren (80,0 %; N=16). Die Cra1 (72,1 %; N=12) und Cra1/SOD1 Tiere (70,7 %; N=15) waren geringfügig kürzer in den

geschlossenen Armen. Bei den zwölf Monate alten Tieren hingegen, konnte ein signifikanter Unterschied bei der Aufenthaltsdauer in den geschlossenen Armen festgestellt werden (p=0,006; K-W ANOVA). Hierbei waren die Cra1 Tiere mit durchschnittlich 67,3 % (N=13) signifikant weniger in den geschlossenen Armen als die WT (80 %; N=13; p<0,05) und P301L Mäuse (82,8 %; N=16; p<0,05).

Bei der Aufenthaltsdauer in den offenen Armen, konnte weder beim Vergleich der Genotypen innerhalb einer Altersklasse, noch bei dem Altersvergleich eines Genotyps ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Hier waren bei den drei Monate alten Tieren alle Gruppen, WT (1,0 %), Cra1 (1,5 %), Cra1/SOD1 (1,5 %), SOD1 (2,7 %) und P301L (2,1 %), nahezu gleich lang in den offenen Armen.

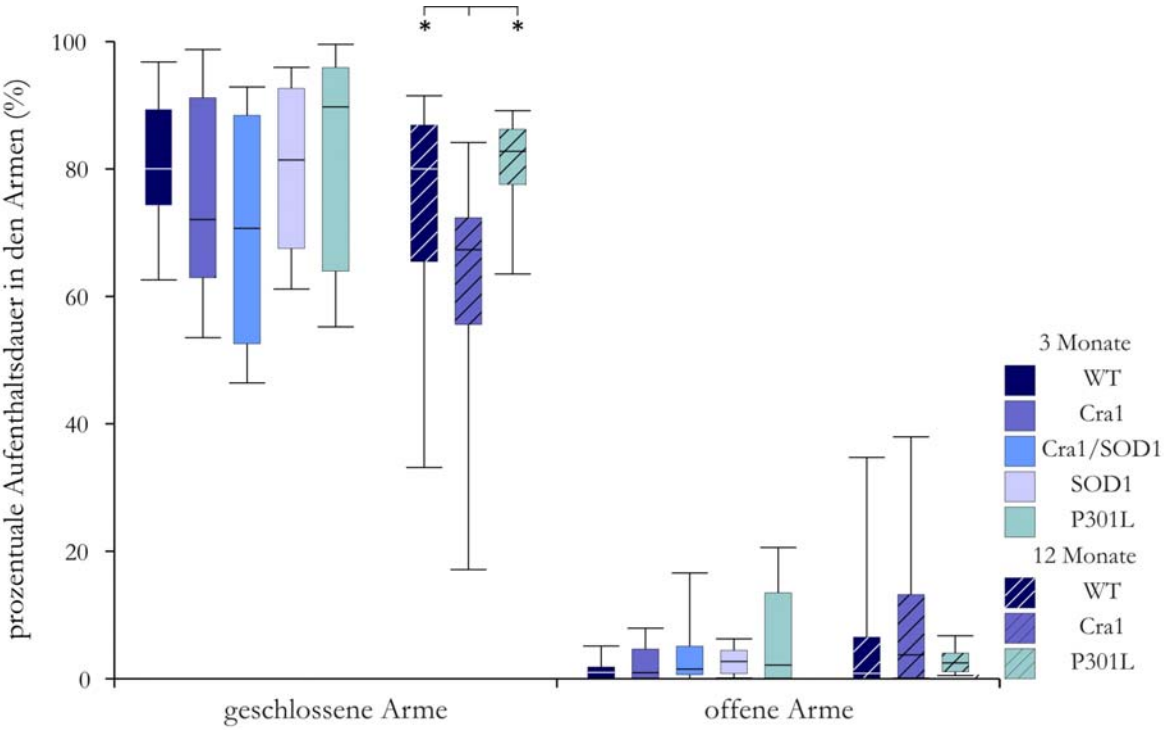



**Abbildung 25: Prozentuale Darstellung der Aufenthaltsdauern der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate in den geschlossenen und offenen Armen des Elevated Plus Labyrinths. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) und den Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0,05) unter den Klammern gekennzeichnet.**

## 3.6. Lernverhalten

Bei der Untersuchung des Lernverhaltens untersuchte ich zunächst das räumliche Arbeitsgedächtnis. Dabei bestimmte ich für jedes Tier das spontane Alternationsverhalten während des fünfminütigen Versuchs im Y-Labyrinth. Um die Motivation der einzelnen Genotypen zu vergleichen, wurde die Gesamtzahl der Armeintritte bei diesem Versuch bestimmt. Bei dem Y-Labyrinth wurden bei den drei Monate alten Tieren 15 WT, 12 Cra1, 13 Cra1/SOD1, 15 SOD1 und 15 P301L Tiere untersucht. Bei den zwölf Monate alten Tieren waren es 15 WT, 15 Cra1 und 14 P301L Tiere.

Bei dem spontanen Alternationsverhalten wurde, wie in Abbildung 26 abgebildet, innerhalb der Altersgruppe von drei Monaten kein Unterschied festgestellt. Dies änderte sich allerdings in einem Alter von zwölf Monaten ($p<0{,}001$; ANOVA). Beim paarweisen Vergleich mit dem anschließenden Bonferroni t-Test zeigte sich, dass die P301L Tiere (50,1 ± 13,7%) sich signifikant von den WT (34,2 ± 10,9%; $p<0{,}001$) und Cra1 Tieren (32,6 ± 8,2%; $p<0{,}001$) unterschieden.

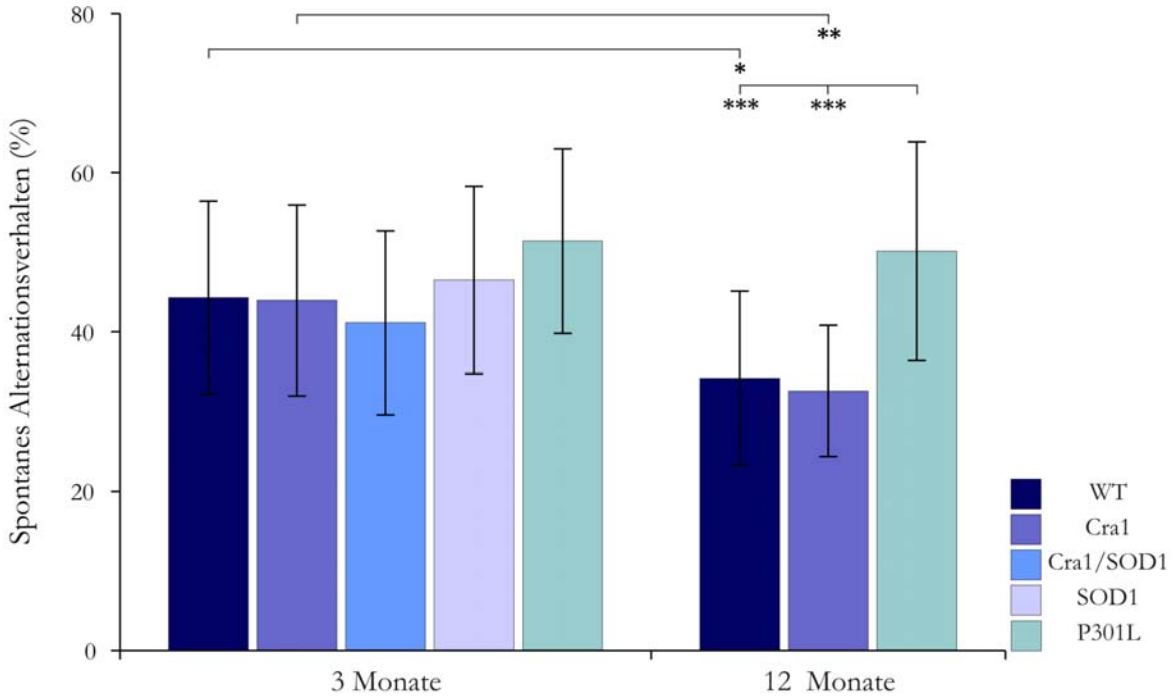



**Abbildung 26: Prozentuale Darstellung des spontanen Alternationsverhaltens in den verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0{,}05$), ** ($p<0{,}01$) und *** ($p<0{,}001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Im Vergleich zwischen den Altersgruppen wurde sowohl bei den WT Tieren ($p<0,05$; t-Test), als auch bei den Cra1-Tieren ($p<0,01$; t-Test) ein signifikanter Abfall ersichtlich.

In Abbildung 27 ist die Anzahl aller Armeintritte abgebildet, wobei man deutlich sehen kann, dass die Cra1 Tiere sowohl im Alter von drei Monaten (45,5 ± 10,2) als auch von zwölf Monaten (44,6 ± 12,7) die meisten Eintritte aufwiesen. Bei der Betrachtung der drei Monate alten Tiere, wies die ANOVA einen signifikanten Unterschied von $p=0,025$ auf. Beim paarweisen Vergleich (Bonferroni t-Test) der Genotypen zeigte sich, dass die Cra1 Tiere nur im Vergleich zu den WT Tieren mit einer durchschnittlichen Anzahl der Armeintritte von 35,4 ± 8,9 ($p<0,05$) signifikant häufiger in die verschiedenen Arme einliefen. Die Cra1/SOD1 (43,2 ± 10,1) und P301L Tiere (39,2 ± 12,0) hatten ebenfalls eine leicht erhöhte Anzahl an Armbesuchen, wobei sich diese nicht signifikant von den anderen Gruppen unterschieden. Die SOD1 Tiere zeigten mit durchschnittlich 37,1 ± 6,0 Besuchen ähnliche Werte wie die gleichaltrigen WT Tiere.

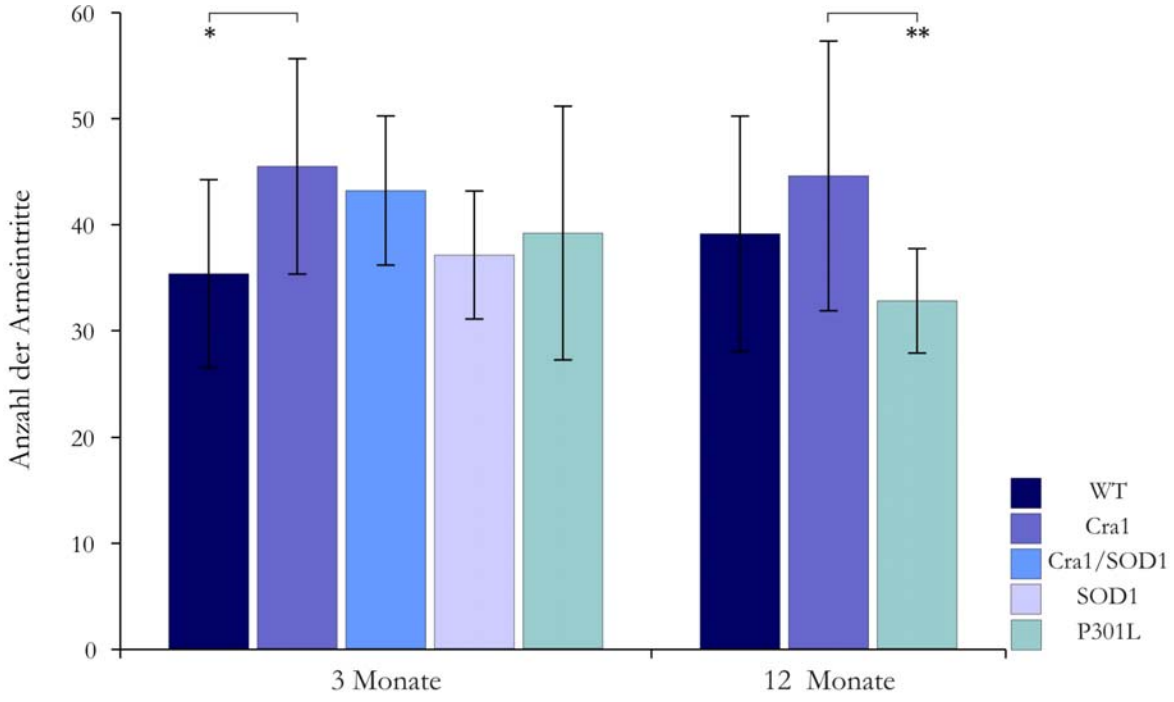



**Abbildung 27: Mittlere Anzahl der Armeintritte der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Y-Labyrinth. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) und ** ($p<0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Der Vergleich der zwölf Monate alten Tiere ergab mit der ANOVA einen signifikanten Unterschied (p=0,009). Die P301L Tiere liefen mit einem durchschnittlichen Wert von 32,8 ± 4,9 in signifikant weniger Arme ein als die Cra1 Tiere. Die WT Tiere lagen in dieser Altersklasse mit durchschnittlich 39,1 ± 11,1 zwischen den Cra1 und P301L Tieren.
Der Vergleich der beiden Altersgruppen miteinander ergab keine signifikanten Unterschiede.

Als nächstes untersuchte ich mit Hilfe des bekanntesten Lernparadigma, dem Morris Water Maze, das räumliche Referenzgedächtnis. Bei diesem Versuch wurden 12 WT, je 11 Cra1, Cra1/SOD1, SOD1 und 15 P301L Tiere im Alter von drei Monaten und je 15 WT, Cra1 und P301L Tiere im Alter von zwölf Monaten getestet.
In diesem Test wurden die Parameter Schwimmdauer, Schwimmstrecke und die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit von 30 einzelnen Testläufen an fünf aufeinander folgenden Tagen aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte, indem zunächst je zwei aufeinander folgende Testläufe in einem Block gemittelt wurden und aus diesen Daten für jeden Parameter eine charakteristische Kurve über die Zeit, eine so genannte Lernkurve, erstellt wurde. Bei den beiden Parametern Schwimmdauer und -strecke wurde die Lernkurve der Akquisitionsphase zur genaueren Untersuchung in zwei Abschnitte, einer Lernphase (Block 1-5) und einer Plateauphase (Block 6-9), unterteilt. Zum Vergleich der einzelnen Gruppen wurde für die Lernphase mit einer linearen Regression und die Plateauphase (beschreibt das erreichte Lernniveau) durch den Mittelwert beschrieben und dann miteinander verglichen. Bei der durchschnittlichen Schwimmgeschwindigkeit wurde der Mittelwert der Blöcke 4 bis 15 gebildet, da ab diesem Zeitpunkt eine stabile Schwimmgeschwindigkeit erreicht wurde.

Bei der Schwimmdauer in Abbildung 28 zeigte jede Gruppe in den Blöcken 1 - 5 eine starke Reduktion dieser auf, die ab dem Block 6 in eine Plateauphase überging. Ab Block 10 wurde die zu findende Plattform an eine andere Position gestellt (siehe Anschnitt 2.7.8.) (Reversalphase), und bei jeder Gruppe kam es dabei zu einem mehr oder weniger starken Anstieg der Schwimmdauer. Ab Block 11 hingegen pendelten sich die Schwimmzeiten wieder bei den schon vorher erreichten Schwimmdauern ein. Die genauen Mittelwerte und den dazugehörigen Standardabweichungen der einzelnen Gruppen über die Versuchsdauer der 15 Blöcke sind dem Anhang zu entnehmen (siehe Abschnitt 8.6.2.). Die Regressions- und Korrelationskoeffizienten der linearen Regression der Lernphase bei der Schwimmdauer sind in Tabelle 13 für alle Gruppen aufgelistet. Der paarweise Regressionskoeffizientenvergleich mit anschließender Bonferroni-Korrektur zeigte bei den drei Monate alten Tiere, dass die

SOD1 und P301L Tiere die Plattform signifikant schneller fanden als die WT ($p<0,01$), Cra1 ($p<0,01$)und Cra1/SOD1 Tiere ($p<0,01$). Die Cra1/SOD1 Tiere brauchten bei diesem Versuch am längsten die Plattform zu finden und unterschieden sich signifikant von den Cra1 Mäusen ($p<0,01$).

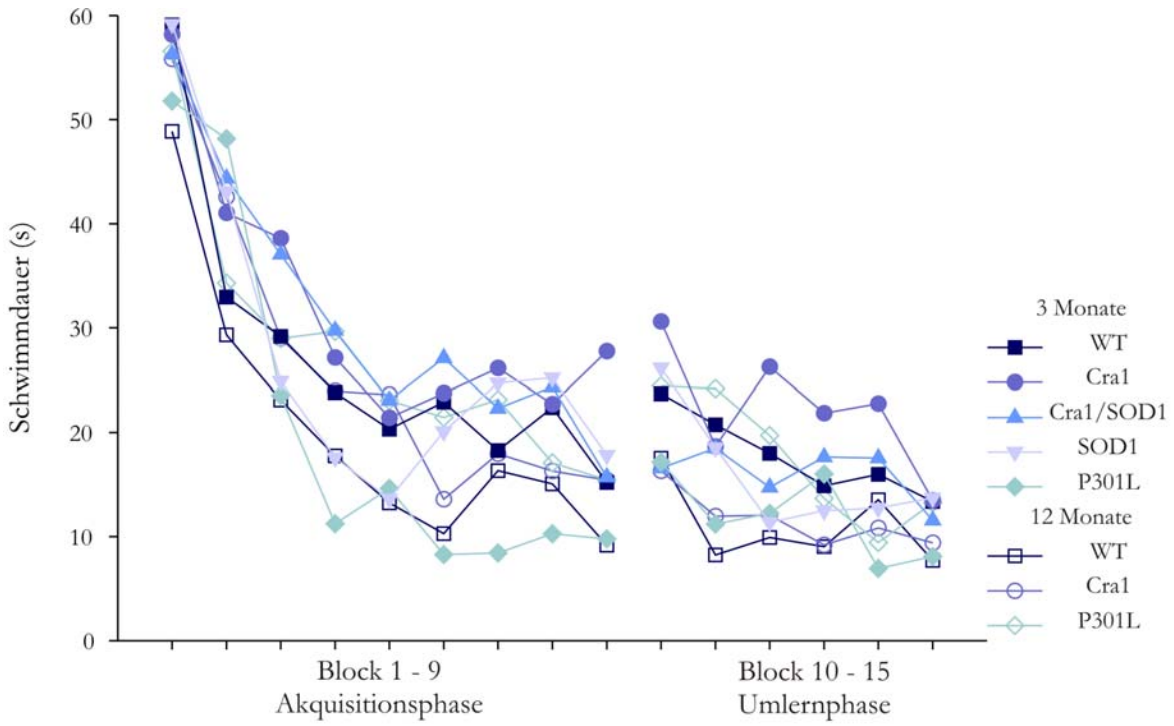



**Abbildung 28: Lernkurve bezüglich der mittleren Schwimmdauer der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte.**

Der Regressionskoeffizientenvergleich der zwölf Monate alten Tiere zeigte, dass die P301L Tiere in diesem Alter eine signifikant schlechtere Lernphase bei der Schwimmdauer als die WT ($p<0,01$)und Cra1 Tiere ($p<0,01$) aufwiesen.

Der Vergleich des gleichen Genotyps in den beiden Altersklassen zeigte, dass die alten P301L Tiere ($p<0,001$) eine signifikant längere Schwimmdauern in der Lernphase hatten als die jungen Tiere des gleichen Genotyps.

**Tabelle 13: Regressions- und Korrelationskoeffizienten der linearen Regression der Schwimmdauer.**

| | 3 Monate | | | | | 12 Monate | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **WT** | **Cra1** | **Cra1/ SOD1** | **SOD1** | **P301L** | **WT** | **Cra1** | **P301L** |
| **Regressions -koeffizient** | -8,67 | -8,74 | -8,10 | -11,67 | -11,13 | -8,28 | -8,41 | -7,31 |
| **Korrelations -koeffizient** | -0,89 | -0,97 | -0,99 | -0,97 | -0,93 | -0,94 | -0,94 | -0,86 |

Abbildung 29 zeigt die mittlere Schwimmdauer während der Plateauphase. Die quantitative Untersuchung zeigte bei dem Vergleich der Gruppen in der Altersklasse drei Monate signifikante Unterschiede ($p<0,001$; ANOVA). Die P301L Tiere schwammen im Vergleich zu den WT, Cra1, Cra1/SOD1 und SOD1 Tiere ab dem 6. Block signifikant schneller zur Plattform (je $p<0,001$).

In der Altersklasse der zwölf Monate alten Tiere ergab der Vergleich der Gruppen signifikante Unterschiede ($p=0,045$; ANOVA). Die P301L Tiere brauchten in dieser Altersklasse signifikant länger um die Plattform zu erreichen als die WT Tiere ($p<0,05$).

Der Vergleich des gleichen Genotyps der beiden Altersklasse zeigte, dass die jungen WT ($p<0,05$) und Cra1 Tiere ($p<0,001$) signifikant länger brauchten um die Plattform zu erreichen als die älteren Tiere. Bei den P301L Tieren ist dies genau umgedreht, die jungen brauchen signifikant kürzer als die zwölf Monate alten Tiere ($p<0,01$) um die Plattform zu erreichen.

Die Werte der Umlernphase glichen bei allen Gruppen denen der Plateauphase in der Akquisitionsphase.

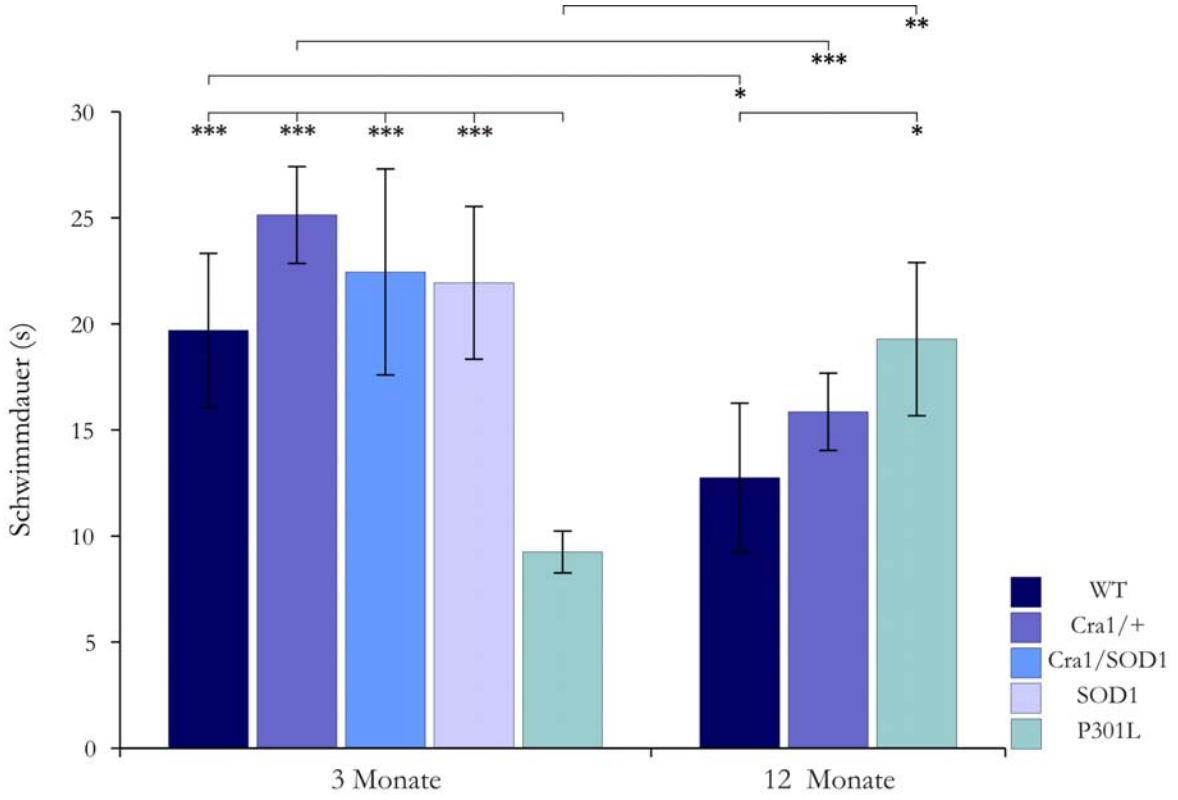



**Abbildung 29: Mittlere Schwimmdauer während der Plateauphase der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * (p<0,05), ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Die zurückgelegte Schwimmstrecke ist über die Zeit in Abbildung 30 aufgetragen. Hier fiel wie auch schon bei der Schwimmdauer auf, dass alle Gruppen die Schwimmstrecke im Verlauf der Zeit reduzierten (Block 1-5) und ab dem Block 6 eine nahezu gleich bleibende Schwimmstrecke zurücklegten. Die genauen Mittelwerte und den dazugehörigen Standardabweichungen der einzelnen Gruppen über die Versuchsdauer der 15 Blöcke sind dem zu entnehmen.

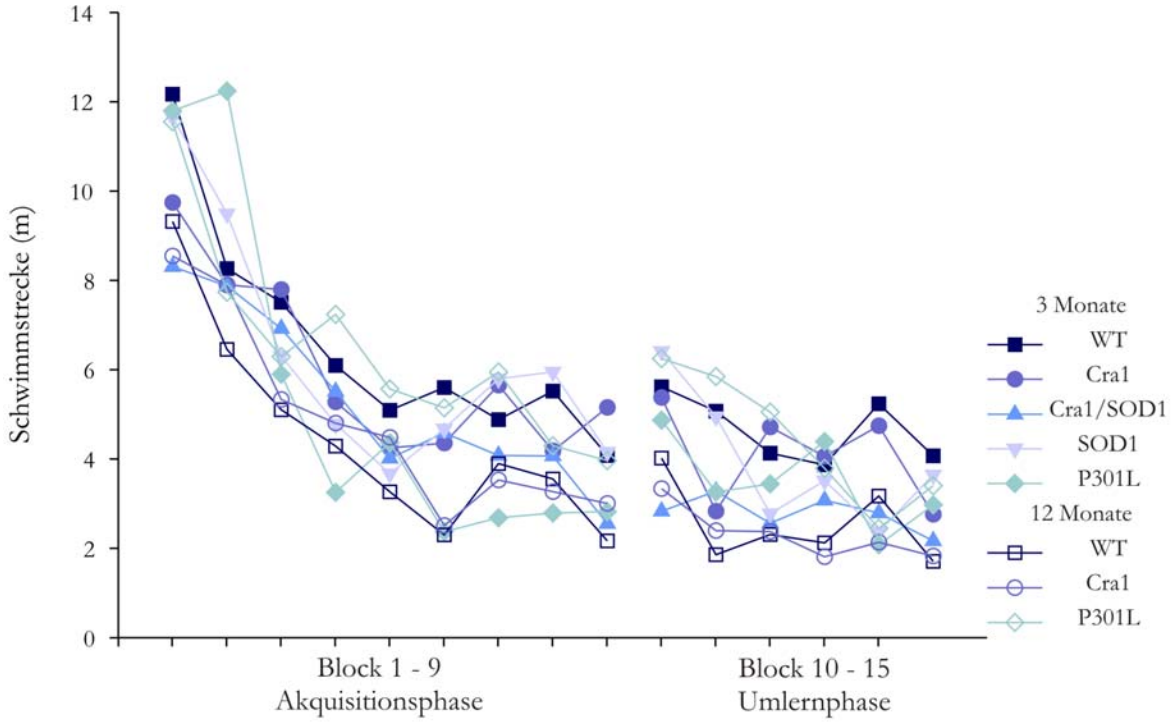



**Abbildung 30: Lernkurve bezüglich der mittleren Schwimmstrecke der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte.**

Zur quantitativen Auswertung dieses Parameters wurde die Akquisitionsphase, wie bei der Schwimmdauer beschrieben, in eine Lern- und Plateauphase unterteilt. Die Regressions- und Korrelationskoeffizienten der linearen Regression der Lernphase sind in Tabelle 14 für alle Gruppen aufgelistet. Der paarweise Vergleich der drei Monate alten Tiere zeigte, dass die P301L und SOD1 Tiere signifikant schnellere Verkürzung der Schwimmstrecke als die Cra1 ($p<0,01$) und Cra1/SOD1 Tiere ($p<0,01$) aufwiesen. Die Cra1/SOD1 Tiere zeigten eine signifikant langsamere Verkürzung der Schwimmstrecke als die WT Tiere ($p<0,05$).

Bei dem Vergleich der Gruppen im Alter von zwölf Monaten zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Bei dem Vergleich des gleichen Genotyps in den beiden Alterklassen reduzierten die zwölf Monate Alten P301L Tiere signifikant weniger die Schwimmstrecke als die jungen Tiere ($p<0,05$).

**Tabelle 14: Regressions- und Korrelationskoeffizienten der linearen Regression der Schwimmstrecke.**

| | 3 Monate | | | | | 12 Monate | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **WT** | **Cra1** | **Cra1/ SOD1** | **SOD1** | **P301L** | **WT** | **Cra1** | **P301L** |
| **Regressions-koeffizient** | -1,63 | -1,36 | -1,09 | -1,92 | -2,39 | -1,43 | -1,14 | -1,26 |
| **Korrelations-koeffizient** | -0,89 | -0,97 | -0,99 | -0,97 | -0,93 | -0,94 | -0,94 | -0,86 |

Die mittleren Schwimmstrecken während der Plateauphase sind in Abbildung 31 dargestellt. Bei der quantitativen Untersuchung zeigte der Vergleich der Gruppen in der Altersklasse drei Monate signifikante Unterschiede ($p<0,001$; ANOVA). Die P301L Tiere legten ab dem 6. Block signifikant weniger Schwimmstrecke im Vergleich zu den WT ($p<0,01$), Cra1 ($p<0,01$), und SOD1 Tiere ($p<0,01$) zurück.

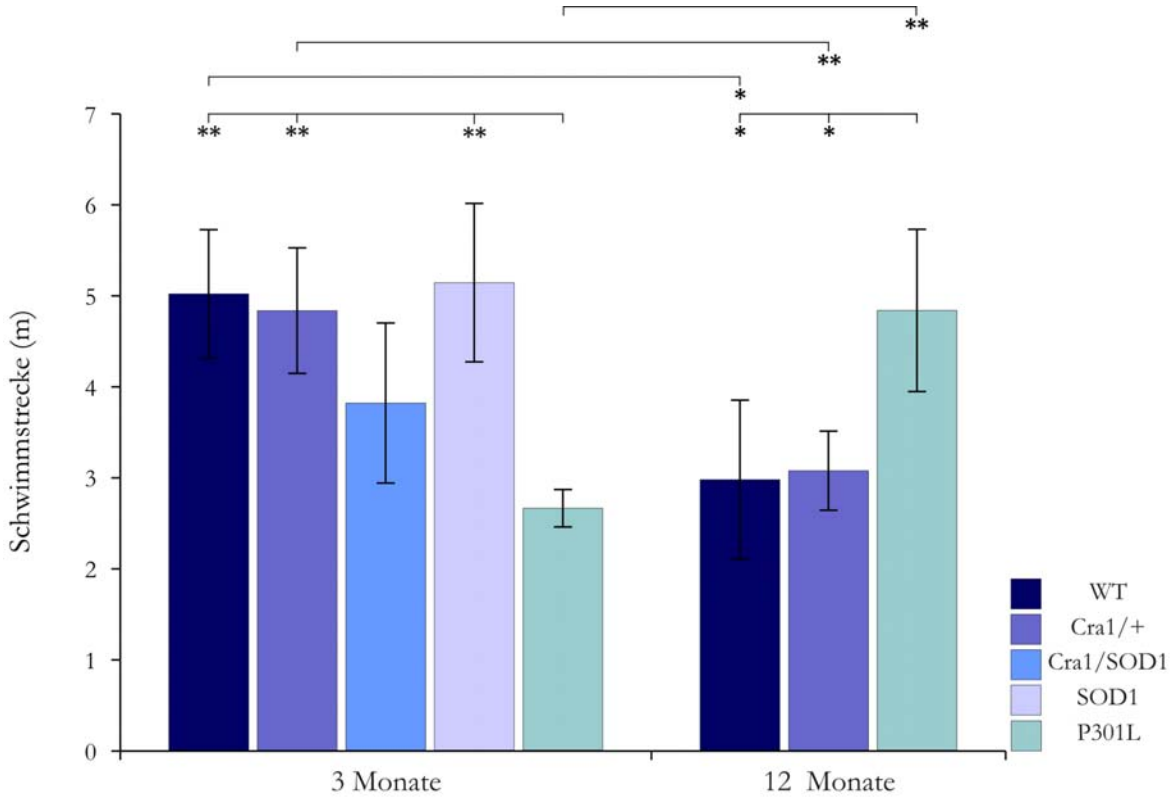



**Abbildung 31: Mittlere Schwimmstrecke während der Plateauphase der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p<0,05$) und ** ($p<0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

In der Altersklasse der zwölf Monate alten Tiere ergab der Vergleich der Gruppen signifikante Unterschiede (p=0,012; ANOVA). Die P301L Tiere schwammen in dieser Altersklasse signifikant mehr um die Plattform zu erreichen als die WT (p<0,05) und Cra1 Tiere (p<0,05).
Der Vergleich des gleichen Genotyps der beiden Altersklasse zeigte, dass die jungen WT (p<0,05) und Cra1 Tiere (p<0,01) signifikant längere Strecken bis zu Erreichen der Plattform als die älteren Tieren schwammen. Bei den P301L Tieren ist dies genau entgegengesetzt, die jungen schwammen signifikant weniger Strecke als die zwölf Monate alten Tiere (p<0,01) um die Plattform zu erreichen.
Die Werte der Umlernphase glichen bei allen Gruppen denen der Plateauphase in der Akquisitionsphase

Damit die motorischen Fähigkeiten bei der Interpretation die Schwimmdauer richtig eingeschätzt werden können, wurde auch die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit im Verlauf des Versuchs ermittelt (Abb. 32).

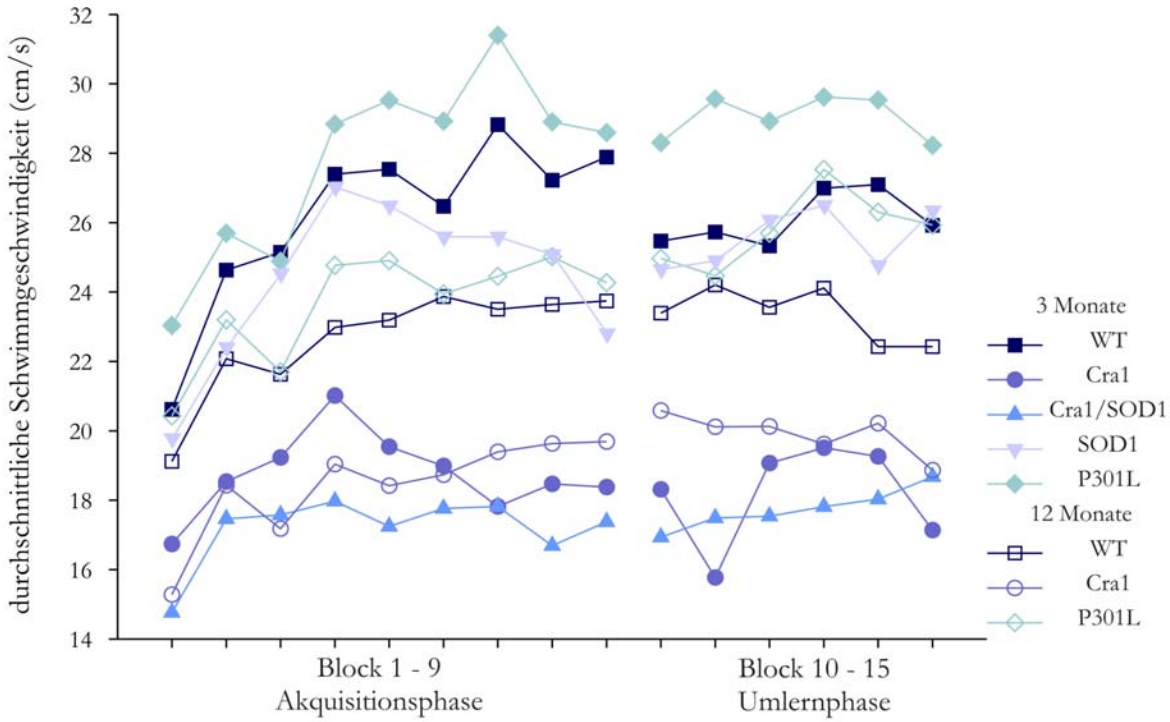



**Abbildung 32: Mittlere Schwimmgeschwindigkeit der verschiedenen Gruppen im Verlauf des Morris Water Maze Versuchs. Dargestellt sind die Mittelwerte.**

Alle Gruppen zeigten zu Beginn des Versuchs eine niedrige Schwimmgeschwindigkeit, die sich bis zu einem bestimmten Wert steigerte und dann beim restlichen Versuch beibehalten wurde.

Hier war deutlich zu erkennen, dass sowohl die Kurven der jungen Cra1 und Cra1/SOD1 Mäuse, als auch die der alten Cra1 Mäuse deutlich unterhalb der anderen Gruppen lagen. Die jungen P301L Tiere hingegen waren bei diesem Versuch am schnellsten unterwegs. Die genauen Mittelwerte und den dazugehörigen Standardabweichungen der einzelnen Gruppen über die Versuchsdauer der 15 Blöcke sind dem zu entnehmen. Zur quantitativen Analyse der Schwimmgeschwindigkeit wurde für jede Gruppe die mittlere durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit nach dem Erreichen der Plateauphase (ab Block 4) ermittelt (Abb.33).

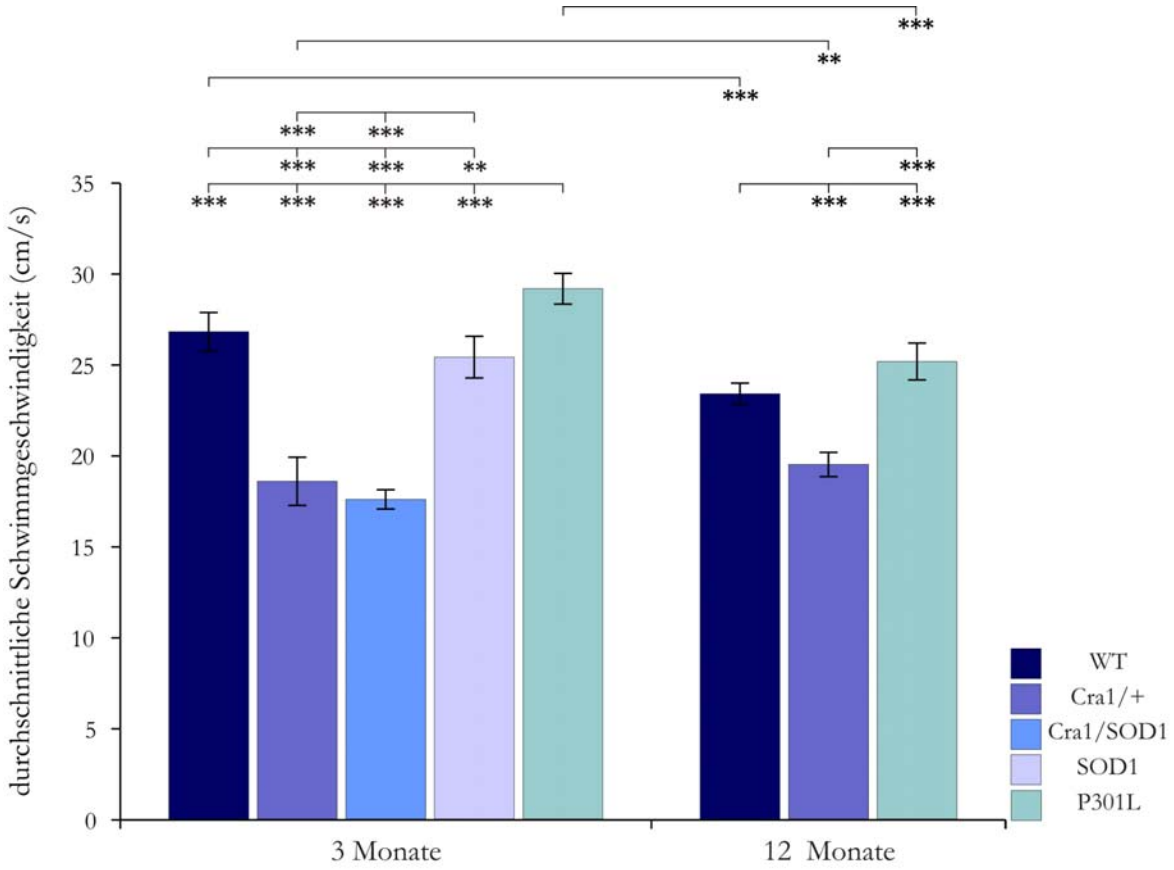



**Abbildung 33: Mittlere Schwimmgeschwindigkeit während der Plateauphase der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Dabei ergab die ANOVA bei den drei Monate alten Mäusen signifikante Unterschiede (p<0,001). In dieser Altersgruppe schwammen die P30L Tiere mit einer durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit von 29,2 ± 0,9 cm/s signifikant schneller als die WT (26,8 ± 1,1 cm/s; p<0,001), Cra1 (18,6 ± 1,3 cm/s; p<0,001) und Cra1/SOD1 (17,6 ± 0,5 cm/s;

$p<0,001$) und SOD1 Tiere (25,4 ± 1,5 cm/s; $p<0,001$). Die zweitschnellste Gruppe waren die WT Tiere, die signifikant schneller Cra1 ($p<0,001$), Cra1/SOD1 ($p<0,001$) und SOD1 Tiere ($p<0,05$) schwammen. Die SOD1 Mäuse unterschieden sich signifikant von den Cra1 ($p<0,001$) und Cra1/SOD1 Tieren ($p<0,001$).
Die Altersgruppe der zwölf Monate alten Tiere zeigte ebenfalls signifikante Unterschiede ($p<0,001$) bei dem Vergleich der Genotypen. In dieser Altersklasse schwammen die WT Tiere durchschnittlich 23,4 ± 0,6 cm/s und unterschieden sich signifikant von den Cra1 (19,5 ± 0,7 cm/s; $p<0,001$) und P301L Mäuse (25,2 ± 1,0 cm/s; $p<0,001$). Die Cra1 Tiere zeigten eine signifikant langsamere durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit als die P301L Mäuse ($p<0,001$).
Der Vergleich der Altersklassen miteinander zeigte, dass die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit bei den WT ($p<0,001$; t-Test) und P301L Tieren ($p<0,001$; t-Test) signifikant mit dem Alter abnahm, wohingegen die der Cra1 Tiere im Mittle konstant blieb.

Zum Erfassen des Lernerfolgs wurde der erste Lauf des 10. Blocks (entspricht dem 19. Lauf, neue Position der Plattform) separat ausgewertet, indem die prozentuale Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Quadranten berechnet wurde. Dabei wurde der Quadrant, in welchem nun die Plattform stand, nicht berücksichtigt. Abbildung 34 zeigt die Verteilung der Aufenthaltsdauern der Tiere verschiedener Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate, wobei die genauen Werte mit den Standardabweichungen in Tabelle 15 aufgelistet sind.

Bei der Betrachtung der prozentualen Aufenthaltsdauern war zu erkennen, dass keine Gruppe eine signifikante Präferenz für einen Quadranten zeigte. Tendenziell hielten sich die WT, Cra1 und P301L Tiere in beiden Altersklassen gleich viel oder mehr in dem Quadranten auf, in welchem bis zum letzten Testlauf die Plattform stand. Bei den Cra1/SOD1 Tieren war eine Präferenz für den Quadranten, in dem Sie den Testlauf gestartet hatten (links angrenzender Quadrant), zu erkennen, wobei der rechts angrenzende Quadrant vernachlässigt wurde. Insgesamt wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

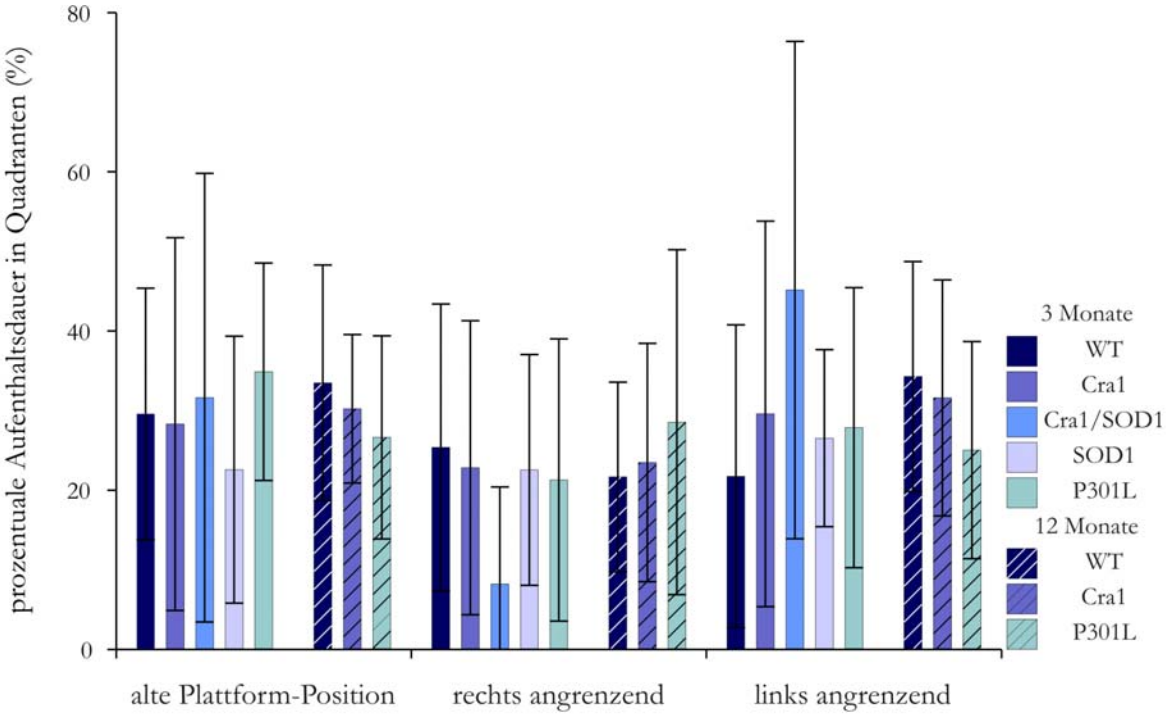



**Abbildung 34: Prozentuale Aufenthaltsdauern in den verschiedenen Quadarnten der drei und zwölf Monate alten Tiere beim 19. Lauf im Morris Water Maze. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung.**

**Tabelle 15: Werte der prozentualen Aufenthaltsdauern in den verschiedenen Quadranten der drei und zwölf Monate alten Tiere.**

| **3 Monate** | **alte Plattform-Position** | **rechts angrenzend** | **links angrenzend** |
|---|---|---|---|
| WT | 29,58 ± 15,79 % | 25,36 ± 18,02 % | 21,74 ± 19,02 % |
| Cra1 | 28,29 ± 23,42 % | 22,81 ± 18,47 % | 29,58 ± 24,22 % |
| Cra1/SOD1 | 31,62 ± 28,18 % | 8,21 ± 12,20 % | 45,14 ± 31,24 % |
| SOD1 | 22,57 ± 16,77 % | 22,54 ± 14,50 % | 26,53 ± 11,12 % |
| P301L | 34,88 ± 13,66 % | 21,29 ± 17,72 % | 27,85 ± 17,59 % |
| **12 Monate** | | | |
| WT | 33,48 ± 14,80 % | 21,66 ± 11,91 % | 34,28 ± 14,44 % |
| Cra1 | 31,28 ± 9,32 % | 24,01 ± 14,97 % | 31,44 ± 14,82 % |
| P301L | 26,63 ± 12,76 % | 28,54 ± 21,66 % | 25,03 ± 13,64 % |

## 3.7. Muskelhistologie

Bei der Untersuchung der Muskelhistologie wurden bei jeder Gruppe fünf Tiere verwendet.

### 3.7.1. Untersuchung der HE gefärbten Muskelschnitte des Musculus rectus femoris

Bei den WT Tieren zeigte sich wie in Abbildung 35A dargestellt ein gesunder Muskel. Die Muskelfasern waren polygonal konfiguriert und dicht gepackt, die Zellkerne randständig und spindelförmig. Die Septen waren gut voneinander abgetrennt.
Bei den Muskeln der Cra1 Tiere (Abb. 35B) gab es zum Teil leicht abgerundete und hypotrophe Muskelfasern. Abgesehen davon fielen leichte Schwankungen des Muskelfaserdurchmessers auf, die es so nicht bei den WT Tieren gab. Die Zellkerne waren unverändert.
Die Muskelfasern der Cra1/SOD1 Tiere (Abb. 35C) wiesen eine diskrete neurogene Veränderung in Form einer kleinen Gruppenatrophie vor, das heißt die Muskelfasern wiesen ein eckiges, elongiertes Aussehen auf (→ in Abb. 35C).
Bei den SOD1 Tieren (Abb. 35D) fiel eine deutliche Gruppenatrophie der Muskelfasern auf, neben den typischerweise auftretenden neurogen veränderten Muskelfasern (→ in Abb. 35D) waren auch hypertrophe Muskelfasern (# in Abb.35D) erkennbar. Abgesehen davon fielen aktivierte Zellkerne auf (> in Abb. 35D). Daneben kam es zu einer Vermehrung des Bindegewebes und zu Zellkern-Konglomeraten.
Die Muskelfasern der drei Monate alten P301L Tiere (Abb. 35H) zeigten keine Auffälligkeiten. Die Fasern waren polygonal und dicht gepackt. Die Zellkerne waren auch hier randständig und spindelförmig.
Die zwölf Monate alten WT Tiere (Abb. 35E) zeigten gesunde Muskelfasern und waren unauffällig.
Bei den alten Cra1 Tieren (Abb. 35F) kam es nur zu diskreten Veränderungen in Form von leicht aufgeplusterten und abgerundeten Zellen. Ansonsten waren diese Muskelfasern unauffällig.
Die Muskeln der zwölf Monate alten P301L Tiere (Abb. 35G) zeigten bis auf vereinzelte diskrete neurogene Veränderungen keine Auffälligkeiten.

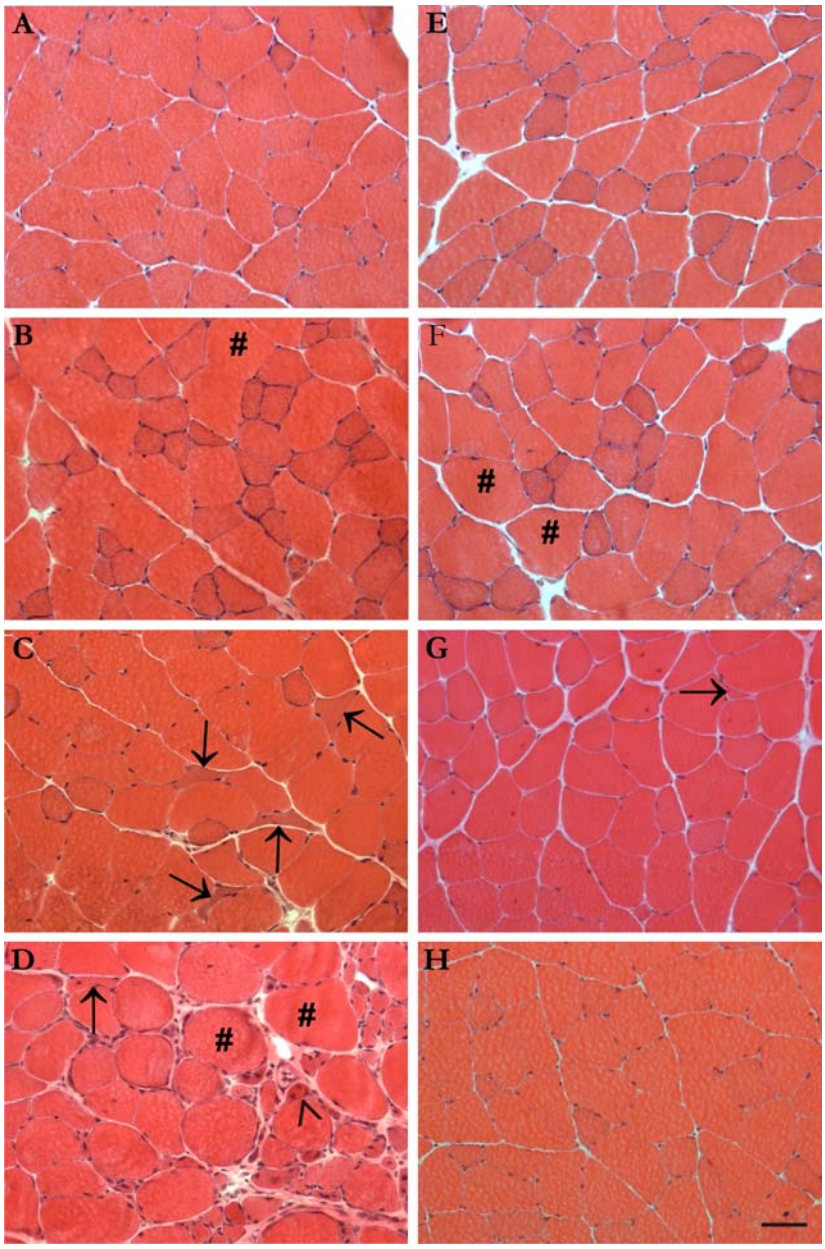



**Abbildung 35: HE-Färbung des Musculus rectus femoris. A: WT 3 Monate; B: Cra1 3 Monate; C: Cra1/SOD1 3 Monate; D: SOD1 3 Monate ; E: WT 12 Monate; F: Cra1 12 Monate; G: P301L 12 Monate; H: P301L 3 Monate. #: hypertrophe Muskelfasern; →: neurogen veränderte Muskelfsern; >: aktivierte Zellkerne. Maßstabsbalken 50 µm (20x Vergrößerung)**

Neben der histologischen Befundung wurde der durchschnittliche Muskelfaserdurchmesser der einzelnen Gruppen bei den HE gefärbten Muskelschnitten bestimmt (Abb. 36). Dabei stellte sich heraus, dass sich die Genotypen der drei Monate alten Tiere signifikant voneinander unterschieden (ANOVA, $p<0{,}001$). Die kleinsten Muskelfasern wiesen die SOD1 Tiere mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 29,0 ± 5,8 µm auf. Diese Gruppe unterschied sich damit signifikant von den WT (47,2 ± 2,4 µm; $p<0{,}001$), Cra1 (45,7 ± 2,5

µm; p<0,001) Cra1/SOD1 (39,6 ± 4,8 µm; p<0,01) und den P301L Tieren (43,5 ± 3,2 µm; p<0,001). Die Cra1/SOD1 Tiere nahmen bei dieser Messung tendenziell eine Position zwischen den Cra1 und SOD1 Tieren ein, wobei sie sich nicht signifikant von den Cra1 Tieren unterschieden.

Im Alter von zwölf Monaten zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den Genotypen. Genauso gab es mit zunehmendem Alter keine signifikante Veränderung im Durchmesser der Muskelfasern.

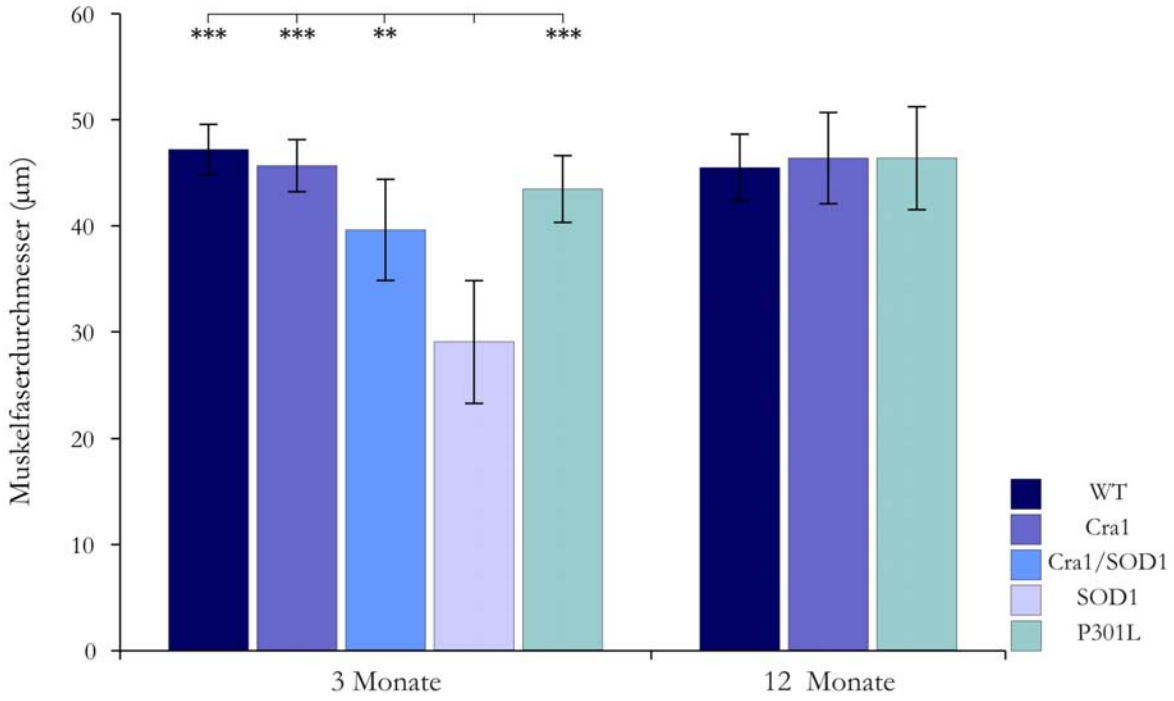



**Abbildung 36: Mittlerer Muskelfaserdurchmesser des Musculus rectus femoris der verschiedenen Genotypen in den beiden Altersklassen drei und zwölf Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** (p<0,01) und *** (p<0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

### 3.7.2. Untersuchung der Gomri-Trichrom gefärbten Muskelschnitte des Musculus rectus femoris

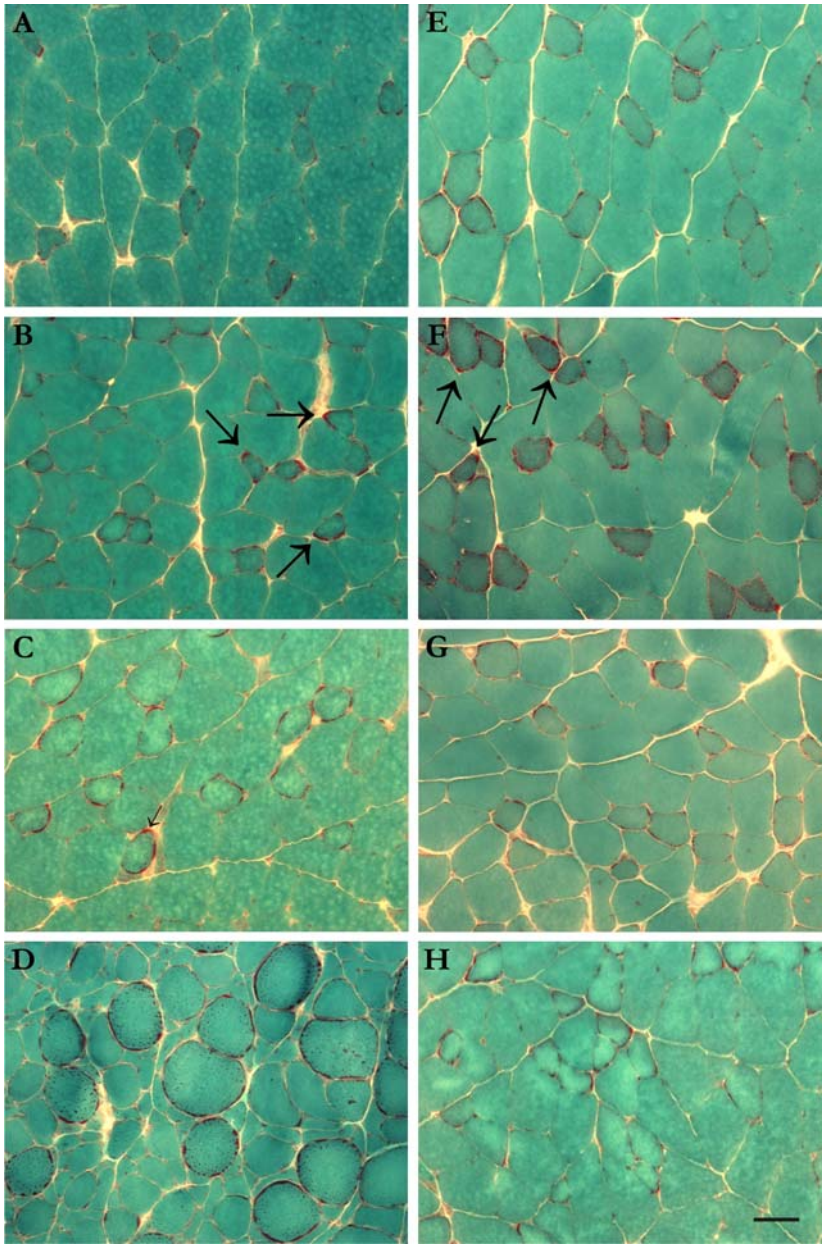



**Abbildung 37: Gomori- Färbung. A: WT 3 Monate; B: Cra1 3 Monate; C: Cra1/SOD1 3 Monate; D: SOD1 3 Monate; E: WT 12 Monate; F: Cra1 12 Monate; G: P301L 12 Monate; H: P301L 3 Monate. →: subsacrolemmale Kappenbildung. Maßstabsbalken 50µm (20x Vergrößerung)**

Die Gomori-Trichrom Färbung zeigte bei den WT Tieren in beiden Altersklassen, wie in Abbildung 37A und E zu sehen, eine normale Erscheinung der Muskelzellen. Hingegen wiesen die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere im Alter von drei Monaten (Abb. 37B und C) sowie die zwölf Monate alten Cra1 Tiere (Abb. 37F) einen roten Randsaum und eine Kappenbildung

(mit → in Abb. 37B, C und F gekennzeichnet) auf. Dabei handelte es sich um Mitochondrien, die bei Abnormalitäten unter das Sacrolemm wandern. Daher spricht man hier von Muskelfasern mit vermehrter subsacrolemmaler mitochondiraler Aktivität, wobei es teilweise zu einer subsacrolemmaler Kappenbildung kam.
Die Muskelfasern der SOD1 Tiere (Abb. 37D) wiesen hingegen mit den vergrößerten Zellen und den „Punkten" darin ein unspezifisches zytoplasmatisches Phänomen auf, das als Folge einer kompensatorischen Zellhyertrophie vorkommen kann. Man spricht dabei von einem vergröberten intramyofirbillärem Muster.
Die P301L Mäuse beider Altersklassen hatten ein ähnliches Erscheinungsbild wie die WT Tiere und zeigten keine Auffälligkeiten bezüglich einer Mitochondrienvermehrung auf.

### 3.7.3. Untersuchung des Musculus rectus femoris zur Unterscheidung der verschiedenen Muskelfasertypen

Bei der Antikörper-Färbung der verschiedenen Muskelfasertypen stellte sich heraus, dass in dem untersuchten Musculus rectus femoris keine Typ I Fasern bei der Maus vorkommen.
In Abbildung 38 sind die Färbungen gegen die Fasertypen IIa (in Abb. 38 grün und mit 1 gekennzeichnet) und IIb (in Abb. 38 blau und mit 2 gekennzeichnet) und die Überlagerung der beiden Bilder (in Abb. 38 mit 3 gekennzeichnet) bei den drei Monate alten Tieren dargestellt.
Die WT (Abb.38A), Cra1 (Abb. 38B), Cra1/SOD1 (Abb. 38C) und P301L Tiere (Abb. 38E) zeigten eine gleichmäßige Verteilung der beiden Fasertypen.
Die SOD1 Tieren (Abb. 38D) hingegen zeigten aufgrund der vorher schon genannten Veränderungen des Muskels ein anderes Aussehen. Die hypertrophen Muskelfasern traten hauptsächlich bei Typ IIa, dem ermüdungsresistenten Muskelfasertypen, auf. Bei den neurogen veränderten (eckig elongiert) Fasern handelte es sich schwerpunktmäßig um Typ IIb Fasern, die leicht ermüdende Muskelfasern sind.

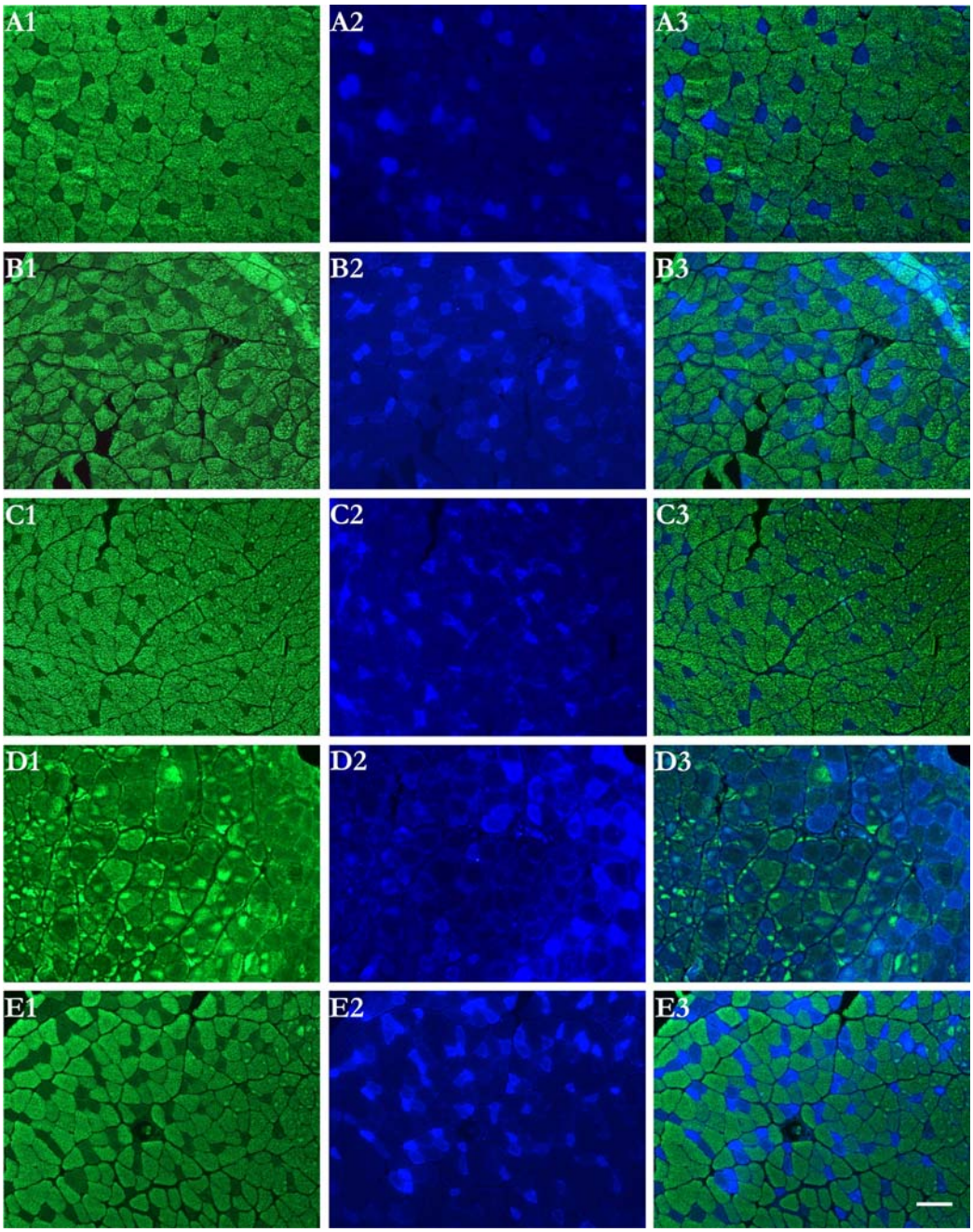



**Abbildung 38: Antikörper-Färbung der Muskelschnitte der drei Monate alten Mäuse. A: WT; B: Cra1; C: Cra1/SOD1; D: SOD1; E: P301L; 1: Anfärbung des Muskelfasertyps IIA; 2: Anfärbung des Muskelfasertyps IIB; 3: Überlagerung der Färbungen 1 und 2 Maßstabsbalken 100 µm (10x Vergrößerung)**

In Abbildung 40 sind die Antikörper-Färbungen der zwölf Monate alten Tiere zu sehen. Wie bei den Bildern der Muskeln der drei Monate alten Mäuse, sind die Fasertypen IIa (in Abb. 39 grün und mit 1 gekennzeichnet) und IIb (in Abb. 39 blau und mit 2 gekennzeichnet) und die Überlagerung der beiden Bilder (in Abb. 39 mit 3 gekennzeichnet) bei den drei Monate alten Tieren dargestellt. Wie bei der HE Färbung waren die Muskelfasern der WT (Abb. 39A), Cra1 (Abb. 39B) P301L Tiere (Abb. 39C) bei dieser Färbung unauffällig. Alle zeigten ein gleichmäßiges Verteilungsmuster der Fasertypen IIa und IIb und unterschieden sich nicht voneinander.

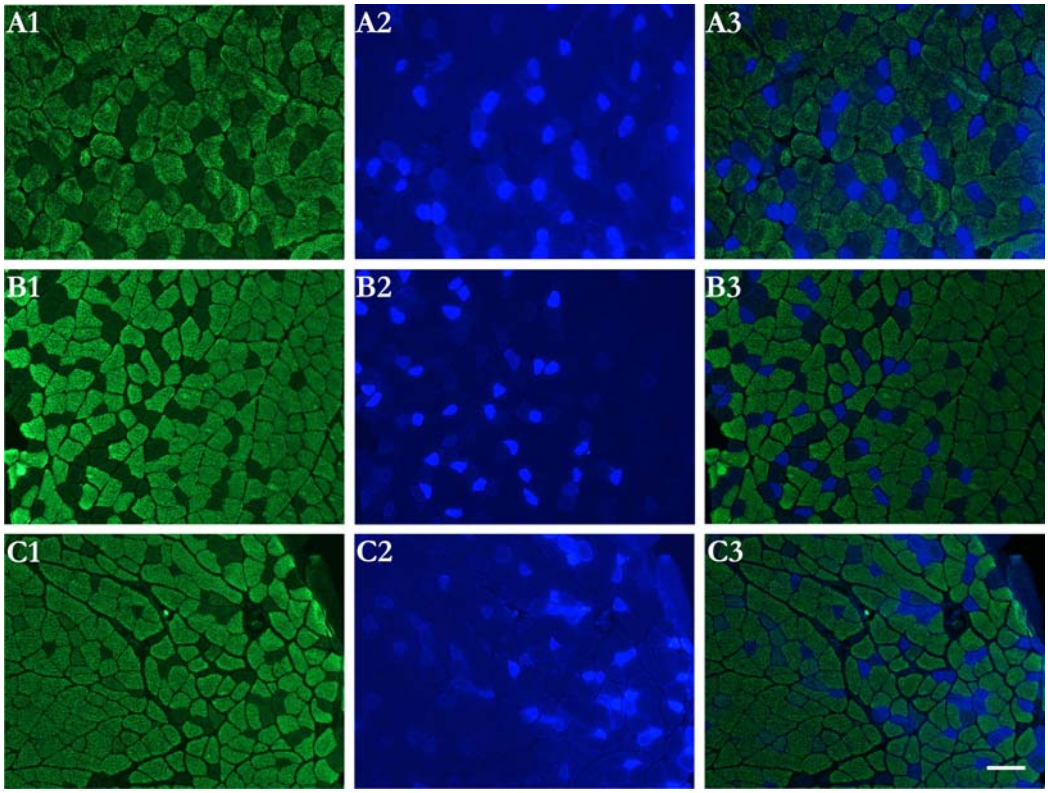



**Abbildung 39: Antikörper-Färbung der Muskelschnitte der zwölf Monate alten Mäuse. A: WT; B: Cra1; C: P301L. 1: Anfärbung des Muskelfasertyps IIA; 2: Anfärbung des Muskelfasertyps IIB; 3: Überlagerung der Färbungen 1 und 2. Maßstabsbalken 100 µm (10x Vergrößerung)**

# 4. Diskussion

Die neuronale Degeneration bei Motoneuronerkrankungen (MND) und die Auswirkungen auf Verhalten und Kognition ist ein Zusammenspiel von multiplen Prozessen, deren genaue Ursachen bis heute nicht geklärt sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine nähere Untersuchung dieses Zusammenspiels anhand des Verhaltens von Mäusen mit unterschiedlichem genetischem Hintergrund (Mausmodelle). Dies soll helfen, die Auswirkungen von bestimmten genetischen Veränderungen, die im Zusammenhang mit humanen Motoneuronerkrankungen stehen, auf motorische und kognitive Verhaltensweisen besser zu verstehen.

Die Grenze zwischen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) und anderen neurodegenerativen Erkrankungen wird immer fließender. So kann es bei Patienten mit Symptomen der ALS auch zu frontotemporalen Defiziten kommen (Talbot und Ansorge, 2006). Seit Mutationen in dem Motorprotein Dynaktin, welches in einem Komplex mit Dynein eine wichtige Rolle im axonalen retrograden Transport spielt, gefunden wurden, liegt auch die Vermutung nahe, dass ein gestörter axonaler Transport eine Rolle in der ALS-Pathogenese spielt (LaMonte et al., 2002). Eine Studie zeigte, dass es eine Familie gibt, bei der sowohl frontotemporale Demenzen (FTD) als auch typische MND auftreten können, der eine eine Dynaktinmutation zu grunde liegt. Dabei wiesen die betroffenen Familienmitglieder eine identische Mutationen im Dynaktingen auf (Munch et al., 2005).

In der Erforschung von MND bzw. der ALS stehen uns mehrere Mausmodelle zur Verfügung, jedoch sind diese bisher ausschließlich bezüglich der Motorik charakterisiert worden. Aus diesem Grund ist es wichtig, die vorhandenen Mausmodelle genauer zu charakterisieren, wobei nicht nur auf die motorischen, sondern auch auf die kognitiven Funktionen genau geachtet werden sollte, um alle relevanten Aspekte der Verhaltensänderungen bei unterschiedlichen Mausmodellen erfassen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde neben dem Mausmodell der SOD1-G93A Maus auch das neuere Modell der Cra1 Maus, die eine Mutation in dem Motorprotein Dynein trägt (Hafezparast et al., 2003), untersucht. Um eventuelle additive Effekte der beiden Modelle zu bewerten, wurden für die Untersuchung auch die doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Tiere herangezogen. Diese Maus wurde bisher nur bezüglich der motorischen Koordination und der Überlebensdauer betrachtet (Teuchert et al., 2006). Um einen möglichen Übergang zwischen der ALS und einer frontotemporalen Erkrankung bei diesen Mausmodellen bestimmen zu

können, wurde das transgene P301L-Mausmodell als Modell für eine Tauopathie, also für Erkrankungen, die im Zusammenhang mit Mutation im Tau-Gen stehen, untersucht. Die P301L Maus trägt die humane Mutation im Tau-Gen, welches bei Patienten mit einer frontotemporalen Demenz mit Parkinsonismus (FTDP-17) gefunden wurde (Gotz et al., 2001b). Es ist bekannt, dass diese Maus ein gesteigertes Explorationsverhalten und kognitive Defizite aufweist (Pennanen et al., 2004; Pennanen et al., 2006).

## 4.1. Allgemeine Bemerkungen zu den Versuchsmethoden und der Durchführung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Mausmodelle, Cra1, Cra1/SOD1 und SOD1, die bist jetzt zu den MND Mausmodellen gezählt wurden, mit gleichaltrigen WT Tieren und einem Mausmodell für eine Tauopathie (P301L) verglichen. Der Ausgangspunkt für diese Arbeit waren die zwei einzigen Veröffentlichungen zu den Cra1 Tieren, wobei bisher lediglich die motorische Koordination, die Muskelkraft und die Anzahl der alpha-Motoneurone im Rückenmark bestimmt wurden (Hafezparast et al., 2003; Teuchert et al., 2006).

In dieser Arbeit habe ich verschiedene Methoden zur Messung von Verhaltensweisen der Mäuse angewendet, und diese mit einer histomorphometrischen Untersuchung von Muskelproben ergänzt. Um eine aussagekräftige Charakterisierung der verschiedenen Mausmodelle zu gewährleisten, wurde bei der Auswahl der Verhaltenstests darauf geachtet, dass zum einen die untersuchten Aspekte, wie die sensorisch-motorischen Fähigkeiten, die motorische Aktivität, die kognitiven Fähigkeiten und das Explorations- und Angstverhalten mit mehreren Tests erfasst wurden und zum anderen, dass bei jedem Test jeweils mindestens 11 Versuchstiere teilnahmen, um eine ausreichende Grundlage für die statistische Beurteilung der Daten zu haben. Um eine gute Versuchsdurchführung zu gewährleisten, wurden Experimente ausgewählt, die in vielen Laboren sehr häufig verwendet und unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden können. Einige europäische Labore haben sich in einem Verbund namens „Eumorphia„ zusammengeschlossen und für eine Reihe von Verhaltensversuchen standardisierte Protokolle zur Durchführung (engl. Standard Operating Procedure: SOP) erarbeitet, die bei der Charakterisierung des Phänotyps eines Mausmodells helfen können. Unter anderem gehören hierzu der modifizierte SHIRPA Test, der Grip

Strength Test, der Rotarod Test (Karl et al., 2003), der Open Field Test (Karl et al., 2003) und der Test im Y-Labyrinth (Hughes, 2004). Diese Tests werden von allen teilnehmenden Laboren standardisiert durchgeführt. Die Protokolle sind auf der Webseite von Eumorphia (www.eumorphia.org) frei zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit habe ich diese standardisierten Protokolle verwendet und durch einige Tests wie dem String Agility Test, dem Elevated Plus Labyrinth und dem Morris Water Maze ergänzt. Der String Agility Test wird häufig für die Bestimmung der Agilität der Tiere verwendet (Arendash et al., 2001; Arendash and King, 2002; King and Arendash, 2002; Arendash et al., 2004). Das Elevated Plus Labyrinth ist das am häufigsten verwendete Paradigma, um bei Nagern das Angstverhalten zu untersuchen und findet ebenfalls in vielen Laboren Verwendung (Hartman et al., 2001; Miyakawa et al., 2001; Wall and Messier, 2002; Karl et al., 2003). Die klassische Methode für die Untersuchung des räumlichen Referenzgedächtnisses ist das Morris Water Maze. Dieser Test gehört zu den ältesten und am häufigsten verwendeten Versuchen um das Lernen bei Mäusen und Ratten zu bestimmen und gehört zu jeder guten Charakterisierung des Lernverhaltens eines Mausmodells (Morris et al., 1982; Upchurch and Wehner, 1988; Holcomb et al., 1999; Miyakawa et al., 2001; Arendash and King, 2002; King and Arendash, 2002; Pennanen et al., 2004; Kuteeva et al., 2005; Ramsden et al., 2005; Pennanen et al., 2006) Durch die Standardisierung der verschiedenen Experimente sind die in dieser Arbeit erhobenen Daten aussagekräftig und können, sofern vorhanden, mit Daten in der Literatur verglichen werden. Bezüglich der histologischen Bewertung der Muskulatur habe ich mich auf die standardisierten Methoden aus dem humanen Bereich für die Befundung und Bewertung von Patientenproben gestützt (Dubowitz and Sewry, 2007).

Zusammenfassend ist anzumerken, dass die unterschiedlichen Methoden zur Charakterisierung der verschiedenen Mausmodelle sehr gut geeignet sind, da sie viele Bereiche des Verhaltens (Motorik, Aktivität, Emotion, Motivation und Kognition) abdecken, die für Abweichungen durch genetische Mutationen bei diesen Mausmodellen zu erwarten sind. Mit Hilfe der Muskelhistologie kann geklärt werden, ob die pathologischen Veränderungen des Muskels von einer Störung der Motoneurone (neurogen) kommen oder myogen sind. Durch diese komplexe Untersuchung können die verschiedenen Mausmodelle eindeutiger den verschiedenen Krankheitsbildern zugeordnet werden.

## 4.2. Zusammenfassung der Ergebnisse

Bezüglich der Charakterisierung der Cra1 Tiere sind folgende Ergebnisse der verschiedenen Tests wichtig:

1. Die Cra1 Tiere wiesen ein Defizit bei der Agilität, der motorischen Koordination und der Muskelkraft auf. Dies zeigt, dass sie im Bereich der Motorik beeinträchtigt sind, was zu den bisherigen Beschreibungen der Cra1 Maus durch Hafezparast et al (2003) und Teuchert et al. (2006) passt.
2. Die Tests zur motorischen Aktivität zeigten, dass die Cra1 Tiere eine ausgeprägte Hyperaktivität aufwiesen. Diese Ergebnisse passen zu keinem der bestehenden Mausmodelle für MND, da bei diesen noch nie eine Hyperaktivität gefunden wurde. Vergleicht man diese Hyperaktivität und die verschlechterte Koordination mit in der Literatur beschriebenen Mausmodellen, so passt das Cra1 Mausmodell zu Mäusen, die striatale Defizite aufweisen.
3. Die Cra1 Tiere zeigten im Open Field ein vermindertes Angstverhalten, wobei dieses durch die Hyperaktivität erklärt werden kann.
4. Bei den Experimenten zur Bestimmung des Lernverhaltens ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Cra1 und WT Tieren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Dyneinmutation keine Neurone in Gehirnbereichen, die für das Lernen wichtig sind, beeinträchtigt.
5. Die Muskeluntersuchungen ergaben, dass die Muskelschwäche der Cra1 Tiere durch eine myogene Veränderung der Muskeln erklärt werden kann, und damit diese Veränderung keinen neurogenen Ursprung hat.

Weitere wichtige Beobachtungen waren, dass sich die doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Tiere bei fast allen Tests wie die Cra1 Tiere verhielten. Sie zeigten gleiche motorische Defizite und eine Hyperaktivität wie die Cra1 Tiere. Daraus kann geschlossen werden, dass die Cra1-Mutation nicht die Symptomatik der SOD1 Tiere lindert, sondern weitere Veränderungen bei den Tieren verursacht.

Abgesehen von diesen Ergebnissen, zeigte sich bei den SOD1 Tieren, dass diese, wie auch die P301L Tiere, im Alter von drei Monaten ein verbessertes räumliches Referenzgedächtnis als die gleichaltrigen Wildtyp (WT) Tiere aufwiesen.

Im Folgenden werde ich die hier genannten Ergebnisse diskutieren.

## 4.3. Allgemeiner Gesundheitszustand

Die Cra1 Mäuse zeigten von Beginn an eine signifikant veränderte Beinstellung (krampfartiges Anziehen der Hinterbeine siehe Abschnitt 3.1.). Damit konnten die zuvor von Hafeezparast et al. (2003) publizierten Daten der Cra1 Tiere bestätigt werden. Die doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Mäuse zeigten die gleiche Beinstellung wie die Cra1 Tiere, indem sie die Hinterbeine krampfartig an den Rumpf zogen. Daher kann ich daraus schließen, dass es bei diesen Tieren zu einer muskulären Veränderung der Hinterbeine gekommen ist. Ein weiteres Indiz dafür, dass eine Veränderung der Hinterbeinmuskulatur vorliegt, ist der verzögerte Aufstellreflex der Cra1 und Cra1/SOD1 Mäuse, der daran zu erkennen ist, dass die betroffenen Tiere in der engen Plexiglasröhre zuerst den Vorderkörper in die aufrechte Position drehten und erst dann den Hinterkörper aufrichteten. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die koordinativen Defizite wäre eine Schädigung eines Hirnareals, welches für die Steuerung der Bewegung zuständig ist, wie das Corpus striatum. Die SOD1 Mäuse zeigten im Alter von drei Monaten noch keinerlei Anzeichen von Paresen. Eine frühere Charakterisierung dieses Mausmodells beschreibt ebenfalls, dass erste Anzeichen für Paresen ab einem Alter von 13 Wochen auftreten (Miana-Mena et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere bis auf die koordinativen Tests (Beinstellung, Aufstellreflex) keinerlei Einschränkung im allgemeinen Gesundheitszustand zeigten. Diese Defizite könnten durch eine Fehlfunktion der Neurone im Striatum erklärt werden, wie sie zum Beispiel bei Chorea Huntington vorkommt. Bei dieser Erkrankung kommt es durch den Verlust der hemmenden Neurone zu Schwierigkeiten bei der Koordination von Körperbewegungen (Hickey et al., 2005).

## 4.4. Agilität und Muskelkraftmessung

Die Tests zur Agilität und Muskelkraftmessung zeigten(String Agility und Grip Strength Test), dass auch hier die Cra1 und Cra1/SOD1 Mäuse Veränderungen aufwiesen (siehe Abschnitt 3.2). Die verminderte Agilität kann durch die Koordinationsschwierigkeiten der Hinterbeine erklärt werden. Sobald sie an der Schnur hingen, zogen Tiere mit einer Dyneinmutation die Hinterbeine an und konnten daher diese nicht zum Erklimmen der Schnur benutzen. Des

Weiteren wiesen diese Tiere eine verminderte Muskelstärke in den Vorderbeinen auf, was wiederum die Ergebnisse des String Agility Tests stützt. Hafezparast et al. (2003) zeigten ebenfalls, dass 3 und 16 Monate alte Cra1 Tiere eine verminderte Muskelstärke aufweisen. Hafezparast und Kollegen sprachen dabei von einem progressiven Verlust der Muskelstärke und nicht von einer altersgemäßen Verschlechterung, wie es bei den Tieren in der vorliegenden Arbeit angenommen werden kann. Die Messungen von Hafezparast wurden jedoch nicht nach meinem in dieser Arbeit verwendeten standardisierten Protokoll durchgeführt und sind daher schwer mit den Daten der aktuellen Studie zu vergleichen. Hafezparast et al. normierten die Daten bei beiden Untersuchungszeitpunkten auf die Werte der gleichaltrigen WT Tiere. Da er und seine Kollegen die Normierung nur auf die jungen WT Tiere bezogen, wurde dadurch die normale Alterung des Muskels und der damit einhergehenden altersgemäßen Abnahme der Muskelkraft bei gesunden Tieren nicht berücksichtigt. Durch diese Art der Normierung kann er nicht aussagen, ob es sich bei dem Verlust der Muskelkraft um eine altergemäße, wie auch bei WT Tieren vorkommende, Verschlechterung handelt, oder ob diese aufgrund der Mutation zustande kam. Bei dem Kreuzungsversuch der Loa Maus (ebenfalls eine Dyneinmutation) mit den SOD1 Tieren ergaben sich bei der Messung der Ermüdung des EDL Muskels (ein schnell kontrahierender Muskel, der bei wiederholtem Reizen schnell ermüdet), bei den Loa und Loa/SOD1 Tieren keine Unterschiede zu den WT Tieren (Kieran et al., 2005). Lediglich die SOD1 Tiere zeigten im Alter von 120 Tagen, dass sich die Ermüdung dieses Muskels nicht einstellte, was einen Hinweis auf einen histologischen Umbau dieses Muskels ergab (Kieran et al., 2005). Bei weiterführenden Tests im Rahmen einer Kooperation mit dem Labor von J-P Löffler in Strasbourg (Frankreich), zeigten sich Veränderungen in der elektrischen Aktivität des Muskels bei der elektromyographischen Messung (EMG) bei den SOD1 Tieren (Luc Depuis, persönliche Kommunikation), jedoch keinerlei Veränderungen bei den Cra1 Mäusen. Zur besseren Beurteilung für den Grund dieser Verschlechterung der Muskelkraft sind weitere Untersuchungen an den Muskeln notwendig.

Zusammenfassend kann man schließen, dass es sich bei den Cra1 Tieren nicht ausschließlich um ein Modell des Verlusts von Motoneuronen handeln kann, da einige klassische Aspekte, wie zum Beispiel die Veränderung der elektrischen Aktivität im Muskel vergleichbar zu den SOD1 Mäusen, fehlten. Abgesehen davon kommt es bei den Cra1 Tieren zu keiner abnormalen progressiven Verschlechterung der Muskelkraft mit dem Alter, wie sie bei Degenerationen von Motoneuronen im Rückenmark zu erwarten wäre. Bei Verlust von

Motoneuronen im Rückenmark verlieren Muskeln ihre Innervation und zeigen dadurch deutliche Paresen, was bei den Mäusen der aktuellen Studie nicht beobachtet werden konnte.

## 4.5. Motorische Koordination und Aktivität

Ein bisher gut untersuchter Verhaltensaspekt bei den Tieren mit einer Dyneinmutation (Cra1 und Cra1/SOD1) ist das Laufverhalten auf dem Rotarod (Teuchert et al., 2006). Die Ergebnisse der drei Monate alten Tiere bestätigen die erhobenen Daten der Cra1, Cra1/SOD1, SOD1 und WT Tiere von Teuchert et al. (2006). Auch hier zeigten die Tiere, die eine Dyneinmutation trugen, ein deutlich schlechteres Laufvermögen auf dem sich beschleunigenden Zylinder des Rotarods. Bisher wurden die Defizite auf dem Rotarod ausschließlich mit der Degeneration der Motoneurone im Rückenmark erklärt. Als weitere Erklärung für diese koordinative Schwäche wäre eine schon in Abschnitt 4.3. erwähnte Fehlfunktion des Corpus striatum möglich. Dagegen zeigten die P301L Tiere keine Auffälligkeiten bei diesem Test. Pennanen et al. (2004) zeigten zunächst, dass die P301L Tiere länger auf dem Rotarod laufen konnten. Wurden hingegen die Daten unter Berücksichtigung des Gewichts ausgewertet, fielen bei dieser Studie die signifikanten Unterschiede weg. Die SOD1 Tiere zeigten ebenfalls keine Einschränkung in diesem Test, was sich gut mit den Daten von Smittkamp et al. (2008) deckt, wo die SOD1 Tiere erst zu einem späteren Zeitpunkt eine signifikante Verschlechterung zeigten.

Ausgehend von der verschlechterten motorischen Koordination bei den Cra1 und Cra1/SOD1 Tieren wurden die motorischen Fähigkeiten der Tiere genauer mittels des Open Field Tests betrachtet. Dabei wurde die motorische Aktivität unter Berücksichtigung der zurückgelegten Strecke und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit in der 30-minütigen Untersuchungsdauer bestimmt. Es war auffällig, dass die drei Monate alten Tiere mit der Dyneinmutation (sowohl die Cra1 als auch die Cra1/SOD1 Tiere) eine deutlich größere Strecke als die WT und SOD1 Tiere zurücklegten und damit dem Tauopathie-Modell der P301L Maus ähnelten. Auch neue Untersuchungen zeigten bei Tieren in diesem Alter (3 Monate) keinen Unterschied zwischen den SOD1 und WT Tieren in der zurückgelegten Strecke auf (Smittkamp et al., 2008). Abgesehen von der größeren Strecke bewegten sich die Cra1, Cra1/SOD1 und P301L Mäuse auch sehr viel schneller vorwärts als die SOD1 und WT Tiere. Im Alter von zwölf Monaten waren nur die Cra1 Mäuse schneller und die P301L Mäuse

dagegen unauffällig. Das gleiche Phänomen konnte ebenfalls in dem fünfminütigen Test im Y-Labyrinth gemessen werden. Auch hier waren die Cra1 Tiere deutlich länger und schneller unterwegs als die gleichaltrigen WT Tiere. Diese Tendenz zeigte sich auch bei den Cra1/SOD1 Mäusen. Die bisher veröffentlichten Daten bezüglich der gelaufenen Strecke im Open Field besagen, dass sich bei den P301L Tieren erst ab einem Alter von zwölf Monaten eine Erhöhung der Laufstrecke nachweisen lässt (Pennanen et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigen meine Daten ein konträres Bild auf, da die jungen Tiere eine deutliche Hyperaktivität zeigten, die sich allerdings bei den alten P301L Tiere nicht mehr nachweisen ließ.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Tiere mit einer Dyneinmutation Defizite in der Koordination auf dem Rotarod zeigten, jedoch keine Einschränkung bei der Fortbewegung auf der Ebene aufwiesen. Konträr dazu zeigten sie in den Versuchen eine ausgeprägte Hyperaktivität auf, die ähnlich der der jungen P301L Tiere war. Diese Erkenntnisse lassen Zweifel an den Schlussfolgerungen aus der Erstbeschreibung der Cra1 Tiere aufkommen (Hafezparast et al., 2003), da bisher keine Hyperaktivität bei Mausmodellen für MND beschrieben wurde. Vergleicht man hingegen die Defizite in der motorischen Koordination, im speziellen die Hinterbeinstellung und die Hyperaktivität der Cra1 Tiere, so gleicht dies den Mausmodellen, die Defizite im Striatum haben. Beispielsweise wurde bei vier Wochen alten R6/2 und R6/1 Tieren, etablierte Mausmodelle für die Huntington Erkrankung, ebenfalls Hyperaktivität beschrieben (Luesse et al., 2001; Bolivar et al., 2004). Des Weiteren wurde bei R6/2 Tieren beschrieben, dass diese sowohl einen Hinterbeinphänotyp, vergleichbar dem der Tiere mit einer Dyneinmutation, als auch eine Schwäche auf dem Rotarod zeigten (Carter et al., 1999). Auch bei anderen Mausmodellen wird neben einem Hinterbeinphänotyp, ähnlich wie bei den Cra1 und den doppel-transgenen Cra1/SOD1 Mäusen, eine Hyperaktivität beschrieben, wie bei den BDNF +/- Mäusen (Baquet et al., 2004) oder PGC-1alpha Tieren (Lin et al., 2004). Diese Tiere weisen keinen Verlust an Motoneuronen auf. Diese vier genannten Maumodelle haben alle eine striatale Degeneration gemeinsam. Ausgehend davon können die Cra1 Tiere nicht zu den MND Mausmodellen gezählt werden, sondern zu Modellen mit striatalen Defiziten. Um diese Hypothese zu bestätigen sind weitergehende Untersuchungen der Cra1 Tiere notwendig. Dabei sollte das Striatum der Tiere mittels immunhistochemischer Methoden untersucht werden, damit eine eindeutige Zuordnung dieses Modells zu dieser Gruppe von neuroodegenerativen Erkrankungen möglich ist.

## 4.6. Explorations- und Angstverhalten

Das Explorationsverhalten setzt sich aus den beiden Faktoren der natürlichen Neugierde, die neue Umgebung zu erkunden, und der Angst, sich dabei in Gefahr zu begeben und einem eventuellen Fressfeind zu begegnen, zusammen. Daher ist es schwierig, Erkundungsverhalten und Angst bei Tieren getrennt zu untersuchen. Die gewonnenen Ergebnisse meiner Untersuchungen des Explorationsverhaltens bestätigen die bisher erhobenen Daten bezüglich der P301L Mäuse. Wie auch bei meinen Messungen, zeigten sich bei den Tests von Pennanen et al. (2004, 2006), dass sich die P301L Tiere in dem Open Field häufiger auf die Hinterbeine stellen als die anderen Kontrollgruppen. Diese Tendenz ist schon bei den drei Monate alten Tieren vorhanden, wird jedoch erst ab einem Alter von zwölf Monaten signifikant. Bei den anderen Genotypen zeigten sich keinerlei Unterschiede in diesem Parameter. Bei der Messung der Anzahl der Besuche im Zentrum des Open Fields wurden im Alter von drei Monaten deutliche Unterschiede zwischen den Cra1, Cra1/SOD1 und P301L Tieren im Vergleich zu den SOD1 und WT Mäusen gefunden. Diese Genotypen betraten deutlich öfter das Zentrum und bewegten sich dabei auch schneller darin fort, wobei nur bei den Cra1 Tieren die Geschwindigkeit signifikant erhöht war. Diese Ergebnisse entsprechen den Versuchen von Pennanen et al. (2006) bei elf Monate alten P301L Mäusen. Dies würde bei den Cra1 und Cra1/SOD1 Tieren auf ein gesteigertes Explorationsverhalten hinweisen. Die häufigeren Besuche im Zentrum könnten jedoch auch mit der in dem Abschnitt 4.3. diskutierten Hyperaktivität erklärt werden, da diese beiden Mausgruppen auch kein gehäuftes Rearing zeigten, mit welche bei dem Test im Open Field das Explorationsverhalten gemessen wird.
Ein weiteres Kriterium zur Untersuchung des Explorationsverhaltens ist die Latenzzeit, d.h. die Zeit, welche die Maus benötigt, um sich aus dem Startarm des Y-Labyrinths zu bewegen. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen in beiden Altersklassen. Mit dem Test des Elevated Plus Labyrinths, als ein klassisches Paradigma des Angstverhaltens, konnten keinerlei signifikante Veränderungen bei dem Vergleich der Genotypen im Alter von drei Monaten festgestellt werden. Die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere hielten sich etwas seltener in den geschlossenen Armen des Elevated Plus Labyrinths (siehe Abb. 8) auf, wobei sie dadurch nicht häufiger in den offenen Armen anzutreffen waren. Das zeigt, dass die Tiere in der Zwischenzeit im Zentrum saßen und sich nicht dazu entscheiden konnten, die offenen Arme zu betreten. Im Alter von zwölf Monaten festigte sich dieses Verhalten bei den Cra1 Tieren, so dass sich diese signifikant kürzer in den geschlossenen Armen aufhielten als die gleichaltrigen WT und P301L Mäuse. Hier ist jedoch hinzuzufügen,

dass sich die Aufenthaltsdauern in den offenen Armen nicht signifikant zwischen den Genotypen unterschieden, wobei eine leichte Tendenz zum längeren Aufenthalt der Cra1 Tiere erkennbar war.
Diese Ergebnisse geben keine direkten Hinweise auf Veränderungen im Angstverhalten der Cra1 Tiere. Es kann lediglich auf eine gewisse Unschlüssigkeit der Tiere geschlossen werden, da die Tiere häufiger im Zentrum des Elevated Plus Labyrinths saßen und sich nicht entscheiden konnten, ob sie in einen geschlossenen oder offenen Arm laufen sollten. Um dies genauer zu untersuchen, müsste man die Tiere in einem anderen Labyrinth ohne eine solche Zentrumszone untersuchen. Dazu könnte man ein Elevated O Labyrinth benutzen, das abwechselnd offene und geschlossene Arme hat.

Zusammenfassend lässt sich bei der Untersuchung des Explorationsverhaltens und des angstbezogenen Verhaltens sagen, dass die P301L Tiere im Alter von drei Monaten ein gesteigertes Explorationsverhalten aufweisen, gekoppelt mit einer größeren Neugierde. Bei reiner Betrachtung der Ergebnisse der Anzahl der Besuche im Zentrum des Open Fields kann auch ein ähnliches, wenn auch nicht so stark ausgeprägtes, Verhalten bei den Cra1 und Cra1/SOD1 Tieren in dieser Altersklasse gefunden werden. Die häufigeren Besuche können jedoch bei diesen Tieren auch mit der erwähnten Hyperaktivität erklärt werden. Eventuell nutzen die Mäuse die gesamte Fläche des Open Fields, da sie einen gesteigerten Bewegungdrang besitzen.
Bezüglich des Angstverhaltens können mit dem Elevated Plus Maze keine Unterschiede bestimmt werden. Die Cra1 Tiere sollten in einem weiteren Test, zum Beispiel dem Elevated O Labyrinth, getestet werden, um die hier vorgestellten Tendenzen im Verhalten der Tiere zu bestätigen oder zu widerlegen.

## 4.7. Lernverhalten

Bei den Untersuchungen zum Lernverhalten wurde sowohl das räumliche Arbeitsgedächtnis und als auch das räumliche Referenzgedächtnis analysiert. Mit dem Paradigma des Y-Labyrinths wird das spontane Alternationsverhalten der Tiere erfasst, das in Untersuchungen des Lernverhaltens als Maß für das räumliche Arbeitsgedächtnis dient. Für die Bestimmung des räumlichen Referenzgedächtnisses wurde das Morris Water Maze benutzt. Beide

Methoden wurden ebenfalls bei der ersten Charakterisierung der P301L Tiere genutzt (Pennanen et al., 2006).

Bei der Untersuchung des räumlichen Arbeitsgedächtnisses mit dem Y-Labyrinth zeigte sich, dass bei den verschiedenen Genotypen im Alter von drei Monaten keinerlei Unterschiede im spontanen Alternationsverhalten. Eine Änderung dieses Verhaltens konnte dagegen bei den zwölf Monate alten P301L Tieren nachgewiesen werden und unterschied sich dabei signifikant von den gleichaltrigen WT und Cra1 Tieren. Wichtig ist, dass sich bei den P301L Tieren keine Unterschiede in der Gesamtanzahl der Armeintritte zeigten, so dass man auf einen ähnlichen Aktivitäts- und Motivationsstatus wie bei den anderen Genotypen schließen kann. Dahingegen zeigten die Cra1 Tiere in beiden Alterklassen eine erhöhte Gesamtzahl der Armeintritte, was wiederum die erhöhte Aktivität dieses Genotyps bestätigt.
Bei der Untersuchung des räumlichen Referenzgedächtnisses mit dem Morris Water Maze zeigte sich, das alle Genotypen in beiden Altersklassen fähig waren, die unter Wasser liegende Plattform zu finden. Jede Gruppe zeigte dabei eine klassische Lernkurve, die durch eine Lernphase und eine Plateauphase gekennzeichnet ist. Während der Lernphase verbesserten die Tiere ihre Leistung stetig. Stellte sich eine stabile Leistung der Tiere ein, so ging die Kurve in die Plateauphase über, welche das erreichte Lernniveau widerspiegelte. Damit die Lernkurven der verschiedenen Gruppen miteinander verglichen werden konnten, wurden die Lern- und Plateauphase getrennt voneinander analysiert.
Diese Auswertungsmethode ergab für die beiden Parameter, Schwimmdauer und -strecke, dass die P301L und SOD1 Tiere im Alter von drei Monaten die steilsten Lernkurven aufwiesen, wobei sich aber das erreichte Lernniveau dieser beiden Gruppen signifikant unterschied. Die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere zeigten beim Erlernen des Findens der Plattform keine Unterschiede zu den WT Tieren. Bei den zwölf Monate alten Tieren der verschiedenen Versuchsgruppen stellte sich dies anders dar. Die P301L Tiere zeigten die signifikant flachste Lernkurve, wohingegen sich die Cra1 nicht von den WT Tieren unterschieden. Andere Untersuchungen der P301L Tiere zeigten ebenfalls eine signifikante Verschlechterung des Lernvermögens mit zunehmendem Alter (Pennanen et al., 2006). Dies spiegelt sich auch in der Höhe des erreichten Lernniveaus der zwölf Monate alten Tiere wider, die P301L Tiere schnitten am schlechtesten ab.
Betrachtet man außerdem die durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit, so zeigt sich, dass die Gruppen mit einer Dyneinmutation, sprich die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere, eine

beträchtlich geringere Schwimmgeschwindigkeit aufwiesen, was sich mit den schon vorher diskutierten motorischen Koordinationsproblemen deckt (siehe Abschnitt 4.5.).
Diese Daten zeigen eindeutig, dass die P301L Tiere mit dem Alter eine Schwäche bei diesem Lernparadigma entwickeln. Die erhobenen Daten decken sich dabei mit den histologischen Befunden von Pennanen et al. (2004, 2006), die besagen, dass die P301L Tiere mit zunehmendem Alter neurofibrilläre Bündel im Hippocampus, eine für das Lernen wichtige Region des Gehirns, entwickeln.
Bei der Überprüfung der Gedächtnisfunktion mit Hilfe der Auswertung der Aufenthaltsdauern der Tiere in den verschiedenen Quadranten bei Lauf 19 und damit dem ersten Lauf, in welchem die Plattformposition geändert wurde (siehe Abschnitt 2.7.8.), zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bzw. Präferenzen der verschiedenen Genotypen und Altersklassen für einen bestimmten Quadranten. Dieser als zunächst erscheinende Widerspruch zu dem hohen Lernniveau der P301L Tiere könnte dadurch erklärt werden, dass diese Gruppe nicht auf die Findung der Plattformposition trainiert ist, sondern stattdessen auf den Aspekt des Findens einer Plattform.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere keinerlei Lernschwierigkeiten zeigen, weder bei dem räumlichen Arbeitsgedächtnis noch dem Referenzgedächtnis. Die kleinen Unterschiede der Cra1/SOD1 Tiere im Morris Water Maze lassen sich durch die Koordinationsschwäche der Hinterbeine erklären. Es kann demnach postuliert werden, dass die Dyneinmutationen keinen Einfluss auf Bereiche des Gehirns haben, welche für das Lernen wichtig sind. Eine neue Erkenntnis bezüglich der SOD1 Tiere ist, dass diese eine schnellere Lerngeschwindigkeit als die WT Tiere aufweisen.

## 4.8. Muskelhistologie

Mit Hilfe histologischer Untersuchungen von Muskeln kann man deutliche Hinweise für den Grund der Veränderung der Muskeleigenschaften erhalten. Weist ein Muskel eckig elongierte Muskelfasern auf, so ist dies meist ein Zeichen für eine Schädigung des innervierenden Motoneurons (Frey et al., 2000; Fischer and Glass, 2007) und wird als neurogene Veränderung bezeichnet. Je nach Erkrankung treten diese neurogen veränderten Muskelzellen vereinzelt oder in einer Gruppenatrophie auf (Dubowitz and Sewry, 2007).

Geht man, wie in der Literatur beschrieben (Hafezparast et al., 2003), bei den Cra1 Tieren von einer Degeneration der Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks aus, so müssten sich spezifische neurogene Veränderungen in den Muskelfasern manifestieren, welche von diesen Motoneuronen innerviert wurden. Dafür habe ich zunächst den rechten Musculus rectus femoris des Musculus quadriceps nach der HE Methode gefärbt und charakterisiert. Dabei zeigten die drei Monate alten SOD1 Tiere, die bis dahin in den Verhaltensuntersuchungen motorisch unauffällig waren und bei denen auch erst ab dem Tag 100 die ersten Paresen beschrieben wurden (Teuchert et al., 2006), eine deutliche neurogene Veränderung des untersuchten Muskels. Das heißt, dass es aufgrund einer fehlenden oder abgeschwächten motorischen Innervierung zu diesen Veränderungen kommt. Es waren klare Gruppenatrophien in mehreren Septen der Muskeln erkennbar. Dies ist typisch, da ein Motoneuron mehrere Muskelfasern innerviert. Geht dieses Motoneuron zu Grunde, so degenerieren die entsprechenden Muskelfasern, indem sie eine eckig, elongierte Form annehmen und immer kleiner werden. Als Kompensationsmaßnahme werden einige Muskelfasern hypertroph. Dieser Phänotyp ist bei den SOD1 Tieren deutlich ausgeprägt, wobei auch der mittlere Muskelfaserdurchmesser signifikant abnimmt. Dies wurde auch bereits in anderen Studien mit SOD1 Tieren beschrieben (Schutz et al., 2005). Bei den doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Tieren hingegen kommt es im Alter von drei Monaten nur zu einem diskreten Umbau der Muskelfasern. Diese Veränderungen waren weitgehend unauffällig in der H&E Färbung und auch der Muskelfaserdurchmesser unterschied sich nicht signifikant, wobei es eine Tendenz zu geringeren Durchmessern gab (siehe Abschnitt 3.7.1.). Die Cra1 Tiere zeigten dahingegen keine eindeutigen, auf neurogene Ursachen zurückzuführende Veränderungen der Muskelfasern, wobei vereinzelt zu hypertrophen Zellen auftraten. Dies ist ein eindeutiges Indiz dafür, dass es nicht, wie bisher in der Literatur für die Cra1 Tiere beschrieben (Hafezparast et al., 2003), zu einem Motoneuronenverlust kommt. Dort wurde ein Muskel, der nicht genauer benannt wurde, histologisch untersucht und die Aussage getroffen, dass es im alternden Muskel zu einer Dominanz des Fasertyps I kommt, wobei nicht genauer darauf eingegangen wurde.

Um den Musculus rectus femoris weiter zu untersuchen, wurde eine Gomori-Trichrom-Färbung durchgeführt. Dabei zeigte sich bei den Cra1 und Cra1/SOD1 Tieren bei kleineren Muskelfasern ein roter Randsaum und eine Kappenbildung. Diese Muskelfasern hatten eine vermehrte subsarcolemmale mitochondriale Aktivität, mit einer teilweisen subsarcolemmalen Kappenbildung an den Muskelfasern. Dies ist charakteristisch für Störungen in den Mitochondrien (meist handelt es sich um Atmungskettendefekte). Bisher wurden noch keine

Muskeln von Mäusen mit diesem Phänomen beschrieben und daher existieren keine entsprechenden Referenzwerte in der Literatur. Die Auffälligkeiten der Mitochondrien weisen auf eine myogene Veränderung der Muskelfasern hin, das heißt, dass es nicht aufgrund einer fehlenden oder abgeschwächten Innervierung zu diesen Veränderungen kommt, sondern durch myogene Faktoren, die den Muskel verändern. Diesbezüglich müsste man noch weitere biochemische Untersuchungen durchführen, um den genauen Grund für diese Störung in den Mitochondrien zu entdecken.
Als letzte Untersuchungsmethode wurden die Schnitte mit drei spezifischen Antikörpern gegen die Muskelfasertypen I, IIa und IIb gefärbt. Mit dieser Methode sollte ein genaueres Bild von der Verteilung dieser Muskelfasertypen innerhalb des Muskels möglich sein. Dabei stellte sich heraus, dass sich im Musculus rectus femoris des Musculus quadriceps nur die Typen IIa und IIb nachweisen ließen. Es konnten keinerlei Unterschiede bei den Verteilungsmustern zwischen den WT, Cra1, Cra1/SOD1 und P301L Mäusen festgestellt werden. Interessant war hingegen, dass bei den SOD1 Tieren die hypertrophen Muskelfasern hauptsächlich bei Typ IIa, einem ermüdungsresistenten Typ, auftraten, und dass es sich bei den neurogen veränderten, eckig elongierten Fasern hauptsächlich um Typ IIb Fasern (leicht ermüdende Muskelfasern) handelt.

Zusammenfassend ergibt sich, dass die Cra1 Tiere kein Anzeichen einer neurogenen Veränderung im untersuchten Muskel aufweisen, die bei einer progressiven MND vorhanden sein müssten. Bei der Gomori-Trichrom-Färbung zeigte sich, dass bei den Tieren mit einer Dyneinmutation (Cra1 und Cra1/SOD1) eine Störung der Mitochondrien vorliegt, die auf einen Defekt der Atmungskette hinweist. Zur Klärung dieser Störung müssen noch weiterführende biochemische Untersuchungen der Muskeln durchgeführt werden.
Aufgrund dieser Befunde kann eindeutig ausgeschlossen werden, dass es sich bei den Cra1 Tieren um ein Modell für MND handelt.

## 4.9. Schlussfolgerungen

Die Verhaltensdaten der einzelnen Versuche zeigten, dass die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere, bis auf einen Phänotyp der Hinterbeine und der darauf begründeten Schwäche in der motorischen Koordination, keine Anzeichen für eine MND aufweisen. Die Untersuchungen

zeigten, dass diese Tiere sich im Open Field hyperaktiv verhielten. Diese Ergebnisse ähneln keinem bisher bekannten MND Mausmodell, sondern eher Modellen, die einen Huntingtonphänotyp besitzen (Luesse et al., 2001; Baquet et al., 2004; Bolivar et al., 2004; Lin et al., 2004). Dies ist bemerkenswert, da man bisher bei den Cra1 Tieren von einem MND Modell ausging. Im Gegensatz zu den ebenfalls hyperaktiven P301L Tieren, zeigten die Cra1 und Cra1/SOD1 Tiere kein gesteigertes Explorationsverhalten oder eine Beeinträchtigung des räumlichen Referenzgedächtnisses. Konsistent mit den Verhaltensdaten war, dass die Muskeln der Cra1 Tiere keine typischen neurogenen Veränderungen aufwiesen, sondern eine Störung der Mitochondrien zeigten, was von einem Defekt in der Atmungskette herrühren könnte. Die SOD1 Tiere waren im Alter von drei Monaten bezüglich der Motorik noch komplett unauffällig, was sich mit Daten aus der Literatur deckt (Miana-Mena et al., 2005; Teuchert et al., 2006; Smittkamp et al., 2008). Mit den in der Arbeit vorgestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die SOD1 Tiere schneller lernen können, wobei der Grund dieser gesteigerten Hirnfunktion noch weiter untersucht werden muss. Die Muskulatur der SOD1 Tiere zeigte eindeutige neurogene Veränderungen, die in der Degeneration der Motoneurone begründet sind. Bei den Cra1/SOD1 Tieren zeigte sich, dass es durch die Addition der beiden genetischen Defekte, nicht nur zu der in der Literatur beschrieben Lebensverlängerung kommt (Teuchert et al., 2006), sondern auch zu erheblichen Schwierigkeiten in der motorischen Koordination und Agilität, sowie einer ausgeprägten Hyperaktivität, die zusammengenommen auf eine Schädigung eines anderen neuronalen Systems hinweisen. Somit konnte ich zeigen, dass durch die Kreuzung der beiden vermeintlichen MND Modelle es nicht nur zu einer Neuroprotektion der Motoneurone kommt, wie von Teuchert et al (2006) beschrieben, sondern dass Symptome einer Erkrankung des Striatums zur SOD1 Symptomatik hinzukommen.

Aufgrund meiner Daten schließe ich, dass das Cra1 Modell weder zu der Gruppe der MND noch zu der der FTD zu zählen ist. Dieses Mausmodell sollte dem Phänotyp nach zu den Modellen mit einer Neuronendegeneration im Striatum zugeordnet werden, da sich neben der Muskelschwäche, die Defizite in der motorischen Koordination und die Hyperaktivität mit in der Literatur vorhandenen Daten über andere Mausmodelle mit striatalen Defiziten decken (Luesse et al., 2001; Baquet et al., 2004; Bolivar et al., 2004; Lin et al., 2004).
Mit meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass die SOD1 Tiere keinerlei kognitive Defizite aufweisen. Es kann daraus geschlossen werden, dass es sich bei diesem Modell um eine ausschließliche Erkrankung der Motoneurone handelt und keine weiteren Gebiete im Gehirn

betroffen sind. Dies ist wichtig, da es bei der ALS auch zu zusätzlichen frontalen Defiziten beim Patienten kommen kann (Talbot and Ansorge, 2006). Daher kann das SOD1 Modell keine neuen Erkenntnisse über den Zusammenhang von ALS und frontotemporalen Defiziten liefern.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich durch die Dyneinmutation der Cra1 Maus bei den Cra1/SOD1 Tieren neben den in der Literatur beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften auf die Motoneurone (Teuchert et al., 2006) auch unvorteilhafte Veränderungen in Motorik und Aktivität manifestierten. Dabei wiesen die doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Tiere neben der Muskelschwäche koordinative Defizite und eine Hyperaktivität auf, während die SOD1 Tiere im gleichen Alter diese Auffälligkeiten nicht zeigten. Daher werden neben der positiv erscheinenden Eigenschaft einer Lebensverlängerung, die diese Dyneinmutation auf die SOD1 Tiere hat, auch negative Eigenschaften, wie die zusätzlichen motorischen Defizite und die Hyperaktivität, die Symptome einer Schädigung des Corpus striatum sind, dem SOD1 Tier vererbt. Dieses doppelt-transgene Modell ist somit nicht geeignet, um als weiteres MND Modell verwendet zu werden.

# 5. Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine progressive, neurodegenerative Erkrankung, welche durch einen selektiven Verlust des ersten und des zweiten Motoneurons gekennzeichnet ist. Neben der sporadisch auftretenden Form der Erkrankung (sALS), existiert eine familiäre Form der ALS (fALS), welche bei etwa 10% der ALS-Patienten vorliegt und dominant vererbt wird. Etwa 15 bis 20% dieser fALS-Fälle sind mit Mutationen im Gen des Enzyms Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) assoziiert.

1994 wurde eine transgene Maus auf der Grundlage der mutierten SOD1 entwickelt, die das humane Enzym mit einer G93A-Mutation überexprimiert. Diese Tiere entwickeln phänotypische Auffälligkeiten und neuropathologische Charakteristika einer selektiven Motoneurondegeneration. Diese genetisch definierte Maus dient seitdem als bewährtes Tiermodell, um die molekularen, aber auch die funktionellen Mechanismen der Erkrankung, sowie den Verlauf der Erkrankung zu untersuchen.

Das *Cramping legs* (Cra1) Mausmodell bildet ebenfalls bei oberflächlicher Betrachtung einen ALS-ähnlichen Phänotyp aus. Dieses Modell trägt eine autosomal dominant vererbbare Mutation im Dnchc1 Gen (Dynein cytoplasmic heavy chain 1), welches einen Teil des Motorproteins Dynein kodiert. Dynein ist in Nervenzellen für retrograde Transportvorgänge verantwortlich. Heterozygote Cra1 Mäuse wurden bisher den Modellen von Motoneuronerkrankungen (MND) zugeordnet und scheinen eine milde Form einer altersabhängigen Motoneurondegeneration zu entwickeln, mit progressivem Muskelschwund, ohne jedoch eine Beeinträchtigung der Überlebenszeit aufzuweisen.

Bei Untersuchungen von ALS Patienten ist aufgefallen, dass es neben der Degeneration der Motoneurone häufiger zu rontotemporalen Demenzen (FTD) kommt. Seit in einer Studie nachgewiesen wurde, dass es durch die Mutation des Motorproteins Dynaktin innerhalb einer Familie sowohl zu einer ALS als auch zu einer FTD kam, liegt die Vermutung nahe, dass der Dynaktin abhängige retrograde Transport in Neuronen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese der ALS spielen könnte.

Aufgrund der aktuellen Diskussion des Zusammenhangs von MND und FTD, habe ich in dieser Arbeit die Auswirkungen der Mutationen, die bei Mausmodellen laut Literatur einen MND-Phänotyp hervorrufen, auf Motorik, Verhalten und Kognition untersucht.

Hierzu habe ich mit Hilfe einer Batterie von Verhaltenstests den allgemeinen Gesundheitszustand, die Agilität, die Muskelkraft, die sensorisch-motorische Fähigkeiten, die

motorische Aktivität, das Explorations- und Angstverhalten, sowie das Lernverhalten bei genetisch definierten Mausmodellen untersucht.
MND sollten am klassischen ALS Mausmodell SOD1, am Cra1 Modell und am doppelt-transgenen Cra1/SOD1 Modell untersucht werden. Als Kontrolle dienten Wildtyp (WT) Tiere des gleichen genetischen Hintergrunds und das P301L Modell, eine transgene Maus, welche eine Mutation im Tauprotein trägt und dadurch ein FTD Modell darstellt. Die Verhaltenstests wurden durch eine histomorphometrischen Charakterisierung des Musculus quadrizeps ergänzt.
Die wichtigsten Ergebnisse betreffen die Cra1 Tiere: Sie zeigen

- Defizite bei der Agilität, der motorischen Koordination und der Muskelkraft,
- eine ausgeprägte Hyperaktivität,
- kein gestörtes Explorations- und Angstverhalten wie die P301L Tiere sowie ein normales Lernverhalten,
- keine neurogenen Veränderungen in der Muskulatur, sondern eine Störung der Mitochondrien.

Die Cra1/SOD1 Tiere zeigen bezüglich Motorik, Verhalten und Kognition die gleichen Ergebnisse wie die Cra1 Tiere.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich eindeutig schließen, dass es sich bei den Cra1 Tieren weder um ein MND Mausmodell noch um ein Tauopathiemodell handeln kann. Damit wird die bisherige Zuordnung der Cra1 Tiere zu den MND Modellen in Frage gestellt. Ähnliche Eigenschaften bezüglich der Hyperaktivität und den Defiziten in der Koordination wie bei den Cra1 Tieren, wurden auch bei Mausmodellen mit einer Neurodegeneration im Striatum festgestellt. Daraus ergibt sich die neue Hypothese, dass die Cra1 Mäuse zu den Modellen mit striatären Degenerationen zählen. Diese muss mit weiterführenden Tests überprüft werden.
Gleichzeitig eignen sich Verhaltenstests zusammen mit morphologischen Muskeluntersuchungen offensichtlich sehr gut, um eine richtige Zuordnung von Genotypen zu verschiedenen neurodegenerativen Krankheitsbildern (Phänotypen) zu gewährleisten.

# 6. Summary

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease, characterized by degeneration of upper and lower motor neurons. Most cases (90%) are classified as sporadic ALS (sALS), 10 % are inherited and referred to as familial ALS (fALS). In about 15-20% of those fALS cases, a mutation in the gene encoding the antioxidant enzyme Cu/Zn dismutase 1 (SOD1) has been found.

In 1994 a transgenic mouse overexpressing the human mutated form of the SOD1 (G93A) was developed to study the pathogenesis of ALS. Clinical and neuropathological symptoms of the mouse mimic human anterior horn degeneration. This genetically defined animal model is used to evaluate the molecular and functional mechanisms underlying the disease as well as the progression of the disease.

The cramping legs (Cra1) mouse model mimics an ALS-like phenotype as well. This model carries an autosomal dominant mutation of the Dnchc1 gene (dynein cytoplasmic heavy chain 1) which is part of the motor protein encoding dynein. Dynein plays an important role at the retrograde transport in neurons. So far heterozygote Cra1 mice were classified as an attenuated form of the Motor Neuron Disease (MND) model. These mice develop age-dependent motor neuron degeneration with an accompanying progressive amyotrophia while survival is unaffected.

There is an increasing recognition of clinical overlap between frontotemporal dementia (FTD) and amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in some ALS patients. One study showed the expression of ALS and FTD in a family caused by the same mutation in the motor protein dynactin. This supports the theory that the dynactin-dependent retrograde transport in neurons plays an important role in the pathogenesis of ALS.

Following the current discussion of MND and FTD overlap, the aim of the current study was to explore the effects of mutations in mouse models. According to the literature these models cause a MND phenotype. The investigated effects refer to motor functions, behaviour, and cognition. A standardised behavioural test battery was used to test the state of health, agility, muscular strength, sensory-motor abilities, motor activity, exploration, and anxiety behaviour as well as cognition.

The classical ALS mouse model SOD1, the Cra1 and the double-transgenic Cra1/SOD1 animals, were to be investigated on their validity of MND models. Age matched wild type (WT) animals with the identical genetic background served as control as well as the P301L

model. This is a transgenic mouse, characterized by a mutation in the protein tau, and therefore a FTD model. The behavioural tests were complemented by histomorphometric characterisation of the musculus quadrizeps.

The most important results concerned the Cra1 animals. They showed

- deficits in agility, motor coordination and muscular strength,
- a distinct hyperactivity,
- no disturbance of exploration and anxiety as P301L mice as well as a normal cognition,
- no neurogenic changes in skeletal muscles, but dysfunctions of the mitochondria.

The Cra1/SOD1 animals showed the same results as the Cra1 mice concerning motor functions, behaviour and cognition.

These results clearly suggest that Cra1 mice are neither a valid MND model nor a tauopathie model. Therefore the present classification of the Cra1 mice, in terms of a MND model, has to be challenged. Similar characteristics with regard to hyperactivity and deficits in motor coordination in Cra1 mice can be found in mouse models with neurodegeneration at the corpus striatum. Accordingly, it can be concluded that Cra1 mice resemble an animal model with degenerations in the striatum. This has to be validated by further examination.

Furthermore, behavioural tests together with morphological examinations of the skeletal muscles are suitable and appropriate for correct classification of genotypes concerning different neurodegenerative disease pattern.

# 7. Literaturverzeichnis


Allen B, Ingram E, Takao M, Smith MJ, Jakes R, Virdee K, Yoshida H, Holzer M, Craxton M, Emson PC, Atzori C, Migheli A, Crowther RA, Ghetti B, Spillantini MG, Goedert M (2002) Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein. J Neurosci 22:9340-9351.

Arendash GW, King DL (2002) Intra- and intertask relationships in a behavioral test battery given to Tg2576 transgenic mice and controls. Physiol Behav 75:643-652.

Arendash GW, King DL, Gordon MN, Morgan D, Hatcher JM, Hope CE, Diamond DM (2001) Progressive, age-related behavioral impairments in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin-1 transgenes. Brain Res 891:42-53.

Arendash GW, Lewis J, Leighty RE, McGowan E, Cracchiolo JR, Hutton M, Garcia MF (2004) Multi-metric behavioral comparison of APPsw and P301L models for Alzheimer's disease: linkage of poorer cognitive performance to tau pathology in forebrain. Brain Res 1012:29-41.

Baquet ZC, Gorski JA, Jones KR (2004) Early Striatal Dendrite Deficits followed by Neuron Loss with Advanced Age in the Absence of Anterograde Cortical Brain-Derived Neurotrophic Factor. J Neurosci 24:4250-4258.

Bolivar VJ, Manley K, Messer A (2004) Early exploratory behavior abnormalities in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. Brain Research 1005:29-35.

Bucher S, Braunstein KE, Niessen HG, Kaulisch T, Neumaier M, Boeckers TM, Stiller D, Ludolph AC (2007) Vacuolization correlates with spin-spin relaxation time in motor brainstem nuclei and behavioural tests in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of ALS. Eur J Neurosci 26:1895-1901.

Carter RJ, Lione LA, Humby T, Mangiarini L, Mahal A, Bates GP, Dunnett SB, Morton AJ (1999) Characterization of Progressive Motor Deficits in Mice Transgenic for the Human Huntington's Disease Mutation. J Neurosci 19:3248-3257.

Dal Canto MC, Gurney ME (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol 145:1271-1279.

Dengler R, Ludolph AC (2000) Amyotrophe Lateralsklerose, 2. Edition. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag.

Dubowitz V, Sewry C (2007) Muscle Biopsy - A Practical Approach, 3 Edition: Saunders Elsevier.

Fischer LR, Glass JD (2007) Axonal Degeneration in Motor Neuron Disease. Neurodegenerative Diseases 4:431-442.

Frey D, Schneider C, Xu L, Borg J, Spooren W, Caroni P (2000) Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motoneuron diseases. J Neurosci 20:2534-2542.

Gonzalez L, Martin S, Houston FE, Hunter N, Reid HW, Bellworthy SJ, Jeffrey M (2005) Phenotype of disease-associated PrP accumulation in the brain of bovine spongiform encephalopathy experimentally infected sheep. J Gen Virol 86:827-838.

Gotz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM (2001a) Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils. Science 293:1491-1495.

Gotz J, Chen F, Barmettler R, Nitsch RM (2001b) Tau filament formation in transgenic mice expressing P301L tau. J Biol Chem 276:529-534.

Gotz J, Tolnay M, Barmettler R, Chen F, Probst A, Nitsch RM (2001c) Oligodendroglial tau filament formation in transgenic mice expressing G272V tau. Eur J Neurosci 13:2131-2140.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science 264:1772-1775.

Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe de Angelis M, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. Science 300:808-812.

Hartman RE, Wozniak DF, Nardi A, Olney JW, Sartorius L, Holtzman DM (2001) Behavioral phenotyping of GFAP-apoE3 and -apoE4 transgenic mice: apoE4 mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. Exp Neurol 170:326-344.

Hickey MA, Gallant K, Gross GG, Levine MS, Chesselet M-F (2005) Early behavioral deficits in R6/2 mice suitable for use in preclinical drug testing. Neurobiology of Disease 20:1-11.

Higuchi M, Ishihara T, Zhang B, Hong M, Andreadis A, Trojanowski J, Lee VM (2002) Transgenic mouse model of tauopathies with glial pathology and nervous system degeneration. Neuron 35:433-446.

Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D (1999) Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. Behav Genet 29:177-185.

Hughes RN (2004) The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. Neurosci Biobehav Rev 28:497-505.

Jellinger K (2005) Neurodegenerative Erkrankungen (ZNS) - Eine aktuelle Übersicht. Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 6:9-18.

Karl T, Pabst R, von Horsten S (2003) Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. Exp Toxicol Pathol 55:69-83.

Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, Fisher EM, Greensmith L (2005) A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. J Cell Biol 169:561-567.

King DL, Arendash GW (2002) Behavioral characterization of the Tg2576 transgenic model of Alzheimer's disease through 19 months. Physiol Behav 75:627-642.

Kuteeva E, Hokfelt T, Ove Ogren S (2005) Behavioural characterisation of transgenic mice overexpressing galanin under the PDGF-B promoter. Neuropeptides 39:297-302.

LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. Neuron 34:715-727.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, Gwinn-Hardy K, Paul Murphy M, Baker M, Yu X, Duff K, Hardy J, Corral A, Lin WL, Yen SH, Dickson DW, Davies P, Hutton M (2000) Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. Nat Genet 25:402-405.

Lienert GA, Ludwig O, Rockenfeller K (1982) Tables of the critical values for simultaneous and sequential Bonferroni-z-tests. Biometrical Journal 24:239-255.

Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, Zhang CY, Mootha VK, Jager S, Vianna CR, Reznick RM, Cui L, Manieri M, Donovan MX, Wu Z, Cooper MP, Fan MC, Rohas LM, Zavacki AM, Cinti S, Shulman GI, Lowell BB, Krainc D, Spiegelman BM (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. Cell 119:121-135.

Ludolph AC, Langen KJ, Regard M, Herzog H, Kemper B, Kuwert T, Bottger IG, Feinendegen L (1992) Frontal lobe function in amyotrophic lateral sclerosis: a neuropsychologic and positron emission tomography study. Acta Neurol Scand 85:81-89.

Luesse H-G, Schiefer J, Spruenken A, Puls C, Block F, Kosinski CM (2001) Evaluation of R6/2 HD transgenic mice for therapeutic studies in Huntington's disease: behavioral testing and impact of diabetes mellitus. Behavioural Brain Research 126:185-195.

Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. J Biol Chem 277:29626-29633.

Miana-Mena FJ, Munoz MJ, Yague G, Mendez M, Moreno M, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R (2005) Optimal methods to characterize the G93A mouse model of ALS. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 6:55-62.

Miller R, Mitchell J, Lyon M, Moore D (2003) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). Amyotrophic Lateral Sclerosis 4:191 - 206.

Miyakawa T, Yamada M, Duttaroy A, Wess J (2001) Hyperactivity and intact hippocampus-dependent learning in mice lacking the M1 muscarinic acetylcholine receptor. J Neurosci 21:5239-5250.

Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. Nature 297:681-683.

Munch C, Rosenbohm A, Sperfeld AD, Uttner I, Reske S, Krause BJ, Sedlmeier R, Meyer T, Hanemann CO, Stumm G, Ludolph AC (2005) Heterozygous R1101K mutation of the DCTN1 gene in a family with ALS and FTD. Ann Neurol 58:777-780.

Pennanen L, Wolfer DP, Nitsch RM, Gotz J (2006) Impaired spatial reference memory and increased exploratory behavior in P301L tau transgenic mice. Genes Brain Behav 5:369-379.

Pennanen L, Welzl H, D'Adamo P, Nitsch RM, Gotz J (2004) Accelerated extinction of conditioned taste aversion in P301L tau transgenic mice. Neurobiol Dis 15:500-509.

Rademakers R, Dermaut B, Peeters K, Cruts M, Heutink P, Goate A, Van Broeckhoven C (2003) Tau (MAPT) mutation Arg406Trp presenting clinically with Alzheimer disease does not share a common founder in Western Europe. Hum Mutat 22:409-411.

Ramsden M, Kotilinek L, Forster C, Paulson J, McGowan E, SantaCruz K, Guimaraes A, Yue M, Lewis J, Carlson G, Hutton M, Ashe KH (2005) Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, and memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). J Neurosci 25:10637-10647.

Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, Wilcox HM, Flood DG, Beal MF, Brown RH, Jr., Scott RW, Snider WD (1996) Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat Genet 13:43-47.

Rogers DC, Fisher EM, Brown SD, Peters J, Hunter AJ, Martin JE (1997) Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. Mamm Genome 8:711-713.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al. (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62.

Sachs L (1999) Angewandte Statistik, 9. Edition: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Sato-Harada R, Okabe S, Umeyama T, Kanai Y, Hirokawa N (1996) Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports. Cell Struct Funct 21:283-295.

Schreiber H, Gaigalat T, Wiedemuth-Catrinescu U, Graf M, Uttner I, Muche R, Ludolph AC (2005) Cognitive function in bulbar- and spinal-onset amyotrophic lateral sclerosis. A longitudinal study in 52 patients. J Neurol 252:772-781.

Schutz B, Reimann J, Dumitrescu-Ozimek L, Kappes-Horn K, Landreth GE, Schurmann B, Zimmer A, Heneka MT (2005) The oral antidiabetic pioglitazone protects from neurodegeneration and amyotrophic lateral sclerosis-like symptoms in superoxide dismutase-G93A transgenic mice. J Neurosci 25:7805-7812.

Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. Neurosci Lett 278:169-172.

Smittkamp SE, Brown JW, Stanford JA (2008) Time-course and characterization of orolingual motor deficits in B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J mice. Neuroscience 151:613-621.

Stiedl O, Radulovic J, Lohmann R, Birkenfeld K, Palve M, Kammermeier J, Sananbenesi F, Spiess J (1999) Strain and substrain differences in context- and tone-dependent fear conditioning of inbred mice. Behav Brain Res 104:1-12.

Takeda T, Uchihara T, Mochizuki Y, Mizutani T, Iwata M (2007) Memory deficits in amyotrophic lateral sclerosis patients with dementia and degeneration of the perforant pathway A clinicopathological study. J Neurol Sci 260:225-230.

Talbot K, Ansorge O (2006) Recent advances in the genetics of amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia: common pathways in neurodegenerative disease. Hum Mol Genet 15:R182-187.

Tanemura K, Akagi T, Murayama M, Kikuchi N, Murayama O, Hashikawa T, Yoshiike Y, Park JM, Matsuda K, Nakao S, Sun X, Sato S, Yamaguchi H, Takashima A (2001) Formation of filamentous tau aggregations in transgenic mice expressing V337M human tau. Neurobiol Dis 8:1036-1045.

Tatebayashi Y, Miyasaka T, Chui DH, Akagi T, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Tanemura K, Murayama M, Ishiguro K, Planel E, Sato S, Hashikawa T, Takashima A (2002) Tau filament formation and associative memory deficit in aged mice expressing mutant (R406W) human tau. Proc Natl Acad Sci U S A 99:13896-13901.

Teuchert M, Fischer D, Schwalenstoecker B, Habisch HJ, Bockers TM, Ludolph AC (2006) A dynein mutation attenuates motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mice. Exp Neurol 198:271-274.

Tofaris GK, Spillantini MG (2005) Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases. Mov Disord 20 Suppl 12:S37-44.

Upchurch M, Wehner JM (1988) Differences between inbred strains of mice in Morris water maze performance. Behav Genet 18:55-68.

Vlug AS, Teuling E, Haasdijk ED, French P, Hoogenraad CC, Jaarsma D (2005) ATF3 expression precedes death of spinal motoneurons in amyotrophic lateral sclerosis-SOD1 transgenic mice and correlates with c-Jun phosphorylation, CHOP expression, somato-dendritic ubiquitination and Golgi fragmentation. European Journal of Neuroscience 22:1881-1894.

Wall PM, Messier C (2002) Infralimbic kappa opioid and muscarinic M1 receptor interactions in the concurrent modulation of anxiety and memory. Psychopharmacology (Berl) 160:233-244.

Weydt P, Hong SY, Kliot M, Moller T (2003) Assessing disease onset and progression in the SOD1 mouse model of ALS. Neuroreport 14:1051-1054.

Wilson CM, Grace GM, Munoz DG, He BP, Strong MJ (2001) Cognitive impairment in sporadic ALS: a pathologic continuum underlying a multisystem disorder. Neurology 57:651-657.

Yang Z, Zhang Y, Markland P, Yang VC (2002) Poly(glutamic acid) poly(ethylene glycol) hydrogels prepared by photoinduced polymerization: Synthesis, characterization, and preliminary release studies of protein drugs. J Biomed Mater Res 62:14-21.

# 8. Anhang

## 8.1.Allgemeiner Gesundheitszustand

### 8.1.1. Bewertungsschlüssel für den modifizierten SHIRPA-Test

**Tabelle 16: Bewertungstabelle des modifizierten SHIRPA-Tests Teil 1**

| Bewertungsskala | 0 | 1 | 2 | 3 |
|---|---|---|---|---|
| **Beobachtungszylinder** | | | | |
| **Aktivitätszustand** | inaktiv | aktiv | hyperaktiv | |
| **Tremor** | nicht vorhanden | vorhanden | | |
| **Lidöffnung** | Augen geöffnet | Augen geschlossen | | |
| **Aussehen des Fells** | gepflegtes Aussehen | struppiges Aussehen | | |
| **Barthaare** | vorhanden | nicht vorhanden | | |
| **Tränenfluss** | nicht vorhanden | vorhanden | | |
| **Kotabsatz** | vorhanden | nicht vorhanden | | |
| **Beobachtungen in der Arena** | | | | |
| **Erregung nach dem Transfer** | Körperstarre > 3 s | kurze Körperstarre, dann Bewegung | sofortige Bewegung | |
| **spontane lokomotorische Aktivität** | Anzahl der Quadrate, die in den ersten 30 s durchquert werden | | | |
| **Gangart** | flüssige Bewegung | Mangel an flüssiger Bewegung | | |
| **Schwanzstellung** | am Boden schleifend | horizontal, | erhoben | |
| **Schreckreflex** | kein Reflex, | Zucken der Ohrmuscheln | Zucken des ganzen Körpers | |
| **Fluchtverhalten nach Berührung** | lässt Berührung zu, | flieht nach Berührung | lässt sich nicht berühren | |

**Tabelle 17: Bewertungstabelle des modifizierten SHIRPA-Tests Teil 2**

| **Bewertungsskala** | **0** | **1** | **2** | **3** |
|---|---|---|---|---|
| **Beobachtungen über der Arena** | | | | |
| **Passivitätsmessung** | zappelt wenn man es am Schwanz hebt | zappelt wenn man es im Nacken hält | zappelt wenn man es auf den Rücken dreht | Kein Zappeln bei einer der vorher genannten Aktionen |
| **Hautfarbe an den Pfoten** | bleich | rosa | rot | |
| **Trunk Curl** | nicht vorhanden | vorhanden | | |
| **Hinterbein-position** | ausgestreckt | angezogen | | |
| **Ohrmuschelreflex** | vorhanden | nicht vorhanden | | |
| **Lidschlussreflex** | vorhanden | nicht vorhanden | | |
| **Aufstellreflex** | vorhanden | nicht vorhanden | | |
| **Beißversuch während des Versuchs** | kein Versuch | Beißversuch beim Handling | hyperaktiv | |
| **Lautäußerung während des Versuchs** | keine | Lautäußerung | | |

### 8.1.2. Allgemeiner Gesundheitszustand

**Tabelle 18: Mediane mit zugehörigen Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) des Körpergewichts der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | Körpergewicht | | |
|---|---|---|---|
| **WT** | 28,0 g | [24,0 | - 29,8] |
| **Cra1** | 28,0 g | [27,0 | - 29,0] |
| **Cra1/SOD1** | 27,0 g | [26,8 | - 28,3] |
| **SOD1** | 28,0 g | [27,3 | - 30,8] |
| **P301L** | 30,0 g | [29,3 | - 30,8] |
| **12 Monate** | | | |
| **WT** | 43,0 g | [40,0 | - 45,0] |
| **Cra1** | 39,0 g | [38,0 | - 40,0] |
| **P301L** | 36,0 g | [34,0 | - 38,0] |

## 8.2. Agilität und Muskelkraftmessung

**Tabelle 19: Mediane mit zugehörigen Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) des String Agility und Grip Strength Test der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| | String Agility Test | | | Grip Strength Test | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 3 Monate | | | | Vorderbeine | | | alle Beine | | |
| **WT** | 4 | [4 | - 5] | 3,8 | [3,4 | - 4,3] | 7,1 | [6,4 | - 7,6] |
| **Cra1** | 2 | [0 | - 3] | 2,6 | [1,9 | - 3,0] | 5,2 | [4,7 | - 5,8] |
| **Cra1/SOD1** | 3 | [2 | - 5] | 2,3 | [2,1 | - 2,7] | 5,0 | [4,6 | - 5,1] |
| **SOD1** | 4 | [3 | - 5] | 3,3 | [2,5 | - 3,6] | 6,3 | [5,6 | - 6,8] |
| **P301L** | 5 | [4 | - 5] | 2,7 | [2,6 | - 3,0] | 5,2 | [4,9 | - 5,9] |
| **12 Monate** | | | | | | | | | |
| **WT** | 4 | [3 | - 5] | 2,1 | [2,0 | - 2,3] | 4,0 | [3,6 | - 4,3] |
| **Cra1** | 0 | [0 | - 0] | 1,6 | [1,4 | - 1,8] | 3,3 | [2,9 | - 3,7] |
| **P301L** | 5 | [5 | - 5] | 2,3 | [2,0 | - 2,7] | 4,5 | [3,8 | - 5,1] |

## 8.3. Motorische Koordination

**Tabelle 20: Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung der auf das Körpergewicht normierten Laufdauer auf dem Rotarod der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| **3 Monate** | |
|---|---|
| **WT** | 5,2 ± 1,2 |
| **Cra1** | 2,6 ± 1,4 |
| **Cra1/SOD1** | 2,7 ± 1,0 |
| **SOD1** | 4,6 ± 1,5 |
| **P301L** | 3,9 ± 1,5 |
| **12 Monate** | |
| **WT** | 2,3 ± 0,8 |
| **Cra1** | 1,2 ± 0,6 |
| **P301L** | 2,9 ± 0,8 |

## 8.4. Motorische Aktivität

**Tabelle 21: Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung der Wegstrecke und durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit im Open Field der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| **3 Monate** | **Wegstrecke** | **durchschnittliche Geschwindigkeit** |
|---|---|---|
| **WT** | 6685 ± 1334 cm | 3,7 ± 0,7 cm/s |
| **Cra1** | 8662 ± 1237 cm | 4,8 ± 0,7 cm/s |
| **Cra1/SOD1** | 8842 ± 1152 cm | 4,9 ± 0,6 cm/s |
| **SOD1** | 6837 ± 1109 cm | 3,8 ± 0,6 cm/s |
| **P301L** | 9234 ± 1365 cm | 5,1 ± 0,8 cm/s |
| **12 Monate** | | |
| **WT** | 6343 ± 1405 cm | 3,5 ± 0,8 cm/s |
| **Cra1** | 8813 ± 1427 cm | 4,9 ± 0,8 cm/s |
| **P301L** | 6853 ± 873 cm | 3,8 ± 0,5 cm/s |

**Tabelle 22: Mediane mit zugehörigen Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) der Wegstrecke und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit im Y-Labyrinth der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | Wegstrecke | | durchschnittliche Geschwindigkeit | |
|---|---|---|---|---|
| **WT** | 1862 cm | [1638 - 2065] | 6,2 cm/s | [5,5 - 6,9] |
| **Cra1** | 2319 cm | [2046 - 2640] | 7,8 cm/s | [6,9 - 8,9] |
| **Cra1/SOD1** | 2268 cm | [1943 - 2472] | 7,6 cm/s | [6,5 - 8,3] |
| **SOD1** | 2075 cm | [1865 - 2187] | 6,9 cm/s | [6,2 - 7,3] |
| **P301L** | 2271 cm | [2056 - 2397] | 7,6 cm/s | [6,9 - 8,0] |
| **12 Monate** | | | | |
| **WT** | 1539 cm | [1370 - 1942] | 5,1 cm/s | [4,6 - 6,5] |
| **Cra1** | 1572 cm | [1391 - 1997] | 5,2 cm/s | [4,6 - 6,7] |
| **P301L** | 1769 cm | [1632 - 1941] | 5,9 cm/s | [5,4 - 6,5] |

## 8.5. Explorationsverhalten und Angst

**Tabelle 23: Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung der Anzahl der Rearings, der Anazhl der Besuche im Zentrum und der durchschnittlichen Laufgeschwindigkeit im Zentrum beim Open Field Test der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | Rearing | Anzahl der Besuche im Zentrum | durchschnittliche Laufgeschwindigkeit im Zentrum |
|---|---|---|---|
| **WT** | 513 ± 124 | 77 ± 30 | 6,8 ± 2,0 cm/s |
| **Cra1** | 518 ± 114 | 115 ± 29 | 8,9 ± 1,9 cm/s |
| **Cra1/SOD1** | 506 ± 72 | 107 ± 30 | 8,3 ± 1,1 cm/s |
| **SOD1** | 522 ± 104 | 87 ± 21 | 7,4 ± 1,4 cm/s |
| **P301L** | 611 ± 101 | 106 ± 15 | 8,5 ± 1,6 cm/s |
| **12 Monate** | | | |
| **WT** | 473 ± 112 | 74 ± 25 | 6,0 ± 1,3 cm/s |
| **Cra1** | 463 ± 73 | 80 ± 34 | 9,7 ± 2,1 cm/s |
| **P301L** | 589 ± 83 | 80 ± 24 | 6,9 ± 1,4 cm/s |

**Tabelle 24: Mediane mit zugehörigen Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) der Latenzzeit bis zum Verlassen des Startarms im Y-Labyrinth der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | Latenzzeit | |
|---|---|---|
| **WT** | 9,0 s | [5,0 - 12,0] |
| **Cra1** | 8,0 s | [4,8 - 9,2] |
| **Cra1/SOD1** | 8,5 s | [6,1 - 10,6] |
| **SOD1** | 5,4 s | [3,8 - 8,2] |
| **P301L** | 4,6 s | [3,6 - 6,2] |
| **12 Monate** | | |
| **WT** | 7,5 s | [4,8 - 12,7] |
| **Cra1** | 8,8 s | [6,7 - 15,1] |
| **P301L** | 7,8 s | [5,8 - 9,4] |

**Tabelle 25: Mediane mit zugehörigen Quartilen ($Q_{25}$ und $Q_{75}$) der prozentualen Aufenthaltsdauern in den geschlossenen und offenen Armen des Elevated Plus Labyrinth der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | geschlossene Arme | | offene Arme | |
|---|---|---|---|---|
| **WT** | 80,0 % | [74,4 - 88,4] | 1,0 % | [0,1 - 1,7] |
| **Cra1** | 72,1 % | [63,2 - 90,7] | 1,5 % | [0,1 - 3,9] |
| **Cra1/SOD1** | 70,7 % | [52,7 - 88,3] | 1,5 % | [0,7 - 4,8] |
| **SOD1** | 81,4 % | [67,7 - 91,5] | 2,7 % | [1,0 - 4,4] |
| **P301L** | 89,7 % | [64,7 - 95,5] | 2,1 % | [0,1 - 12,3] |
| **12 Monate** | | | | |
| **WT** | 80,0 % | [67,6 - 86,7] | 0,8 % | [0,1 - 5,9] |
| **Cra1** | 67,3 % | [56,7 - 72,3] | 3,7 % | [0,6 - 12,2] |
| **P301L** | 82,8 % | [77,6 - 86,0] | 2,5 % | [1,1 - 3,9] |

## 8.6. Lernverhalten

### 8.6.1. Y-Labyrinth

**Tabelle 26: Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung des prozentualen spontanen Alternationsverhaltens und der Anzahl der Armbesuche im Y-Labyrinth der verschiedenen Genotypen der beiden Altersklassen drei und zwölf Monate.**

| 3 Monate | Spontanes Alternationsverhalten | Anzahl der Armbesuche |
|---|---|---|
| **WT** | 44,3 ± 12,1 % | 35,4 ± 8,9 |
| **Cra1** | 43,9 ± 12,0 % | 45,5 ± 10,2 |
| **Cra1/SOD1** | 41,0 ± 12,0 % | 43,2 ± 7,3 |
| **SOD1** | 46,5 ± 11,8 % | 37,1 ± 6,0 |
| **P301L** | 51,4 ± 11,6 % | 39,2 ± 12,0 |
| **12 Monate** | | |
| **WT** | 34,2 ± 10,9 % | 39,1 ± 11,1 |
| **Cra1** | 32,6 ± 8,2 % | 44,6 ± 12,7 |
| **P301L** | 50,1 ± 13,7 % | 32,8 ± 4,9 |

### 8.6.2. Schwimmdauern im Morris Water Maze

**Tabelle 27: Mittlere Schwimmdauer der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse drei Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke.**

| Block | WT | Cra1 | Cra1/SOD1 | SOD1 | P301L |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 59,1 ± 3,9s | 58,2 ± 7,4s | 56,3 ± 10,4s | 59,2 ± 4,3s | 51,8 ± 14,7s |
| **2** | 32,9 ± 18,0s | 41,1 ± 19,9s | 44,4 ± 19,8s | 43,1 ± 22,2s | 48,2 ± 17,8s |
| **3** | 29,2 ± 21,5s | 38,6 ± 22,1s | 37,1 ± 21,9s | 24,9 ± 19,3s | 23,6 ± 18,9s |
| **4** | 23,8 ± 22,9s | 27,2 ± 22,6s | 29,8 ± 24,6s | 17,6 ± 15,2s | 11,3 ± 7,6s |
| **5** | 20,3 ± 19,3s | 21,5 ± 22,2s | 23,1 ± 21,4s | 13,6 ± 12,3s | 14,7 ± 12,8s |
| **6** | 22,9 ± 18,4s | 23,8 ± 20,4s | 27,2 ± 20,4s | 20,1 ± 17,8s | 8,3 ± 6,7s |
| **7** | 18,3 ± 16,6s | 26,2 ± 19,9s | 22,4 ± 18,0s | 24,7 ± 20,6s | 8,5 ± 7,8s |
| **8** | 22,4 ± 20,7s | 22,8 ± 17,4s | 24,4 ± 16,0s | 25,2 ± 19,9s | 10,3 ± 13,0s |
| **9** | 15,2 ± 12,6s | 27,8 ± 21,4s | 15,8 ± 17,3s | 17,8 ± 18,5s | 9,8 ± 8,7s |
| **10** | 23,7 ± 22,0s | 30,6 ± 22,7s | 16,7 ± 14,5s | 26,1 ± 20,8s | 17,2 ± 15,2s |
| **11** | 20,7 ± 18,5s | 18,7 ± 19,2s | 18,6 ± 18,9s | 18,5 ± 16,6s | 11,3 ± 15,1s |
| **12** | 18,0 ± 17,6s | 26,3 ± 17,6s | 14,8 ± 13,3s | 11,3 ± 12,3s | 12,3 ± 9,4s |
| **13** | 14,9 ± 15,9s | 21,9 ± 18,4s | 17,7 ± 17,4s | 12,5 ± 9,1s | 16,1 ± 20,2s |
| **14** | 16,0 ± 15,3s | 22,8 ± 16,3s | 17,6 ± 16,8s | 12,7 ± 16,9s | 7,0 ± 5,9s |
| **15** | 13,4 ± 15,0s | 13,5 ± 13,5s | 11,6 ± 10,5s | 13,7 ± 14,8s | 8,1 ± 8,0s |

**Tabelle 28: Mittlere Schwimmdauer der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke.**

| Block | WT | Cra1 | P301L |
|---|---|---|---|
| **1** | 48,9 ± 16,1s | 55,3 ± 13,5s | 56,3 ± 10,4s |
| **2** | 29,4 ± 19,3s | 41,3 ± 17,5s | 32,5 ± 22,6s |
| **3** | 23,1 ± 20,5s | 28,0 ± 21,7s | 27,6 ± 20,2s |
| **4** | 17,8 ± 16,3s | 22,2 ± 14,1s | 30,9 ± 22,8s |
| **5** | 13,3 ± 10,6s | 22,9 ± 20,9s | 20,6 ± 17,5s |
| **6** | 10,3 ± 9,1s | 13,6 ± 12,0s | 22,4 ± 17,8s |
| **7** | 16,4 ± 14,0s | 15,8 ± 13,3s | 22,6 ± 22,9s |
| **8** | 15,1 ± 16,2s | 16,6 ± 12,1s | 16,8 ± 16,8s |
| **9** | 9,2 ± 7,5s | 16,4 ± 13,7s | 15,5 ± 14,4s |
| **10** | 17,6 ± 16,0s | 14,8 ± 13,0s | 23,2 ± 18,6s |
| **11** | 8,3 ± 12,6s | 12,9 ± 13,1s | 24,8 ± 21,0s |
| **12** | 9,9 ± 10,3s | 12,3 ± 8,6s | 20,6 ± 16,9s |
| **13** | 9,1 ± 9,0s | 9,9 ± 9,5s | 14,0 ± 12,9s |
| **14** | 13,6 ± 14,0s | 11,4 ± 9,0s | 9,7 ± 6,8s |
| **15** | 7,8 ± 11,0s | 7,8 ± 5,1s | 12,8 ± 13,7s |

**Tabelle 29: Mittlere Schwimmdauer mit zugehöriger Standardabweichung der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate während der Plateauphase im Morris Water Maze.**

| 3 Monate | Schwimmdauer |
|---|---|
| **WT** | 19,7 ± 3,6 s |
| **Cra1** | 25,1 ± 2,3 s |
| **Cra1/SOD1** | 22,4 ± 4,9 s |
| **SOD1** | 21,9 ± 3,6 s |
| **P301L** | 9,2 ± 1,0 s |
| **12 Monate** | |
| **WT** | 12,7 ± 3,5 s |
| **Cra1** | 15,9 ± 1,8 s |
| **P301L** | 19,3 ± 3,6 s |

### 8.6.3. Schwimmstrecken im Morris Water Maze

**Tabelle 30: Mittlere Schwimmstrecke der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse drei Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke.**

| Block | WT | Cra1 | Cra1/SOD1 | SOD1 | P301L |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 12,2 ± 1,6m | 9.7 ± 1,9m | 8,3 ± 2,4m | 11,8 ± 2,1m | 11,8 ± 3,7m |
| **2** | 8,3 ± 4,5m | 7.9 ± 4,3m | 7,9 ± 3,9m | 9,7 ± 5,0m | 12,2 ± 4,9m |
| **3** | 7,5 ± 5,7m | 7,8 ± 4,9m | 6,9 ± 4,0m | 6,0 ± 4,3m | 5,9 ± 4,5m |
| **4** | 6,1 ± 5,4m | 5,3 ± 4,1m | 5,5 ± 4,9m | 4,8 ± 4,0m | 3,3 ± 2,1m |
| **5** | 5,1 ± 4,5m | 4,3 ± 4,5m | 4,0 ± 3,8m | 3,5 ± 3,0m | 4,4 ± 3,9m |
| **6** | 5,6 ± 4,0m | 4,4 ± 3,6m | 4,6 ± 3,5m | 5,0 ± 4,6m | 2,4 ± 1,9m |
| **7** | 4,9 ± 3,9m | 5,7 ± 4,1m | 4,1 ± 3,3m | 6,6 ± 5,5m | 2,7 ± 24m |
| **8** | 5,5 ± 4,3m | 4,2 ± 3,4m | 4,1 ± 2,4m | 6,3 ± 5,0m | 2,8 ± 3,1m |
| **9** | 4,1 ± 3,2m | 5,2 ± 4,2m | 2,6 ± 2,8m | 4,1 ± 4,4m | 2,8 ± 2,5m |
| **10** | 5,6 ± 5,1m | 5,4 ± 4,1m | 2,8 ± 2,9m | 6,2 ± 4,9m | 4,9 ± 4,2m |
| **11** | 5,1 ± 4,1m | 2,8 ± 3,2m | 3,3 ± 3,7m | 4,9 ± 4,7m | 3,3 ± 4,2m |
| **12** | 4,1 ± 3,4m | 4.7 ± 3,0m | 2,6 ± 2,2m | 2,7 ± 2,6m | 3,4 ± 2,5m |
| **13** | 3,9 ± 4,1m | 4.1 ± 3,5m | 3,1 ± 2,9m | 3,3 ± 2,7m | 4,4 ± 5,3m |
| **14** | 5,2 ± 4,6m | 4.7 ± 3,1m | 2,8 ± 2,4m | 3,1 ± 4,1m | 2,1 ± 1,9m |
| **15** | 4,1 ± 4,1m | 2,8 ± 3,4m | 2,2 ± 2,3m | 4,1 ± 3,9m | 3,0 ± 3,2m |

**Tabelle 31: Mittlere Schwimmstrecke der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke.**

| Block | WT | Cra1 | P301L |
|---|---|---|---|
| **1** | 9,3 ± 3,3m | 8,5 ± 2,5m | 11,4 ± 2,6m |
| **2** | 6,5 ± 4,3m | 7,6 ± 3,5m | 7,4 ± 5,1m |
| **3** | 5,1 ± 4,8m | 5,0 ± 4,3m | 6,0 ± 4,5m |
| **4** | 4,3 ± 3,6m | 4,5 ± 3,3m | 7,5 ± 5,6m |
| **5** | 3,3 ± 2,6m | 4,3 ± 4,4m | 5,0 ± 4,3m |
| **6** | 2,3 ± 1,9m | 2,6 ± 2,2m | 5,4 ± 4,5m |
| **7** | 3,9 ± 3,4m | 3,1 ± 2,5m | 5,8 ± 6,2m |
| **8** | 3,6 ± 3,8m | 3,4 ± 2,4m | 4,2 ± 4,3m |
| **9** | 2,2 ± 1,8m | 3,2 ± 2,6m | 4,0 ± 3,8m |
| **10** | 4,0 ± 3,6m | 3,0 ± 2,7m | 6,0 ± 4,8m |
| **11** | 1,9 ± 2,6m | 2,6 ± 2,5m | 6,0 ± 5,1m |
| **12** | 2,3 ± 2,1m | 2,4 ± 1,7m | 5,3 ± 4,2m |
| **13** | 2,1 ± 2,1m | 2,0 ± 2,1m | 3,9 ± 3,6m |
| **14** | 3,2 ± 3,1m | 2,3 ± 1,7m | 2,5 ± 1,8m |
| **15** | 1,7 ± 2,4m | 1,5 ± 1,0m | 3,3 ± 3,4m |

**Tabelle 32 Mittlere Schwimmstrecke mit zugehöriger Standardabweichung der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate während der Plateauphase im Morris Water Maze.**

| 3 Monate | Schwimmstrecke |
|---|---|
| **WT** | 5,0 ± 0,7 m |
| **Cra1** | 4,8 ± 0,7 m |
| **Cra1/SOD1** | 3,8 ± 0,9 m |
| **SOD1** | 5,5 ± 1,2 m |
| **P301L** | 2,7 ± 0,2 m |
| **12 Monate** | |
| **WT** | 3,0 ± 0,9 m |
| **Cra1** | 3,1 ± 0,3 m |
| **P301L** | 4,8 ± 0,9 m |

### 8.6.4. Durchschnittliche Schwimmgeschwindigkeit im Morris Water Maze

**Tabelle 33: Mittlere Schwimmgeschwindigkeit der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse drei Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke. Alle Werte sind in cm/s.**

| Block | WT | Cra1 | Cra1/SOD1 | SOD1 | P301L |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 20,6 ± 2,5 | 16,7 ± 2,4 | 14,8 ± 3,1 | 20,1 ± 3,3 | 23,0 ± 3,8 |
| **2** | 24,6 ± 3,4 | 18,5 ± 3,0 | 17,5 ± 3,4 | 22,7 ± 3,9 | 25,7 ± 4,6 |
| **3** | 25,1 ± 3,8 | 19,2 ± 3,7 | 17,6 ± 3,8 | 24,9 ± 4,2 | 24,9 ± 4,4 |
| **4** | 27,4 ± 5,2 | 21,0 ± 4,7 | 18,0 ± 3,9 | 27,2 ± 4,1 | 28,8 ± 4,9 |
| **5** | 27,5 ± 5,3 | 19,5 ± 4,7 | 17,2 ± 5,2 | 26,4 ± 4,4 | 29,5 ± 4,0 |
| **6** | 26,5 ± 4,6 | 19,0 ± 5,2 | 17,8 ± 4,4 | 25,6 ± 4,1 | 28,9 ± 3,5 |
| **7** | 28,8 ± 4,4 | 17,8 ± 5,0 | 17,8 ± 5,0 | 25,5 ± 5,1 | 31,4 ± 3,9 |
| **8** | 27,2 ± 3,9 | 18,5 ± 4,3 | 16,7 ± 3,6 | 25,0 ± 3,1 | 28,9 ± 4,2 |
| **9** | 27,9 ± 4,1 | 18,4 ± 4,2 | 17,4 ± 5,1 | 23,0 ± 6,2 | 28,6 ± 3,9 |
| **10** | 25,5 ± 4,4 | 18,3 ± 4,3 | 16,9 ± 5,1 | 24,4 ± 4,0 | 28,3 ± 5,8 |
| **11** | 25,7 ± 4,1 | 15,8 ± 5,2 | 17,5 ± 4,7 | 25,2 ± 5,9 | 29,6 ± 5,5 |
| **12** | 25,3 ± 4,0 | 19,1 ± 4,9 | 17,5 ± 5,0 | 26,1 ± 5,0 | 28,9 ± 3,4 |
| **13** | 27,0 ± 5,8 | 19,5 ± 5,4 | 17,8 ± 4,2 | 26,0 ± 5,8 | 29,6 ± 4,2 |
| **14** | 27,1 ± 5,1 | 19,3 ± 3,5 | 18,0 ± 5,2 | 24,3 ± 3,7 | 29,5 ± 4,1 |
| **15** | 25,9 ± 4,9 | 17,1 ± 5,2 | 18,7 ± 4,9 | 25,7 ± 4,0 | 28,2 ± 3,3 |

**Tabelle 34: Mittlere Schwimmgeschwindigkeit der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate im Morris Water Maze. Aufgelistet sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der verschiedenen Blöcke. Alle Werte sind in cm/s.**

| Block | WT | Cra1 | P301L |
|---|---|---|---|
| **1** | 19,1 ± 2,4 | 15,4 ± 2,3 | 20,2 ± 2,9 |
| **2** | 22,1 ± 2,3 | 18,3 ± 3,2 | 23,4 ± 3,1 |
| **3** | 21,6 ± 3,5 | 16,9 ± 3,6 | 21,8 ± 4,6 |
| **4** | 23,0 ± 3,1 | 19,2 ± 3,1 | 24,8 ± 3,9 |
| **5** | 23,2 ± 3,7 | 18,2 ± 4,5 | 25,1 ± 4,5 |
| **6** | 23,9 ± 2,8 | 19,1 ± 3,2 | 23,9 ± 3,6 |
| **7** | 23,5 ± 2,9 | 19,5 ± 2,6 | 24,4 ± 5,5 |
| **8** | 23,6 ± 3,3 | 19,9 ± 3,0 | 24,9 ± 3,4 |
| **9** | 23,7 ± 3,9 | 19,6 ± 3,3 | 24,2 ± 5,3 |
| **10** | 23,4 ± 3,2 | 20,7 ± 3,4 | 25,1 ± 3,4 |
| **11** | 24,2 ± 2,9 | 19,9 ± 3,7 | 24,5 ± 3,7 |
| **12** | 23,6 ± 3,4 | 20,3 ± 2,7 | 25,9 ± 3,5 |
| **13** | 24,1 ± 2,6 | 20,0 ± 3,6 | 27,5 ± 3,8 |
| **14** | 22,4 ± 3,3 | 20,4 ± 3,4 | 26,5 ± 3,4 |
| **15** | 22,4 ± 3,3 | 18,7 ± 3,0 | 26,1 ± 3,7 |

**Tabelle 35: Mittlere Schwimmgeschwindigkeit mit zugehöriger Standardabweichung der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate im Morris Water Maze.**

| 3 Monate | Schwimmgeschwindigkeit |
|---|---|
| **WT** | 26,8 ± 1,1 cm/s |
| **Cra1** | 18,6 ± 1,3 cm/s |
| **Cra1/SOD1** | 17,6 ± 0,5 cm/s |
| **SOD1** | 25,4 ± 1,1 cm/s |
| **P301L** | 29,2 ± 0,8 cm/s |
| **12 Monate** | |
| **WT** | 23,4 ± 0,6 cm/s |
| **Cra1** | 19,6 ± 0,7 cm/s |
| **P301L** | 25,2 ± 1,1 cm/s |

## 8.7. Muskelfaserdurchmesser

**Tabelle 36: Mittlerer Muskelfaserdurchmesser mit zugehöriger Standardabweichung des Musculus rectus femoris der verschiedenen Genotypen in der Altersklasse zwölf Monate.**

| 3 Monate | Muskelfaserdurchmesser |
|---|---|
| **WT** | 47,2 ± 2,4 µm |
| **Cra1** | 45,7 ± 2,5 µm |
| **Cra1/SOD1** | 39,6 ± 4,8 µm |
| **SOD1** | 29,1 ± 5,8 µm |
| **P301L** | 43,5 ± 3,2 µm |
| **12 Monate** | |
| **WT** | 45,5 ± 3,1 µm |
| **Cra1** | 46,4 ± 4,3 µm |
| **P301L** | 46,4 ± 4,9 µm |

## 8.8. Anhangs-Datei

1. Original Versuchsprotokolle nach Eumorphia finden Sie auf der Internetseite http://empress.har.mrc.ac.uk/browser/ unter dem Punkt „Behaviour and cognition“ und sind dort frei zugänglich

1.1. modifizierter SHIRPA-Test

1.2. Grip Strength Test

1.3. Rotarod Test

1.4. Open Field Test

1.5. Y-Labyrinth

2. Datensätze:

2.1. modifizierter SHIRPA-Test

2.2. String Agility Test

2.3. Grip Strength Test

2.4. Rotarod Test

2.5. Open Field Test

2.6. Y-Labyrinth

2.7. Elevated Plus Labyrinth

2.8. Morris Water Maze

2.9. Morphometrie der Muskelfasern

3. Beispielvideos:

3.1. modifizierter SHIRPA-Test

dieses Video finden Sie auf:

http://empress.har.mrc.ac.uk/browser/img/SHIRPA.mp4

3.2. Open Field

3.3. Y-Labyrinth

3.4. Elevated Plus Labyrinth

3.5. Morris Water Maze Lauf 1

3.6. Morris Water Maze Lauf 30

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die durch direktes oder indirektes Wirken zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Albert C. Ludolph, der diese Dissertation ins Leben gerufen und mir große wissenschaftliche Freiheiten bei der Durchführung der Arbeit gelassen hat.
Ein großer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Günter Ehret für die Übernahme der Funktion als Erstgutachter. Er war mir in der gesamten Zeit, und im speziellen bei der Ausarbeitung dieser Dissertation, eine sehr große Hilfe.
Herrn Prof. Dr. Harald Wolf danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.
Frau PD Dr. Anne-Dorte Sperfeld, Herrn Dr. Hans-Jürgen Gydina und Frau Helga Mogel aus dem Muskellabor der Abteilung Neurologie der Universität Ulm möchte ich für die große Hilfe bei der Muskelhistologie und deren Befundung herzlich danken.
Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern aus der Experimentellen Neurologie der Universität Ulm für die Unterstützung bei dieser Arbeit.
Meinen Promotionskolleginnen und -kollegen aus dem Institut der Neurobiologie der Universität Ulm danke ich für die schöne Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte, sowohl während als auch nach der Arbeitszeit.
Frau Karin Dotzauer und Frau Karin Hochleiter danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit.
Ein herzliches Dankeschön geht an Frau Dr. Dorothée Lulé für Ihre große Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.
Ebenso geht ein herzliches Dankeschön an Herrn Sven Duda für seine große Geduld und Unterstützung während der Durchführung der gesamten Arbeit.
Ein letzter, sehr großer Dank gebührt meinen Eltern, die mir das Studium überhaupt ermöglicht und mich mein ganzes Leben lang unterstützt haben.

# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig angefertigt und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe. Wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem habe ich die Satzung der Universität Ulm zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis beachtet.

Ulm, den 02.06.2008

# Curriculum Vitae


| | |
|---|---|
| **Name:** | Kerstin Elisabeth Braunstein |
| **Abteilungsadresse:** | Abteilung für Neurologie |
| | Universität Ulm |
| | D-89081 Ulm |
| | Germany |
| | Tel: +49 (0)731 500 63057 |
| | E-Mail: kerstin.braunstein@uni-ulm.de |
| **Privatadresse:** | Hahnengasse 6 |
| | D-89073 Ulm |
| | Deutschland |
| | Tel: +49 (0)731 1766532 |
| **Geburtsdatum:** | 25.09.1979 |
| **Geburtsort:** | Ulm |
| **Nationalität:** | deutsch |
| **Familienstand:** | ledig |


**Schule und akademische Ausbildung**

| | |
|---|---|
| 1986 – 1990 | Ludwig-Uhland-Schule in Langenau (Grundschule) |
| 1990 – 1999 | Robert-Bosch-Gymnasium in Langenau |
| Juli 1999 | Zeugnis der allgemeinen Hochschulreife (Gesamtnote: 2,0). |
| 1999 - 2004 | Studium Biologie/Mathematik für Lehramt an Gymnasien an der Universität Ulm mit Abschluss 1.Staatsexamen Biologie (1,5) und Mathematik (1,5) |

seit 12/2004 Promotion an der Universität Ulm, Klinik für Neurologie

# Veröffentlichungen

**wissenschaftliche Publikationen:**

1. Bucher, S., Braunstein, K. E., Niessen, H. G., Kaulisch, T., Neumaier, M., Boeckers, T. M., Stiller, D. and Ludolph, A. C. (2007) Vacuolization correlates with spin-spin relaxation time in motor brainstem nuclei and behavioural tests in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of ALS. Eur J Neurosci. 26

**Abstracts / Symposien**

2. Kerstin E. Braunstein and Albert C. Ludolph (2006) Changes in cognitive and motor functions in transgenic MND models. *4th European ALS Consortium Research Workshop, Utrecht*
3. Kerstin E. Braunstein and Albert C. Ludolph (2006) Changes in cognitive and motor functions in transgenic MND models II. *First meeting of the International Graduate School in Molecular Medicine Ulm*
4. Kerstin E. Braunstein, Birgit Schwalenstoecker, Albert C. Ludolph (2007) Gender-effects concerning motor performance in an ALS mouse model. *5th European ALS Consortium Research Workshop, St. Gallen*
5. Kerstin E. Braunstein, Birgit Schwalenstoecker, Albert C. Ludolph Gender difference in motor performance in a high copy ALS mouse model. *Society for Neurocience Meeting 2007, San Diego*
6. Kerstin E. Braunstein and Albert C. Ludolph (2007) Changes in cognitive and motor functions in transgenic MND models. *3rd Inernational Symposium "Signalling Pathways in Cellular Differentiation", Ulm*

**Vortrag**

7. Kerstin E. Braunstein and Albert C. Ludolph (2006) Changes in cognitive and motor functions in transgenic MND models II. *First meeting of the International Graduate School in Molecular Medicine Ulm*