In-vivo Untersuchungen des motorischen Hirnstamms bei einem Mausmodell für Amyotrophe Lateralsklerose

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

vorgelegt von

Selina Bucher

aus Kempten

2008

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Günter Ehret
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Harald Wolf
Tag der mündlichen Prüfung:	24.06.2008

Für Angelina

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
AD	Alzheimer`s Disease (Morbus Alzheimer)
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ALS2	Alsin
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxzol-Propionsäure
ANOVA	analysis of variances (Varianzanalyse)
bp	base pairs (Basenpaare)
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Disease (Creutzfeldt-Jakob-Krankheit)
CSI	Chemical Shift Imaging
CT	Computer Tomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxyribonukleotide
dsDNA	double-stranded DNA (Doppelstrang-DNA)
EAA	excitatory amino acid (exzitatorische Aminosäure)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fALS	familiäre ALS
FLAIR	fluid-attenuated inversion recovery
g	Gramm
HD	Huntington disease (Chorea Huntington)
hSOD1	humane Cu/Zn-Superoxid Dismutase 1
ISIS	image-selected *in-vivo* spectroscopy
kg	Kilogramm
l	Liter
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
mIL-2	murines Interleukin-2
min	Minute
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimol
MND	Motor neuron disease (Motoneuronerkrankung)
MPTP	mitochondriale Permeabilitäts-Transitionspore
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
ms	Millisekunden
MSME	Multi-Slice Multi-Echo
Nc. Nv.	Nukleus Nervus
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion
PD	Parkinson's disease (Morbus Parkinson)
PRESS	point-resolved spectroscopy
RARE	rapid acquisition with relaxation enhancement
ROI	region-of-interest
ROS	reactive oxygen species
sALS	sporadische ALS
ssDNA	single-stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
SE	Spin-Echo
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	survival of motor neuron-Gen
SOD1	Cu/Zn-Superoxid Dismutase 1
STEAM	stimulated echo acquiring method
SVS	Single-Voxel-Spektroskopie
SW	Spektrale Weite
T	Tesla
T_1-Relaxationszeit	longitudinale Relaxationszeit
T_2-Relaxationszeit	transversale Relaxationszeit
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Echozeit

TE_{eff}	effektive Echozeit
TR	Repetitionszeit
V	Volt
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B
Voxel	Volumen Pixel
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen 1
1.2 Motoneuronerkrankungen 2
1.3 Amyotrophe Lateral Sklerose 3
1.4 Zerstörung von Motoneuronen durch oxidativen Stress 6
1.5 Zerstörung von Motoneuronen durch Exzitotoxizität 8
1.6 Magnetresonanztomographie und –spektroskopie in der Amyotrophen Lateralsklerose 12
1.7 Ziele dieser Arbeit 14
2 Material und Methoden 15
2.1 Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen 15
2.2 Genotypisierung der Tiere mittels PCR 15
2.3 Gelelektrophorese 18
2.4 *In-vivo* Bildgebung 19
2.4.1 Magnetresonanztomographie (MRT) 19
2.4.2 Untersuchung des Hirnstamms mittels Magnetresonanztomographie (MRT) 23
2.4.3 Untersuchung des Hirnstamms Vitamin E-behandelter Tiere mittels Magnetresonanztomographie (MRT) 25
2.4.4 Auswertung der T_2-gewichteten Bilder 26
2.4.5 Statistik zur Auswertung der T_2-gewichteten Bilder 27
2.5 Magnetresonanzspektroskopie (MRS) 28
2.5.1 Untersuchung des Hirnstamms mittels Magnetresonanzspektroskopie (MRS) 28
2.5.2 Auswertung der Magnetresonanz-Spektren 29
2.5.3 Statistik zur Auswertung der Magnetresonanz-Spektren 30
2.6 Histologische Untersuchungen des Hirnstamms 30
2.6.1 Präparation des Gehirns und Hämatoxilin und Eosin-Färbung 30
2.6.2 Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Gehirnschnitte 31
2.6.3 Statistik zur Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Gehirnschnitte 32

2.7 Histologische Untersuchungen der Zunge 32
2.7.1 Präparation der Zungen 32
2.7.2 Hämatoxilin und Eosin-Färbung der Zungenschnitte 32
2.7.3 Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Zungenschnitte 33
2.7.4 Statistik zur Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Zungenschnitte 33
3 Ergebnisse 35
3.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm transgener G93A-SOD1 Mäuse 35
3.2 Flächen der MRT-Hyperintensitäten 43
3.3 Morphologische Korrelate der MRT-Signalveränderung 46
3.3.1 Entwicklung der Vakuolisierung in den motorischen Hirnstammkernen 46
3.3.2 Motoneuronanzahl in den motorischen Hirnstammkernen 54
3.4 Veränderungen der Zungenmuskulatur 60
3.4.1 Hämatoxilin und Eosin-Färbung 60
3.4.2 Zungenmuskelfaserdurchmesser 61
3.5 Untersuchung des Hirnstamms Vitamin-E-behandelter G93A-SOD1 Mäuse 66
3.5.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm von Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 Mäusen 66
3.5.2 Vergleich mit den unbehandelten Tieren 73
3.5.3 Progression der T_2-Relaxationszeit 76
3.6 Veränderungen des MR-Spektrums im Hirnstamm transgener G93A-SOD1 Mäuse 80
4 Diskussion 85
4.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm 85
4.2 Morphologische Korrelate der MRT-Signalveränderung 89
4.3 Einfluss der morphologischen Veränderungen auf die periphere Muskulatur 93
4.4 Beeinflussung des MRT-Signals durch Vitamin E 95
4.5 Veränderungen des MR-Spektrums im Hirnstamm 97
5 Zusammenfassung 100
6 Abstract 102
7 Literaturverzeichnis 104

8 Anhang 127
8.1 Orginaldaten aus den Versuchen 127
8.1.1 Transverale Relaxationszeiten 127
8.1.1.1 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus facialis 127
8.1.1.2 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus 128
8.1.1.3 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus.....129
8.1.2 Flächen der Hyperintensitäten.....130
8.1.2.1 Fläche des Nukleus facialis 130
8.1.2.2 Fläche des Nukleus hypoglossus 131
8.1.2.3 Fläche des Nukleus trigeminus.....132
8.1.3 Anzahl an Vakuolen.....133
8.1.3.1 Anzahl an Vakuolen im Nukleus facialis 133
8.1.3.2 Anzahl an Vakuolen im Nukleus hypoglossus 133
8.1.3.3 Anzahl an Vakuolen im Nukleus trigeminus.....134
8.1.4 Anzahl an Motoneuronen.....134
8.1.4.1 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus facialis 134
8.1.4.2 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus hypoglossus 135
8.1.4.3 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus trigeminus 135
8.1.5 Zungenfaserduchmesser 136
8.1.5.1 Kleinster Zungenfaserdurchmesser.....136
8.1.5.2 Mittlerer Zungenfaserdurchmesser.....137
8.1.5.3 Größter Zungenfaserdurchmesser 138
8.1.6 Transversale Relaxationszeiten nach Gabe von Vitamin E 139
8.1.6.1 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus facialis 139
8.1.6.2 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus 140
8.1.6.3 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus.....141
8.1.6.4 Steigungsanalyse 142
8.1.6.4.1 Nukleus facialis.....142
8.1.6.4.2 Nukleus hypoglossus.....143
8.1.6.4.3 Nukleus trigeminus 144
8.1.7 Metabolitenkonzentrationen aus der MR-Spektroskopie im Verhältnis zu Kreatin 145
8.1.7.1 Hirnstamm 145
8.1.7.2 Cerebellum 146

Danksagung 147
Lebenslauf 148
Erklärung 149

1 Einleitung

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Die neurodegenerativen Erkrankungen umfassen eine große Gruppe verschiedener Krankheiten, deren typisches Merkmal ein selektives Absterben von Neuronen während des Krankheitsverlaufes ist. Meist erstreckt sich der Krankheitsverlauf über mehrere Jahre und die ersten Symptome der Erkrankung treten oft erst im fortgeschrittenen Alter auf. Durch die stetig steigende Lebenserwartung ist auch die Zahl der neurodegenerativen Erkrankungen stark angestiegen, wobei die Häufigkeiten, mit der die verschiedenen Erkrankungen in der Bevölkerung auftreten, sehr unterschiedlich sind.

Eine Einteilung der neurodegenerativen Erkrankungen erfolgt meist nach klinisch-pathologische Aspekten, wobei sowohl die betroffenen Neuronengruppen als auch der klinische Phänotyp zur Differenzierung herangezogen werden. Generell unterschieden wird zwischen den Demenz-Erkrankungen, wie z.B. Morbus Alzheimer (Alzheimer-Syndrom, engl. Alzheimer's disease, AD), Prionen-Erkrankungen, wie der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit (engl. Creutzfeldt-Jakob-Disease, CJD) und Neurodegenerationen des motorischen Systems. Innerhalb der letzten Gruppe wird außerdem noch unterteilt in Erkrankungen, welche bevorzugt die Stammganglien betreffen, wie z.B. Morbus Parkinson (engl. Parkinson's disease, PD) und Chorea Huntington (engl. Huntington disease, HD) und solchen, die die Motoneurone betreffen. Zu letzteren zählen die Amyotrophe Lateralsklerose (engl. amyotrophic lateral sclerosis, ALS) und die Spinale Muskelatrophie (engl. spinal muscular atrophy, SMA). In der Pathologie der neurodegenerativer Erkrankungen sind Proteinablagerungen und –aggregationen beschrieben. So finden sich bei Creutzfeldt-Jacob Patienten Prionablagerungen im Gehirn (Gonzalez et al., 2005). Des Weiteren wurden für Morbus Alzheimer Amyloidablagerungen beschrieben (Sennvik et al., 2000), während bei Chorea Huntington polyglutaminhaltige Ablagerungen nachgewiesen wurden (Yang et al., 2002).

Trotz intensiver Forschung gibt es bis heute keine wirksamen Therapien gegen diese neurodegenerative Erkrankungen. In den meisten Fällen werden nur die

Symptome therapiert. Ein Beispiel dafür ist die L-DOPA-Therapie bei Parkinson Patienten (Schapira, 2005). Allerdings bieten diese Therapien keine Heilung. Die Gründe für die geringen Erfolge bei der Entwicklung von Therapien liegen in der Heterogenität der Erkrankungen und im gehäuften Auftreten von spontanen Fällen ohne heritären Hintergrund. Außerdem ist die Therapieentwicklung durch das fehlende Wissen über die Pathomechanismen der neurodegenerativen Erkrankungen beeinträchtigt.

Zur Aufklärung der Pathomechanismen aber auch von ursächlichen Mutationen der neurodegenerativen Erkrankungen werden in der Forschung oftmals Tiermodelle verwendet. Sie dienen auch zur Erprobung möglicher Therapien. Zur Verfügung stehen sowohl Tiermodelle mit spontanen Mutationen (Hilbush et al., 2005) als auch gezielten genetischen Manipulationen, so genannte gentechnisch veränderten Tiere.

1.2 Motoneuronerkrankungen

Unter dem Begriff Motoneuronerkrankungen (engl. motor neurone disease, MND) werden Erkrankungen zusammengefasst, welche entweder das erste (im motorischen Kortex), oder das zweite Motoneuron (im Vorderhorn des Rückenmarks und im Hirnstamm) oder auch beide Motoneurone betreffen. Zu den typischen Symptomen dieser Erkrankungen zählen Spastiken und Muskelatrophien, wobei die Ursachen oder die genaue Pathologie häufig nicht oder nur teilweise bekannt sind. Die verschiedenen Motoneuronerkrankungen werden aufgrund ihres Krankheitsverlaufs unterteilt, wobei es zu Überlappungen bei den Symptomen zwischen den einzelnen Formen kommen kann.

Zu den Motoneuronerkrankungen, die das erste und das zweite Motoneuron betreffen gehört die Progressive Bulbär Paralyse (auch Brown-Vialetto-van Laere Syndrom genannt, engl. progessive bulbar palsy). Ein Charakteristikum dieser Erkrankung ist die sehr variable Progression und der Ausbruch während der Kindheit (Hawkins et al., 1990). Der Erbgang der Progressiven Bulbär Paralyse ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht klar, es konnte bisher auch keine ursächliche Mutation identifiziert werden (Megarbane et al., 2000). Die Spinale Muskelatrophie,

eine weitere Motoneuronerkrankung, hingegen betrifft nur das zweite Motoneuron. Man unterscheidet vier klassische Typen der SMA (SMA I, II, III und IV), welche aufgrund verschiedener Schweregrade und dem Einsetzen erster Krankheitssymptome eingeteilt werden. Allen gemeinsam ist eine Deletion oder eine Mutation im survival of motor neuron-Gen (SMN), welches auf Chromosom 5q13 des Menschen kartiert ist (Hahnen et al., 1995). Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zählt ebenfalls zu den Motoneuronerkrankungen. Bei der ALS ist sowohl das erste als auch das zweite Motoneuron von der Neurodegeneration betroffen.

1.3 Amyotrophe Lateral Sklerose

Die ALS zählt zu den am häufigsten auftretenden Erkrankungen innerhalb der Motoneuronerkrankungen. Der Arzt Charcot beschrieb 1873 als erster das Krankheitsbild der ALS mit ihren kennzeichnenden Symptomen (Charcot und Joffroy, 1869). Die Prävalenz der Amyotrophen Lateralsklerose bewegt sich weltweit zwischen 3-8 pro 100000 Einwohner, bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung nach Diagnosestellung von 1-5 Jahren. Die Inzidenz wird mit 0,8-2,6 pro 100000 Einwohnern und Jahr angegeben (Ludolph, 2000). Damit ergibt sich für die ALS eine ähnliche Inzidenz wie bei der Multiple Sklerose (MS, Inzidenz 3-5 pro 100000 Einwohner), sie ist jedoch im Verlauf eine eher selten auftretende Pathologie, da die Patienten relativ rasch versterben (Vergleich Prävalenz MS 150 pro 100000 Einwohner). In der Regel bricht die Erkrankung erst um das sechzigste Lebensjahr aus, wobei Männer durchschnittlich früher erkranken als Frauen (Caroscio et al., 1987; Traynor et al., 1999). Allerdings sind aber auch Fälle bekannt bei denen die Krankheit deutlich früher auftritt. Die frühesten Fälle von ALS wurden für den Alterszeitraum zwischen fünfzehn und dreißig Jahren beschrieben. Nach Ausbruch der Erkrankung versterben die meisten Patienten innerhalb von fünf Jahren durch respiratorische Insuffizienz (Winter und Ludolph, 2004). Die Verläufe und die Pathologie der ALS-Erkrankung sind sehr unterschiedlich, so kommt es bei den Patienten immer wieder zu so genannten

Plateau-Phasen, bei denen die Progression der Erkrankung nicht weiter voranschreitet.
Charakteristisch für die klassische ALS sind eine Dysfunktion und selektive Degeneration des ersten und des zweiten Motoneurons mit progredientem Verlauf (Brujin et al., 2004). Der Beginn der Erkrankung zeigt sich bei der überwiegenden Zahl der Patienten in einer Muskelschwäche, wobei sich diese in unterschiedlicher Weise nach zuerst betroffener Muskelpartie manifestiert. Bei der spinalen ALS ist die periphere, quergestreifte Extremitätenmuskulatur betroffen. So kommt es zu einer Ungeschicklichkeit der Hände oder zu einer Gangunsicherheit und Schwäche der Beine. Anschließend breitet sich die Symptomatik auch auf die Muskulatur des Rumpfes, des Nackens, sowie auf die Gesichts-, Sprach-, Kau-, Schluck- und Atemmuskulatur aus (Ludolph, 2000). In 25% der ALS-Fälle wird eine primär bulbäre Symptomatik beobachtet. Dabei kommt es zuerst zu Dysarthrie und Dysphonie, im weiteren Verlauf folgen Zungenatrophie mit Fibrillieren und Faszikulationen (Zuckungen), eine Schwäche der Kaumuskulatur und Dysphagie. Sensibilität und Gedächtnisfunktion, sowie Stuhl- und Harnkontrolle bleiben vom jeweiligen Krankheitsprozess in der Regel ausgespart.

Man unterschiedet zwischen zwei Formen der ALS, der familiären (fALS) und der sporadischen (sALS), wobei die fALS nur ca. 10% aller ALS-Fälle ausmacht. Nur bei einem kleinen Teil der fALS-Erkrankten (20%) konnten Mutationen im Gen für die Cu/Zn-Superoxid Dismutase 1 (SOD1) auf Chromosom 21q festgestellt werden (Harris, 1998; Rosen et al., 1993). Bis heute sind über 100 verschiedene Mutationen im SOD1-Gen beschrieben (Andersen, 2000; Gaudette et al., 2000). Klinisch sind beide Formen kaum voneinander zu unterscheiden.
Während bei der sporadischen Form bisher nur wenig über die Ursachen bekannt ist, hat man bei der fALS immerhin bei einem geringen Prozentsatz der Patienten den Anhaltspunkt der mutierten SOD1. Wie der genaue Pathomechanismus durch die mutierte SOD1 ausgelöst wird, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und ist Gegenstand aktueller Forschung. Da die Mutation in der SOD1 die normale Funktion, d.h. die Verstoffwechselung von Superoxiden zu Sauerstoff und Hydrogenperoxid (Abb. 1-1), nicht beeinträchtigt, wird vermutet, dass das Enzym eine unbekannte Funktion („gain of function“) dazu gewinnt (Reaume et al., 1996). Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Fehlfaltung und Aggregation der

Proteine, die zu Transportdefekten und schließlich zum Neuronentod führen (Bossy-Wetzel et al., 2004). Aber auch oxidativer Stress, verursacht durch den Zugang von abnormalen Substraten an das aktive Zentrum des Enzyms (Beckmann et al., 1993), mitochondriale Degeneration (Dal Canto und Gurney, 1994; Kong und Xu, 1998; Wong et al., 1995) oder Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität (Rothstein et al., 1990; Rothstein et al., 1991; Shaw et al., 1995) können zum Verlust der Motoneurone führen (zusammen gefasst in Brujin et al., 2004). Weiterhin werden ebenfalls Einflüsse von umliegenden Gliazellen als Auslöser der Neurodegeneration in Betracht gezogen (Clement et al., 2003).



Abbildung 1-1: Normale Funktion der Superoxid Dismutase 1

Neben dem Genlocus der SOD1 sind weitere mit fALS assoziierte Loci in der Vergangenheit beschrieben worden. Zu diesen gehört z.B. ALS2 (Alsin) auf dem Chromosom 2 des Menschen (Hadano et al., 2001, Yang et al., 2001). Obwohl ubiquitär exprimiert, findet es sich in hohen Konzentrationen in den neuronalen Geweben. Dort ist es an den endosomalen Membranen auf der zytoplasmatischen Seite lokalisiert ist (Yamanaka et al., 2003). Ein weiterer identifizierter ALS-Locus ist ALS8. In einer brasilianischen Familie wurden bei 26 Mitgliedern eine langsam progrediente autosomal dominante ALS beschrieben (Nishimura et al., 2004). Verantwortlich dafür ist eine „missense" Mutationen im Gen Vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB), die zu einem Aminosäureaustausch an Position 56 führt (Nishimura et al., 2005). VAPB ist an Vesikel assoziiert, daher erscheint eine Funktion im Transport wahrscheinlich (Nishimura et al., 2004).

Seit der Identifizierung der dominanten Mutationen im humanen SOD1-Gen wurden verschiedene Versuche unternommen, ein entsprechendes Mausmodell zu erstellen. 1994 gelang es Mark Gurney eine transgene Maus herzustellen, welche das Gen mit der humanen Variante der SOD1, die eine Glyzin zu Alanin Substitution an Position 93 trägt (Rosen et al., 1993), in hoher Kopienzahl überexprimiert (Gurney, 1997). Solche transgenen Mäuse entwickeln eine

Symptomatik, welche der menschlichen ALS klinisch und pathologisch weitestgehend entspricht (Heiman-Patterson et al., 2005). Die Maus zeigt eine Schwächung der Muskeln ab dem Alter von 90 Tagen (Beginn der klinischen Phase), bedingt durch den Verlust der spinalen Motoneurone (Talbot, 2002). Während der Progression der Erkrankung entwickeln die Mäuse eine Hinterbein-Paralyse und sterben im Durchschnitt nach 130 Tagen (Heiman-Patterson et al., 2005). Im Vergleich dazu zeigen SOD1-defiziente Mäuse keine Neurodegeneration sondern eine leicht reduzierte Fertilität und Beeinträchtigungen im Metabolismus (Ho et al., 1998; Reaume et al., 1996), was für die bisher angenommene „gain-of-function“ Theorie spricht.

1.4 Zerstörung von Motoneuronen durch oxidativen Stress

Die Pathologie der ALS ist charakterisiert durch einen vorzeitigen und selektiven Zelltod der Motoneurone. Für die selektive Vulnerabilität werden unterschiedliche Ansätze und Hypothesen diskutiert. Im Folgenden soll auf einige der möglichen Ursachen eingegangen werden.

Motoneurone sind eine sehr spezialisierte Zellpopulation des menschlichen Organismus, so ist die räumliche Dimension der motorischen Zellen einzigartig. Die Axone der Motoneurone können sich bis auf 1m erstrecken. Der Energiebedarf für den axonalen Transport, der auf einer solchen Strecke benötigt wird, belastet die Zellen und verursacht durch den gesteigerten Umsatz vermehrt anfallende freie Radikale. Das Gehirn entspricht ca. 2 % der gesamten Körpermasse, metabolisiert aber in etwa 20 % des aufgenommenen Sauerstoffs. Aus diesem Grund fallen im Gehirn auch 20 % der Sauerstoffradikale an (Zhu et al., 2004), welche durch Oxidation und Peroxidation schädlich für Proteine, DNA-Basen und Lipide sind. Zum Schutz hat die Zelle mehrere unterschiedliche Enzymsysteme, wie z.B. die SOD1, die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase, welche die gefährlichen Sauerstoffradikale in unschädlichere Moleküle umwandeln. Daneben sind auch Antioxidantien, wie Vitamin E und C, beteiligt, um die Sauerstoffradikale zu eliminierten. Sie verhindern so eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration an

Sauerstoffradialen. Oxidativer Stress würde wichtige physiologische Stoffwechselprozesse wie die Signaltransduktion und die Proliferation stören.
Ein erhöhter oxidativer Stress wurde nicht nur im Zusammenhang mit einem degenerativen neuronalen Zelltod, sondern auch bei Epilepsie und Ischämie gefunden (Phillis et al., 2006). Die Erhöhung des oxidativen Stresses in den Motoneuronen und der damit verbundene Zelltod aufgrund eines Verlusts der normalen Funktion der SOD1 ist heute unwahrscheinlich. Verschiedene Experimente haben gezeigt, dass die Pathogenität der Mutation unabhängig von der Enzymfunktion ist (Borchelt et al., 1994; Bowling et al., 1995; Bruijn et al., 1998; Jaarsma et al., 2000). Es wird vermutet, dass das mutierte Protein eine oder mehrere zusätzliche toxische Funktionen dazugewinnt (sog. „gain of function"-Theorie). So sind fast sämtliche Mutationen der SOD dominant und werden durch Punktmutationen ausgelöst, oder es werden Proteine gebildet, denen nur das terminale Ende fehlt (kodiert von Exon 5). Mutationen, bei welchen das Protein erst gar nicht gebildet wird, konnten bis heute noch nicht gefunden werden. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass der größte Teil des Proteins vorhanden sein muss, um die Krankheit auszulösen. Zudem beeinflussen die Mutationen die Enzymaktivität in unterschiedlichem Maße (Borchelt et al., 1994; Bowling et al., 1993; Deng et al., 1993; Robberecht et al., 1994). Es wurden sogar eine D90A-Mutation gefunden, welche die Enzymaktivität völlig intakt lässt, aber trotzdem ALS auslöst (Andersen et al., 1995; Robberecht et al., 1996). Ein weiterer Punkt ist die Tatsache, dass transgene Mäuse, welche zu ihrer normalen endogenen SOD1 noch eine zusätzliche mutierte, humane SOD1 besitzen, die Motoneurondegeneration im Gegensatz zu SOD1 knock-out Mäusen ausbildeten (Bruijn et al., 1998; Gurney et al., 1994; Ripps et al., 1995; Wong et al., 1995).
Es wird daher davon ausgegangen, dass die mutierte SOD1 eine unbekannte zytotoxische Aktivität entwickelt. Es wird angenommen, dass die Konfiguration des Enzyms so verändert wird, dass das Cu-Atom im aktiven Zentrum des Proteins auch für andere Substrate außer Sauerstoffradikalen zugänglich wird. Dadurch könnten weitere freie Radikale entstehen, welche den oxidativen Stress auf die Zelle erhöhen. Zwei mögliche abnormale Substrate für die mutierte SOD1 sind Hydoxylradikale und Peroxinitrat ($ONOO^-$) (Beckman et al., 1994).
Verschiedene *in-vitro* Untersuchungen ergaben auch eine erhöhte Peroxidase-Aktivität des Enzyms (Wiedau-Pazos et al., 1996; Yim et al., 1996). Dadurch wird

vermehrt H_2O_2 in Sauerstoffradikale umwandelt und die Vermutung gestärkt wird, dass das Enzym selbst eine Quelle für freie Radikale ist.
Crow et al. (1997b) vermuten, dass die Affinität des mutierten Enzyms für Zink eingeschränkt sein könnte. So wandelt die Zink-depletierte SOD1 Peroxinitrat ($ONOO^-$) leichter in Nitrionium-Ionen um als die Zink-beladene SOD1. Die Nitronium-Ionen könnten dann wiederum Tyrosin-Reste nitrieren und den oxidativen Stress erhöhen. Das Zink könnte von der leichten Untereinheit von Neurofilamenten (Neurofilament L) entfernt worden sein, oder aber Neurofilament L ist selbst Ziel der Nitrierung (Crow et al., 1997a).
Ein weiterer Hinweis, dass oxidativer Stress in der Pathogenese der ALS eine wichtige Rolle spielt, liegt im Verlauf der Krankheit. So konnte bei doppelt-transgenen Mäusen, welche die G93A-SOD1 und Bcl-2 überexprimieren der Krankheitsbeginn hinausgezögert werden. Bcl-2 wirkt aufgrund eines antioxidativen Mechanismus antiapoptotisch (Kostic et al., 1997). Durch die Behandlung der G93A-SOD1 Mäuse mit Vitamin E und Selen kann ebenfalls die klinische Phase der Erkrankung hinausgezögert werden, wobei das Fortschreiten der Krankheit allerdings nicht beeinflusst wird (Gurney et al., 1996).

1.5 Zerstörung von Motoneuronen durch Exzitotoxizität

Neben einer erhöhten Konzentration von Oxidantien in den Motoneuronen, scheint auch die Sensibilität gegenüber Glutamat zu der Neurodegeneration bei der ALS beizutragen. Glutamat und weitere exzitatorische Aminosäuren (EAA) sind die wichtigsten Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (O`Brien und Fischbach, 1986; Storm-Mathisen und Otterson, 1988; Young et al., 1983), wie z. B. im Thalamus (McLennan et al. 1968), im Hippokampus (Biscoe und Straughan, 1966) oder im cerebralen Kortex (Bradford und McIlwaine, 1966). Bei einer Überstimulation der Glutamatrezeptoren durch eine erhöhte Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt oder durch Glutamatagonisten werden neuropathologische Prozesse in den Nervenzellen ausgelöst, die als Exzitotoxizität definiert wurden (Heath und Shaw, 2002).

Die Glutamatrezeptoren werden klassisch in zwei Hauptgruppen unterteilt: in ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Die ionotropen Rezeptoren werden aufgrund ihrer pharmakologischen Agonisten wiederum in drei Untergruppen eingeteilt: N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren), α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxzol-Propionsäure-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) und Kainat-Rezeptoren (Heath und Shaw, 2002). Diese Rezeptoren stellen Ionenkanäle dar, die *in-vivo* aus vier oder fünf Untereinheiten bestehen, welche wiederum aus Hetero- oder Homo-Oligomeren aufgebaut sind. Sommer und Seeburg (1992) haben gezeigt, dass die funktionellen Eigenschaften des Rezeptors und damit z.B. seine Permeabilität für Ionen von der Kombination der Untereinheiten, aus welchen der Rezeptor aufgebaut ist, abhängen. Die metabotropen Glutamatrezeptoren zählen zu den phylogenetisch ältesten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Derzeit sind 8 metabotrope Glutamatrezeptoren bekannt: mGluR1 bis mGluR8 (Heath und Shaw, 2002).

Bei einer normalen glutamatergen Neurotransmission wird Glutamat von der präsynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt sezerniert und bindet an einen der Glutamatrezeptoren der postsynaptischen Zelle. Diese Bindung führt zu einem Einstrom von Ca^{2+}- Ionen durch die NMDA-Rezeptoren oder zu einem Einstrom von Na^{+}- und einem anschließenden Ausstrom von K^{+}-Ionen durch die AMPA- und Kainat-Rezeptoren. Der NMDA-Rezeptor vermittelt dabei eine langsame Erregung in der postsynaptischen Nervenzelle, der AMPA- und der Kainat-Rezeptor dagegen eine schnelle. Anschließend wird Glutamat aktiv aus dem synaptischen Spalt durch die Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 entfernt und in nahe gelegene Astrogliazellen aufgenommen. Dort wird das Glutamat mit Hilfe der Glutamin-Synthetase in Glutamin konvertiert und zurück in die präsynaptische Zelle transportiert, wo Glutamin durch das Enzym Glutaminase wieder in Glutamat umgewandelt wird (Heath und Shaw, 2002; Abb. 1-2).

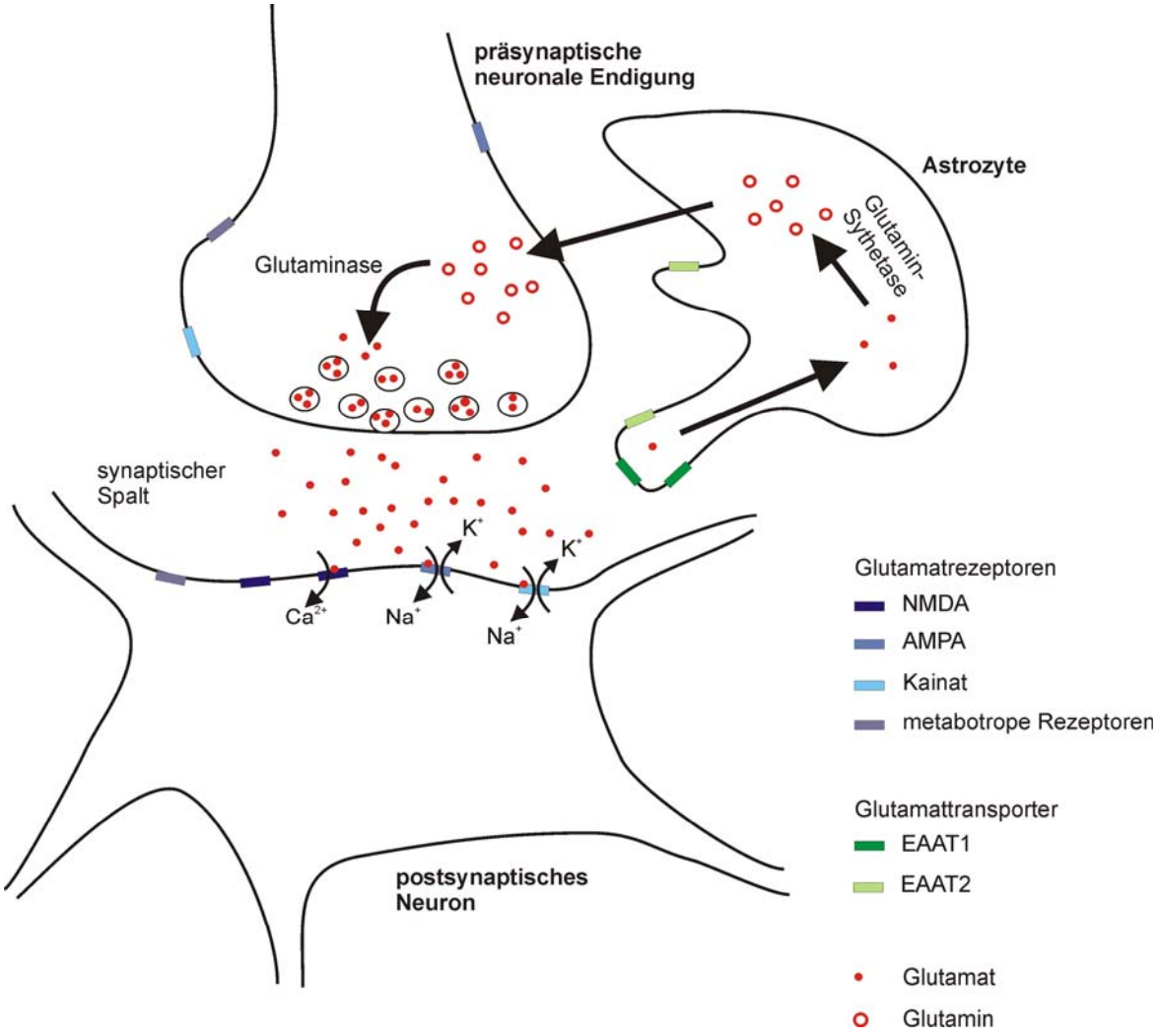

Abbildung 1-2: Normale glutamaterge Neurotransmission (verändert nach Heath und Shaw, 2002).

Lucas und Newhouse zeigten bereits 1957, dass Glutamat auch eine schädigende Wirkung auf Neurone im zentralen Nervensystem haben kann. Diese so genannte Exzitotoxizität läuft in mehreren Phasen ab: Zuerst schwillt die Zelle aufgrund der durch Glutamat ausgelösten Depolarisation und dem damit zusammenhängenden Na^+, Cl^- und Wasser-Einstrom an. Dieser Schritt ist reversibel (Choi, 1987). Im Anschluss an die Depolarisation kommt es zu einem irreversiblen exzessiven Einstrom von Ca^{2+}- Ionen direkt durch Glutamatrezeptor-Kanäle oder durch spannungsgesteuerte Kalzium-Kanäle (Miller et al., 1989). Die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration liegt normalerweise unter 0,1 µM/l (Siesjö, 1988). Durch eine exzessive Stimulation der Glutamatrezeptoren erhöht sich die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration. Durch den erhöhten Ca^{2+}-Spiegel in der Zelle werden Kaskaden zytotoxischer biochemischer Prozesse in Gang gesetzt, wie zum Beispiel die

inadäquate Aktivierung von Enzymen, wie Lipasen, Phospholipasen, Endonucleasen, Proteinkinase C, welche die Zelle entweder direkt oder indirekt über die Generierung freier Radikale schädigen (Meldrum und Garthwaite, 1990).

Bei der ALS wird angenommen, dass die glutamaterge Neurotransmission gestört ist und exzitatorische Mechanismen in der Pathogenese der Erkrankung eine Rolle spielen (Fujita et al., 1996; Kong und Xu, 1998; Wong et al., 1995). So konnten erhöhte Konzentrationen von Glutamat im Serum, im Plasma und in der Cerebrospinalflüssigkeit von ALS-Patienten gefunden werden (Plaitakis und Caroscio, 1987; Rothstein et al., 1990; Shaw et al., 1995). Im Gegensatz dazu waren die Glutamatkonzentrationen in verschiedenen Bereichen des Gehirns bei ALS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen erniedrigt (Perry et al., 1987; Tsai et al., 1991).
Auch die Expression und Funktion des Glutamattransportersystems scheint bei der ALS verändert zu sein. Aus diesem Grund wurden die Proteine und ihre mRNAs untersucht (Rothstein et al., 1995). Sowohl bei ALS-Patienten als auch im Tiermodell wurde eine reduzierte Expression des Glutamattransporters EAAT2 gezeigt (Flowers et al., 2001; Ginsberg et al., 1995; Meyer et al., 1998; Meyer et al., 1999; Münch et al., 2000; Münch et al., 2002). Rothstein et al. (1995) schlagen ein abnormales RNA Splicing von EAAT2 als Grund für die Expressionsänderung vor, welche bei ALS-Patienten in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Gehirn auch nachgewiesen werden konnten (Lin et al., 1998; Meyer et al., 1998; Meyer et al., 1999; Münch et al., 2000). Eine geringere Konzentration von EAAT2 könnte zu einer verminderten Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt und damit zu einer Motoneurondegeneration führen.

GluR2 ist eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors und vermindert die Ca^{2+}-Permeabilität der Zellmembran. Sie sorgt damit für die Ca^{2+}-Homöostase in der Zelle (Heath und Shaw, 2002). Durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration wird die Leistungsfähigkeit der Mitochondrien beeinträchtigt und dadurch der Abbau freier Radikale gehemmt. Williams et al. (1997) zeigten mittels *in-situ* Hybridisierung, dass die Konzentration der GluR2-Untereinheiten in Motoneuronen von ALS-Patienten gegenüber anderen Neuronenpopulationen dieser Patienten signifikant erniedrigt war. Durch die geringere Konzentration der

GluR2-Untereinheiten ist die Ca^{2+}-Permeabilität und damit auch die Ca^{2+}-Konzentration in der Zelle erhöht, wodurch auch die Glutamatsensitivität verändert wird. In einem transgenen Mausmodell konnte die klinische Phase der Erkrankung durch das erhöhte Vorhandensein der GluR2-Untereinheit hinausgezögert werden. Bei Tieren mit geringerer Expression von GluR2 kam die Krankheit früher zum Ausbruch (Tateno et al., 2004). Eine reduzierte Zahl an GluR2-Untereinheiten könnte also auch bei ALS-Patienten zu einer selektiven Vulnerabilität von Motoneuronen führen und einen negativen Einfluss auf die Krankheitsprogression haben.

1.6 Magnetresonanztomographie und –spektroskopie in der Amyotrophen Lateralsklerose

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine nicht-invasive Bildgebungtechnik, die seit vielen Jahren routinemäßig in der klinischen Diagnostik eingesetzt wird. Sie liefert dabei sowohl Informationen über die Anatomie als auch über pathologische Veränderungen. Bis jetzt wurde MRT mehr zur Abgrenzung der ALS gegenüber anderer neurodegenerativen Erkrankungen und nicht zur Erstellung einer definitiven Diagnose verwendet. Der Grund dafür liegt in den inkonsistenten Ergebnissen der verschiedenen MRT-Untersuchungen bei ALS-Patienten.

Verschiedene longitudinale MRT-Studien konnten erkrankungsbedingte Veränderungen in der Gehirnstruktur und in der Funktion bei ALS-Patienten zeigen (Basak et al., 2002; Ellis et al., 2001). So konnte mittels FLAIR (fluid-attenuated inversion recovery) eine Zunahme des Signals im Kortikospinaltrakt von ALS-Patienten nachgewiesen werden (Hecht et al., 2001; Hecht et al., 2002). Allerdings zeigten auch gesunde Kontrollen bei diesen Studien teilweise eine Signalzunahme (Hajnal et al., 1992; Hecht et al., 2002). Andere MRT-Untersuchung zeigten oft Hyperintensitäten im Kortikospinaltrakt von ALS-Patienten (Abe et al., 1997; Cheung et al., 1995; Ellis et al., 1999a; Ellis et al., 1999b; Goodin et al., 1988; Hecht et al., 2001; Hofmann et al., 1998; Peretti-Viton et al., 1999; Pradhan et al., 2006; Sach et al., 2004; Sarchielli et al., 2001; Thorpe et al., 1996; Waragai, 1997). Im Gegensatz dazu zeigte eine Bildgebung des Motorkortex, v.a. im präzentralen

Gyrus, Hypointensitäten (Imon et al., 1995; Miwa et al., 2003; Thorpe et al., 1996). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mittels MRT eine signifikante Degeneration im zentralen Nervensystem von ALS-Patienten detektiert werden kann. Allerdings zeigten MRT- (Cheung et al., 1995) und CT-Studien (Computer Tomographie; Gallassi et al., 1989) keine Gehirnathrophie der ALS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen und keine signifikanten Unterschiede beim Gesamtgehirnvolumen von ALS-Patienten und gleichaltrigen Kontrollen (Ellis et al., 2001).

Studien am transgenen G93A-SOD1 Mausmodell zeigten bereits, dass MRT eine hervorragende Methode zur *in-vivo* Untersuchung darstellt. Verschiedene Gruppen konnten unabhängig voneinander Signalhyperintensitäten in den motorischen Hirnstammkernen Nukleus Nervus (Nc. Nv.) facialis, Nc. Nv. hypoglossus, Nc. Nv. trigeminus, Nc. Nv. ambiguus und im Rückenmark nachweisen (Angenstein et al., 2004; Nießen et al., 2006; Zang et al., 2004). Als Grundlage dieser Hyperintensitäten wird eine für die ALS typische Vakuolisierung in den Motoneuronen vermutet (Angenstein et al., 2004; Nießen et al., 2006). Bei ALS-Patienten konnte bisher noch keine Veränderung in den motorischen Hirnstammkernen des Hirnstamms mittels MRT nachgewiesen werden. Neben den Veränderungen im Hirnstamm zeigten Zang et al. (2004) auch Hyperintensitäten in der Substantia nigra, Hypointensitäten im Cerebellum und lateralen zerebralen Kortex, sowie eine Gehirnatrophie. Diese Veränderungen wurden von anderen Gruppen bisher noch nicht bestätigt.

Neben der MRT steht mit der Magnetresonanzspektroskopie (MRS) ebenfalls eine nicht-invasive Methode zur Verfügung, mit der Stoffwechselvorgänge im Körper *in-vivo* analysiert werden können. Die MRS ermöglicht es die Metabolitenzusammensetzung und deren Veränderung in verschiedenen Gehirnregionen zu ermitteln. MRS-Studien an ALS-Patienten zeigten eine erniedrigte Konzentration des Metabolits N-Acetylaspartat im motorischen Kortex (Abe et al., 2001; Block et al., 1998; Bradley et al., 1999; Ellis et al., 1998; Gredal et al., 1997; Kalra et al., 2006; Suhy et al., 2002), im Hirnstamm (Bradley et al., 1999) sowie im Kortikospinaltrakt (Kalra und Arnold, 2004). Dieser Verlust von N-Acetylaspartat wird mit einem Neuronenverlust in Verbindung gebracht. Im transgenen G93A-SOD1 Mausmodell wurden im Hirnstamm und im Rückenmark

mit *in-vitro* MRS eine erniedrigte Konzentration von N-Acetylaspartat vor dem Auftreten der ersten Symptome gefunden (Nießen et al., 2007).

1.7 Ziele dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist eine Charakterisierung der präklinischen Phase der ALS im Hirnstamm des transgenen G93A-SOD1 Mausmodells, d.h. vor dem Auftreten der ersten sichtbaren Symptome im Alter von 90 Tagen (Talbot, 2002). So sollten Veränderungen im Hirnstamm longitudinal *in-vivo* mittels MRT untersucht werden. Zu Beginn meiner Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass Hyperintensitäten in verschiedenen motorischen Hirnstammkernen der G93A-SOD1 Maus detektiert und quantifiziert werden können (Angenstein et al., 2004; Nießen et al., 2006; Zang et al., 2004). Im Rahmen meiner Arbeit soll geklärt werden, ob die Progression der Erkrankung im Mausmodell mittels MRT beschrieben und quantifiziert werden kann, um einen geeigneter Biomarker zu identifizieren, mit dem ein Erfolg von therapeutischen Ansätzen im Mausmodell *in-vivo* beurteilt werden kann. Zusätzlich soll geklärt werden, welche morphologischen Veränderungen Grundlage für die im MRT detektierbaren Veränderungen in den Hirnstammkernen sind und wie die periphere Muskulatur durch diese morphologischen Veränderungen beeinflusst wird. Eine weitere Aufgabe bestand darin zu überprüfen, ob durch eine therapeutische Intervention mit dem Antioxidant Vitamin E die präklinische Phase verlängert und die Hyperintensitäten im Hirnstamm beeinflusst werden kann.
Neben den MRT-Experimenten sollen MRS-Untersuchungen zeigen, dass Veränderungen in der Konzentration verschiedener Metabolite auch *in-vivo* im Hirnstamm der G93A-SOD1 Maus detektiert werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und deren Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden transgene männliche Mäuse des Stammes B6SJL(G93A-SOD1) (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA), welche die humane SOD1 mit einer G93A Mutation in großer Kopienanzahl exprimieren (Gurney et al., 1994), mit nicht-transgenen weiblichen B6SJL-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) gepaart. Jedes Tier wurde mittels DNA aus der Schwanzspitze über eine Polymerase Ketten Reaktion (PCR) genotypisiert (siehe Abschnitt 2.2). Die Tiere wurden in Makrolon Standardkäfigen (43 x 26,5 x 16 cm) mit Weichholzgranulat-Einstreu (Altromin, Lage) in Räumen mit S1-Freigabe gehalten. Ein 12h:12h Hell-Dunkel-Wechsel, mit einer Hellphase von 6-18 Uhr, eine durchschnittliche Temperatur von 21°C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 ± 5% und eine Luftumwälzung von 10-15x pro Stunde sorgten für einen geregelten Tag-Nacht-Rhythmus. Den Tieren standen Wasser und Futter (Ssniff M-Z, Ssniff, Soest) ad libitum zur Verfügung.

2.2 Genotypisierung der Tiere mittels PCR

Für eine Genotypisierungsdiagnostik wird Gewebe oder Blut zur DNA-Isolierung benötigt. Da Blutabnahmen bei Mäusen im größeren Maßstab nicht praktikabel sind, wurden um den 21. Tag nach der Geburt bei den Mäusen etwa 0,5 cm der Schwanzspitze gekappt. Aus diesen Gewebeproben wurde die DNA mit Hilfe des DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Zur anschließenden Genotypisierung wurde eine PCR durchgeführt.

Die PCR ist eine *in-vitro* Technik zur Vervielfältigung bzw. Amplifikation von Nukleinsäuren (Saiki et al., 1988) und nutzt die Eigenschaft von DNA-Polymerasen, einen einzelnen DNA-Strang als Matrize für die Synthese des entsprechenden komplementären Stranges zu benutzten, um so die DNA zu replizieren. Die Polymerase benötigt als Startpunkt ein kurzes Stück doppelsträngige DNA, welches man künstlich durch ein Oligonukleotid mit einer

Länge von ca. 20 Basenpaaren (bp) schaffen kann. Werden nun zwei solcher Oligonukleotide, auch Primer genannt, welche je auf dem „sense“ und dem „antisense“ Strang liegen, verwendet, wird nur das Stück zwischen den beiden Primern verlängert.
Auf diese Weise können DNA-Stücke spezifischer Länge selektiv vermehrt werden. Bei jeder Wiederholung des Syntheseverfahrens wird eine neue Kopie erstellt und die Vermehrung erfolgt exponentiell. Theoretisch reicht ein einziger DNA-Strang, um die PCR durchzuführen.
Durch die Verwendung thermostabiler Polymerasen ist es möglich die PCR zyklisch, ohne Unterbrechung, ablaufen zu lassen. Die doppelsträngige DNA wird bei 94°C denaturiert, die Primer lagern sich (Annealing) bei ihrer spezifischen Annealingtemperatur an und die Polymerase führt die Elongation mit Desoxyribonukleotiden (dNTP`s) bei 72°C durch. Nach dem Durchlaufen dieses Zyklusses beginnt ein neuer mit der Denaturierung.

Der PCR-Ansatz wurde wie folgt nach einer im Labor etablierten Standardvorschrift angesetzt. Für einen Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurden folgende Reagenzien zu einem “Master-Mix“ zusammengefügt:

Reagenz	Volumen
Aqua dest.	27,0 µl
10x PCR-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)	5,0 µl
50 mM $MgCl_2$ (Invitrogen, Karlsruhe)	1,5 µl
dNTP`s (Promega, Madison, USA)	4,0 µl
Primer 42	2,0 µl
Primer 43	2,0 µl
Primer 113	2,0 µl
Primer 114	2,0 µl
Taq Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe)	0,5 µl
Gesamtvolumen Master-Mix	46 µl

Tabelle 2-1: Master-Mix-Ansatz für die SOD1-PCR.

Verwendet wurden folgende Primer (Thermo Electron, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA):

Primer	Sequenz
Primer 42: Interleukin-2 (mIL-2)	5`-CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT-3`
Primer 43: Interleukin-2 (mIL-2)	5`-GTAGGTGGAAATTCTAGCATCATC-3`
Primer 113: humane SOD1 (hSOD1)	5`-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3`
Primer 114: humane SOD1 (hSOD1)	5`-CGCGACTAACAATCAAAGTGA-3`

Tabelle 2-2: Sequenzen der Oligonukleotide, welche in der SOD1-PCR verwendet wurden.

Im Anschluss wurde der "Master-Mix" gleichmäßig auf die PCR-Ansätze verteilt und pro Ansatz 4 µl Template-DNA hinzugefügt, um das Gesamtvolumen von 50 µl zu erreichen.
Die PCR-Reaktion fand im T3-Thermocycler (Biometra, Göttingen) statt, wobei folgendes Temperaturprogramm verwendet wurde:

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

Tabelle 2-3: Thermocycler-Programm der SOD1-PCR.

2.3 Gelelektrophorese

Die bei der PCR entstandenen Amplifikate wurden mit einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Elektrophorese ist eine schnelle und einfach durchzuführende Analysemethode, die es ermöglicht DNA-Fragmente nachzuweisen und der Größe nach aufzutrennen. Die Auftrennung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in einem 1,8%igen Agarosegel. Die hierfür benötigte Menge Agarose (Biozym, Oldendorf) wurde in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und mit der entsprechenden Menge 1x TAE-Puffer (Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetat–Puffer; 50x TAE-Puffer: 242,2 g/l Tris (2 M), 37,2 g/l EDTA (Ethylendiamintetraacetat, 100mM), mit Essigsäure auf pH = 8,0 eingestellt) in einem Mikrowellengerät (AEG) bis zur vollständigen Lösung der Agarose erhitzt. Nach dem Abkühlen auf ungefähr 60 °C wurden 8,75 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) pro 100 ml Gel-Lösung hinzugefügt.

Als Laufpuffer wurde standardmäßig 1x TAE-Puffer verwendet. Die Probe wurden mit 1/5 Volumen 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, 100bp DNA Ladder; Fermentas, Burlington, Kanada) mitgeführt. Die angelegte Spannung betrug 80 V.

Die Agarosegele wurden im Anschluss mit Hilfe von UV-Durchlicht im Gel DOC 1000 (Bio-Rad, Hercules, USA) fotografiert.

Als transgen wurde eine Maus bezeichnet, wenn neben einer Bande auf Höhe von 300 bp (IL-2, Kontrolle) im Agarosegel eine deutliche Bande im Bereich von 234 bp (hSOD1) sichtbar war. Als Wildtyp-Maus wurden Tiere bezeichnet, bei denen nur eine Bande im Bereich von 300 bp (IL-2) zu erkennen war (Abb. 2-1).

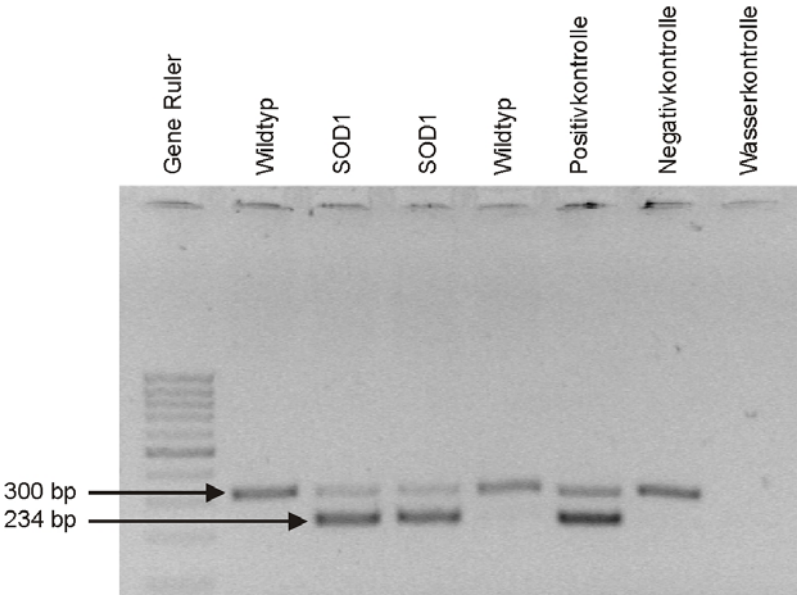

Abbildung 2-1: Agarosegelbild unter UV-Licht einer SOD1-PCR.

2.4 *In-vivo* Bildgebung

2.4.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT stellt heutzutage eine wichtige Methode zur nicht-invasiven Darstellung von Organen des menschlichen und tierischen Körpers dar. Die Geschichte der MRT beginnt mit dem experimentellen Nachweis der magnetischen Kernspinresonanz durch E. Purcell (Purcell et al., 1946) und F. Bloch (Bloch et al., 1946), wofür beide 1952 den Physik-Nobelpreis erhielten. Dies führte in den 60er Jahren zur Entwicklung verschiedener nuklearmagnetischer Spektroskopiemethoden, mit denen insbesondere die Struktur von organischen Molekülen aufgeklärt werden konnte. Durch die Entwicklung komplexer Verfahren zur räumlichen Kodierung von Signalen war es Anfang der 70er Jahre erstmals möglich auch komplexe Objekte, wie den menschlichen Körper, mittels MRT zu untersuchen (Lauterbur, 1973; Mansfield und Grannell, 1977). Durch eine stetige technische Weiterentwicklung kam die MRT im Jahr 1981 zum klinischen Einsatz und wurde in den folgenden Jahren ein wichtiger Bestandteil der medizinischen Forschung und Diagnostik.

Für die klinische Bildgebung wird nahezu ausschließlich die kernmagnetische Resonanz von Protonen (^1H) verwendet. Protonen besitzen wie alle Kerne mit ungerader Massenzahl einen Eigendrehimpuls, den Kernspin (Abb. 2-2a), wodurch sie sich wie ein magnetischer Dipol verhalten. Bei Anlegen eines externen Magnetfeldes (B_0) in z-Richtung eines dreidimensionalen Koordinatensystems richten sich solche Kerne parallel oder antiparallel zur Feldrichtung aus und kreisen (präzedieren) um die Achse des Magnetfeldes mit der Lamorfrequenz ω (Abb. 2-2b).

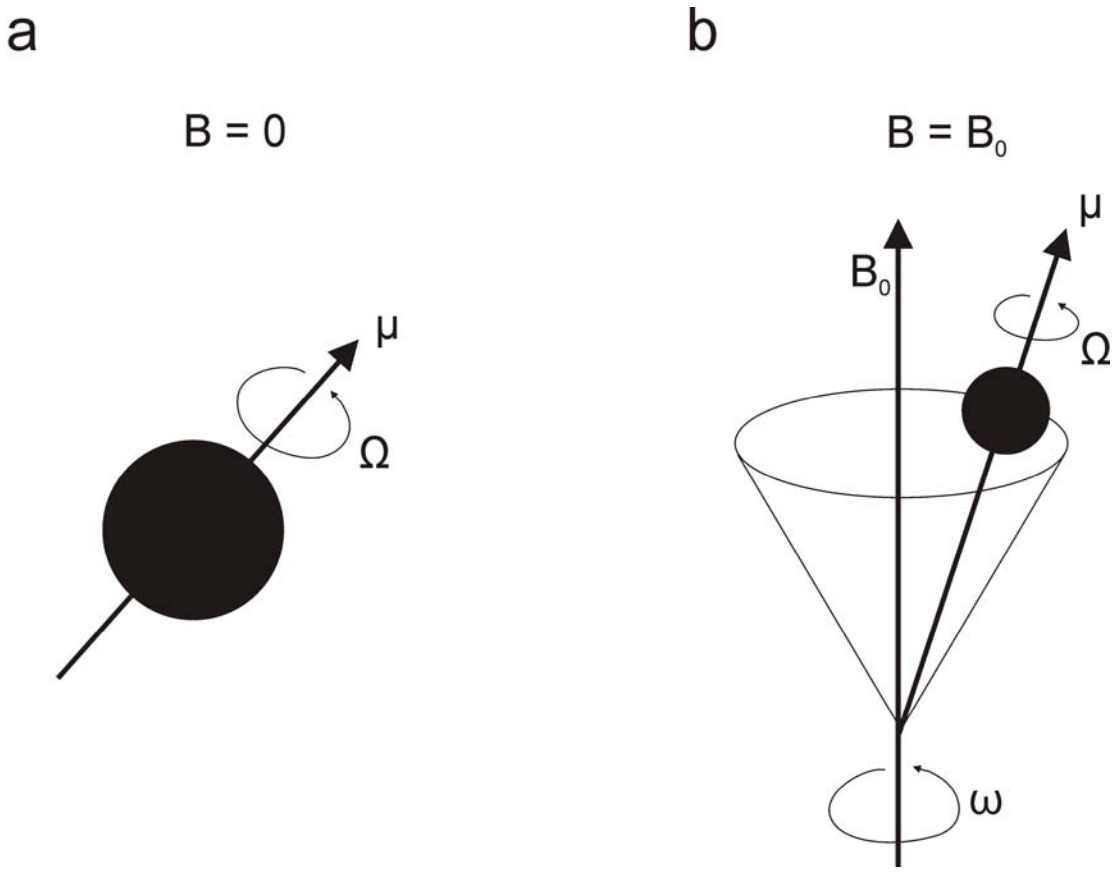

Abbildung 2-2: Kernspin und Präzession. (a) Das magnetische Moment μ wird durch die Kreisbewegung des Atomkerns um seine Achse mit der Frequenz Ω erzeugt. Im magnetfreien Raum (B = 0) sind die magnetischen Momente μ statistisch in alle Raumrichtungen verteilt. (b) Zusätzlich zur Eigenrotation (Ω) präzedieren Spins in einem Magnetfeld B_0 mit der Frequenz ω (Lamorfrequenz) um die Magnetfeldachse (verändert nach Hausser und Kalbitzer, 1989).

Die Lamorfrequenz verhält sich direkt proportional zur Stärke des externen Magnetfeldes (B_0) sowie einer kerntypischen Proportionalitätskonstante und liegt für gewöhnlich im Hochfrequenzbereich (50-300 MHz):

$$\omega = \gamma \cdot B_0$$

ω = Lamorfrequenz [MHz]

γ = gyromagnetische Konstante [MHz/T]

B_0 = Magnetfeldstärke [T]

Die Nettomagnetisierung bei Anlegen eines externen Magnetfeldes entspricht der geringen Differenz zwischen parallel und antiparallel ausgerichteten Spins. Diese Ausrichtung steht stellvertretend für zwei unterschiedliche Energiezustände: einen niedrigen (parallel) und einen hohen (antiparallel). Wirkt nun auf die Spins im statischen äußeren Magnetfeld ein magnetisches Wechselfeld ein, dessen Frequenz der Lamorfrequenz der Atomkerne entspricht, so beobachtet man eine sehr starke Wechselwirkung, die als Nuklearmagnetische Resonanz bezeichnet wird: Durch einen Radiofrequenzpuls entsprechender Amplitude und Dauer kippt die Nettomagnetisierung der Atomkerne aus der Richtung des äußeren Magnetfeldes. Nach der Anregung eines Spinsystems durch einem Radiofrequenzpuls, verhält es sich anfangs wie ein zusammenhängendes System. Alle magnetischen Dipole präzedieren in Phase, wobei einige Atomkerne vom niedrigen auf das höhere Energieniveau angehoben wurden. Nach der Abschaltung des Hochfrequenzpulses treten die Kerne in Wechselwirkung mit ihrer Umgebung und geben die aufgenommene Energie unterschiedlich schnell wieder ab. Dieses Phänomen wird als Grundlage für die Bildgebung verwendet und ist von einer Hochfrequenzspule (Empfangsspule) quantitativ messbar. Die Energie wird in der Empfangsspule als MRT-Signal aufgenommen und zur Bilderzeugung weiterverarbeitet (Stark und Bradley, 1988). Die Zeit, welche die Dipole benötigen, um ihren Ausgangswert wieder zu erreichen, wird durch die Zeitkonstanten Spin-Gitter-Relaxation T_1 (auch longitudinale Relaxationszeit) und Spin-Spin-Relaxation T_2 (auch transversale Relaxationszeit) charakterisiert. Beide Relaxationen laufen gleichzeitig und unabhängig voneinander ab. Als Spin-Gitter-Relaxation wird die Rückkehr der angeregten Kerne vom antiparallelen wieder in den energetisch günstigeren parallelen Ausgangszustand nach Abschalten des Pulses bezeichnet. Die dabei freiwerdende Energie wird größtenteils als Wärme abgegeben. Die

Rückkehr in den Ausgangszustand wird durch die T_1-Relaxationszeit charakterisiert, die angibt in welcher Zeit ein System nach Auslenkung durch einen 90°-Puls 63 % seines Gleichgewichtswertes erreicht hat. Die Spin-Spin-Relaxation beinhaltet das Auseinanderlaufen (Dephasieren) der Protonen. Das gemessene Signal zeigt dabei einen exponentiellen Abfall, welcher als freier Induktionszerfall bezeichnet wird. Der Signalabfall beruht auf Feldinhomogenitäten des äußeren Magnetfeldes und statischen oder oszillierenden Feldern benachbarter Atomkerne oder Elektronen. Beide Vorgänge verändern geringfügig die Lamorfrequenz der individuellen Kerne, so dass diese dephasieren und sich dadurch gegenseitig auslöschen. Die T_2-Relaxationszeit ist die Zeit, in der die Transversalmagnetisierung auf 37 % des ursprünglichen Wertes zurückgegangen ist. In biologischen Geweben liegen die Werte normalerweise im Millisekundenbereich, wobei die T_1-Relaxationszeit größer ist als die T_2-Relaxationszeit. Je nach Körpergewebe besitzen T_1- und T_2-Relaxationszeit unterschiedliche Werte und bestimmen den Kontrast im MRT-Bild.

Oft werden Spin-Echo-Sequenzen (SE-Sequenzen) zur Untersuchung eingesetzt. Diese Sequenzen werden unter anderem durch ihre Repetitionszeit (engl.: time of repetition, TR) und ihre Echozeit (engl.: echo time, TE) charakterisiert. Die TR ist dabei der zeitlich Abstand zwischen zwei Messungen. Die TE dagegen kennzeichnet den Zeitpunkt der Signalmessung. Auf einen 90°-Anregungspuls folgt nach der halben TE ein nachgeschalteter 180°-Puls zur Refokussierung der dephasierenden Protonen und das Signal wird nach Verstreichen der TE gemessen. Anschließend wird die Pulsfolge wiederholt. Durch eine Summation der Wiederholungen addiert sich das gemessene Signal, während sich das Hintergrundrauschen herausmittelt und so das Signal-Rausch-Verhältnis erhöht wird. Haben SE-Sequenzen eine kurze TR (< 500 ms) und kurze TE (< 30 ms), so sind diese Aufnahme T_1-gewichtet. Bei langer TR (> 1500 ms) und langer TE (> 80 ms) ist die Aufnahme T_2-gewichtet. Durch den Einsatz unterschiedlicher Sequenzen lassen sich in den MRT-Bildern damit nicht nur verschiedene Gewebe differenzieren, sondern auch pathologische Vorgänge und Bewegungen sichtbar machen.

Für eine Ortsauflösung zur Darstellung inhomogener Objekte im MR-Tomographen wird das Prinzip der Fourier-Bildgebung verwendet (Kumar et al., 1975). Zusätzlich zum statischen Hauptmagnetfeld werden magnetische Gradientenfelder angelegt, wodurch das Magnetfeld ortsabhängig verändert wird. Um einen Ort im Magnetfeld vollständig zu kodieren, werden drei dieser Gradientenfelder so angelegt, dass über alle drei Raumrichtungen ein Koordinatensystem mit spezifischen Feldstärken aufgespannt wird. Da die Präzessionsfrequenz der Spins von der Stärke des externen Magnetfeldes abhängig ist, wird es möglich, die Spinensembles der einzelnen Volumen Pixel (Voxel) aufgrund ihrer Winkelgeschwindigkeiten sowohl ortsabhängig zu unterscheiden als auch ortsspezifisch anzuregen und zu messen. Wenn jedes einzelne Voxel über einen Hochfrequenzpuls gezielt angeregt und aufgezeichnet wird, können die einzelnen Bildbestandteile durch Rekonstruktion zu einem MRT-Bild zusammengefügt werden.

2.4.2 Untersuchung des Hirnstamms mittels Magnetresonanz-tomographie (MRT)

Die Daten der MRT wurden an einem Biospec 47/40 Tomographen (Bruker BioSpin, Ettlingen, Abb. 2-3) akquiriert, welcher sich im *In-vivo*-Imaging Labor der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG in Biberach befindet.



Abbildung 2-3: 4,7 Tesla MR-Tomograph bei Boehringer Ingelheim, Biberach.

Der Tomograph ist ausgerüstet mit einem BGA12 Gradientensystem (200 mT/m). Zur Anregung der Spins wurde eine Volumenspule verwendet, während das MRT-Signal mit einer für Mäuse optimierten Oberflächenspule (Eigenbau Boehringer Ingelheim; Abb. 2-4) erfasst wurde.

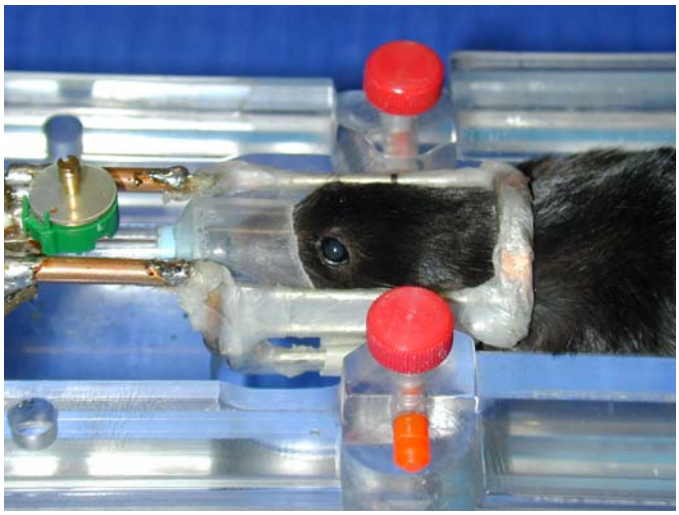

Abbildung 2-4: Stereotaktisch fixierte Maus mit Oberflächenspule.

Für die Bildgebung wurden transgene G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse mittels 1.2-1.5% Isofluran (Florene, Abbott, USA; in 70:30 N_2O:O_2, v:v) kontinuierlich narkotisiert und der Kopf in einer stereotaktischen Halterung fixiert (Eigenbau Boehringer Ingelheim, Abb. 2-5). Zur anatomischen Orientierung wurde eine T_2-gewichtete Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement Sequenz (RARE, Hennig et al. 1986) zur Aufnahme von elf kontinuierlichen sagittal-medialen Schnitten, welche den Bereich des Hirnstamms abdeckten, verwendet. Die folgenden Parameter wurden verwendet: TR 2100 ms, TE 20 ms, TE_{eff} (effektive Echozeit) 81 ms, Schichtdicke 600 µm, Field-of-view 30 x 30 mm², 256x256 Matrix, RARE Faktor 8, 16 Mittelungen. Im Anschluss wurden axial orientierte T_2-gewichtete Bilder des Hirnstamms mit ansteigender Echozeit unter Verwendung folgender Parameter aufgenommen: Multi-Slice Multi-Echo (MSME, T_2-gewichtet), TR 4000 ms, 16 Echos, TE Bereich von 10,1 bis 161 ms in gleichen Abständen, 11 Schichten, Schichtdicke 600 µm, Field-of-view 28,1 x 25,6 mm², 256x128 Matrix, 2 Mittelungen. Die gesamte Akquisitionszeit betrug 45 min. Die Messungen wurden alle zwanzig Tage im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen nach Geburt durchgeführt.

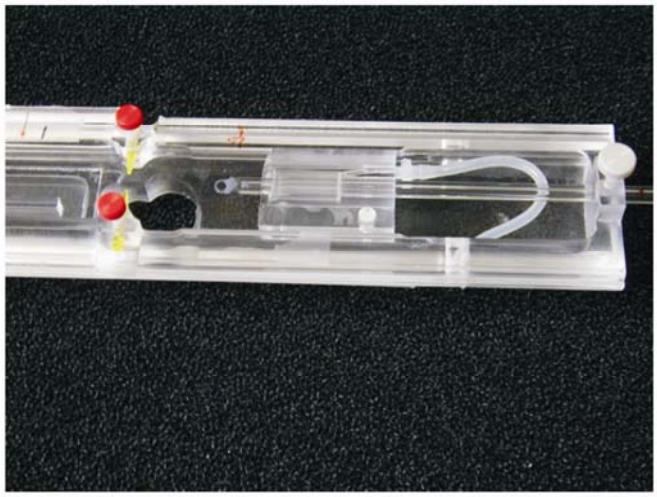

Abbildung 2-5: Stereotaktische Halterung zur Fixierung des Mausschädels.

2.4.3 Untersuchung des Hirnstamms Vitamin E-behandelter Tiere mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Zur Untersuchung des Einflusses von Vitamin E auf den Hirnstamm von transgenen G93A-SOD1 Mäusen wurden die Tiere am Tag 30 voneinander getrennt und in Einzelkäfige gebracht. Ab diesem Zeitpunkt wurden die transgenen und Wildtyp-Tiere oral mit Vitamin E behandelt. Hierfür wurde das Standardfutter mit 672 mg/kg des Wirkstoffes all-rac-α-Tocopherol (Evion 100, Merck, Darmstadt), was 450 mg Vitamin E entspricht, versetzt (Ssniff, Soest). Das Futter stand den Tieren ad libitum zu Verfügung.

Für die Bildgebung wurden transgene G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse wie in Abschnitt 2.4.2 narkotisiert, in der stereotaktischen Halterung fixiert und die Messungen im Biospec 47/40 Tomographen bei 4,7 Tesla (Bruker BioSpin, Ettlingen; Abb. 2-2) mit folgenden Parametern durchgeführt: TR 4000 ms, TE 20 ms, TE_{eff} 81 ms, 5 Schichten, Schichtdicke 800 mm, Field-of-view 30 x 30 mm², 256x256 Matrix, RARE Faktor 8, 6 Mittelungen. Im Anschluss wurden axial orientierte T_2-gewichtete Bilder des Hirnstamms mit ansteigender Echozeit unter Verwendung folgender Parameter aufgenommen: Multi-Slice Multi-Echo (MSME, T_2-gewichtet), TR 4000 ms, 16 Echos, TE Bereich von 10,1 bis 20,2 ms in gleichen Abständen, 5 Schichten, Schichtdicke 800 µm, Field-of-view 30 x 30 mm²,

128x128 Matrix, 4 Mittelungen. Auch hier wurden die Messungen alle zwanzig Tage im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen nach Geburt durchgeführt.

2.4.4 Auswertung der T_2-gewichteten Bilder

Bei allen Tieren wurden die Hirnstammkerne Nukleus Nervus (Nc. Nv.) facialis, Nc. Nv. hypoglossus und Nc. Nv. trigeminus (im Folgenden werden die Kerne mit Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus bezeichnet) mit Hilfe eines anatomischen Atlasses des Mäusegehirns (Paxinos und Franklin, 2000) identifiziert. Zudem wurden mit der ParaVision Software (Bruker BioSpin MRI, Ettlingen) regions-of-interest (ROIs) auf den Hyperintensitäten (Abb. 2-6) festgelegt.

Mit Hilfe dieser ROIs wurden die Hyperintensitäten in den RARE-Bildern umrandet und die Fläche bestimmt. Anhand der ROIs in den MSME Bilddatensätzen wurde die T_2-Relaxationszeit für die Hirnstammkerne an den verschiedenen Messzeitpunkten bestimmt. Dabei sind die T_2-gewichteten Bilder unabhängig von den T_1-Werten. Sie besitzen die gleiche T_1-Gewichtung. Damit bedeutet eine Änderung im Grauwert der Bilder bei unterschiedlichen Echozeiten eine T_2-Änderung, welche exponentiell über die Echos abnimmt.

Beim Vergleich der Vitamin E-behandelten mit den unbehandelten Mäusen wurden zusätzlich für jedes Tier einzeln die T_2-Werte gegen die Untersuchungszeitpunkte 60, 80, 100 und 120 Tagen aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade durch die Werte gelegt. Für jede Gerade wurde die Steigung als Maß für die Progression der T_2-Werte in Abhängigkeit vom Alter der Tiere bestimmt.

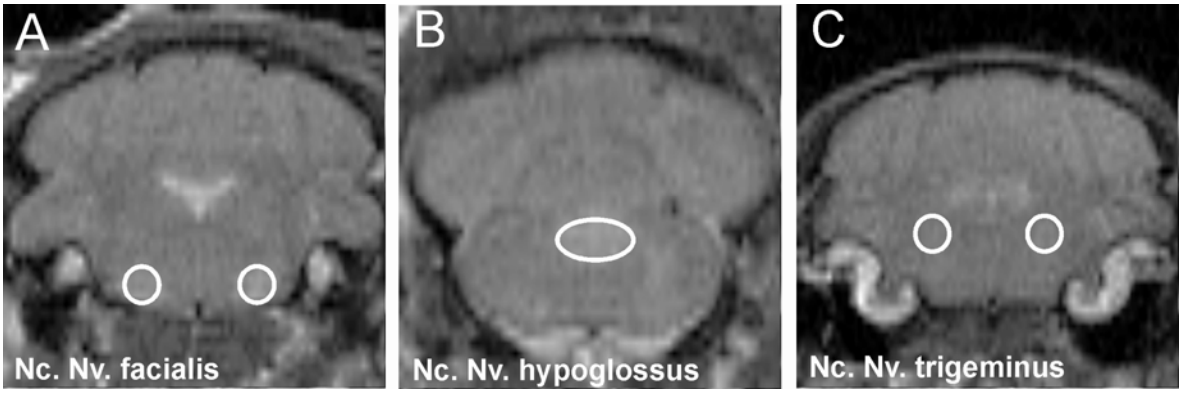

Abbildung 2-6: Axiale T_2-gewichtete MRT-Bilder mit ROIs, welche die Hirnstammkerne Nc. Nv. facialis (A), Nc. Nv. hypoglossus (B) und Nc. Nv. trigeminus (C) erfassen.

2.4.5 Statistik zur Auswertung der T_2-gewichteten Bilder

Die statistische Auswertung erfolgte mit SAS Version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) und S-Plus 6.1 (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA) durch die Abteilung Biostatistik der Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co KG in Biberach. Die transversalen Relaxationszeiten wurden mit einer nichtparametrischen zweifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren Genotyp (transgen oder wildtyp) und Alter (40, 60, 80, 100 und 120 Tage nach Geburt) nach statistischen Unterschieden untersucht (Sachs, 1999). Für den paarweisen Vergleich zwischen transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Tieren an jedem Messzeitpunkt wurde ein Bonferroni-Holm-korrigierter zweiseitiger U-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney (Sachs, 1999) verwendet. Für Vergleiche innerhalb eines Genotyps wurde ein Bonferroni-Holm-korrigierter zweiseitiger Wilcoxon Test für Paardifferenzen (Sachs, 1999) verwendet. Die Flächen der Hyperintensitäten wurden mit Hilfe eines Bonferroni-Holm-korrigierten zweiseitigen Wilcoxon Test für Paardifferenzen (Sachs, 1999) vergleichen. Die Steigungen der linearen Regressionsgeraden als Maß für die Progression der T_2-Werte in Abhängigkeit vom Alter wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA), welche post-hoc Bonferroni-korrigert wurde, untersucht (Sachs, 1999).
Bei allen statistischen Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ bei zweiseitigen Tests festgelegt.

2.5 Magnetresonanzspektroskopie (MRS)

Die MRS ist eine nicht-invasive, biochemisch-analytische Methode, mit welcher Stoffwechselvorgänge und deren pathologische Veränderungen im menschlichen Körper *in-vivo* untersucht werden können. Mit der ^{1}H-MRS können die Resonanzen der ^{1}H-Kerne verschiedener Metaboliten unterschieden werden. Im Gegensatz dazu wird in der MRT nur die Resonanz der ^{1}H-Kerne des Wassers genutzt. Die ^{1}H-MRS erfordert eine Unterdrückung des von den Wassermolekülen ausgehenden Signals durch besondere Pulssequenzen. Außerdem ist ein sehr homogenes Magnetfeld notwendig, da innerhalb eines relativ kleinen Frequenzbereichs zahlreiche Resonanzsignale auftreten. Es werden zwei verschiedene Messtechniken zur räumlich definierten MRS eingesetzt: die Single-Voxel-Spektroskopie (SVS) und das Chemical Shift Imaging (CSI), auch Multivoxel-Proton-MRS genannt. Durch diese Sequenzen besteht die Möglichkeit, Signale aus einem oder mehreren Volumenelementen zu erhalten und damit Aussagen über Stoffwechselvorgänge in einem genau definierten Areal zu gewinnen. In dieser Arbeit wurde die SVS verwendet. Diese Technik erstellt ein Spektrum aus einem genau definierten Voxel. Hierfür wird zunächst ein Schichtgradient während des Anregungspulses in z-Richtung angelegt. Außerdem werden nur Spins einer definierten Schicht angeregt. Die Ausdehnung der Schicht wird durch die Larmorfrequenz der Spins, die Frequenz des Anregungspulses und den Schichtgradienten bestimmt. Um ein Voxel aus einer Schicht zu erhalten, werden Schichtgradienten kombiniert, die auf mehrere aufeinanderfolgende Anregungspulse verteilt sind. Es gibt verschiedene Methoden, denen dieses Prinzip zugrunde liegt. Dazu gehören PRESS (point-resolved spectroscopy), STEAM (stimulated echo acquiring method) und ISIS (image-selected in-vivo spectroscopy). In der vorliegenden Arbeit wurde eine PRESS-Sequenz verwendet.

2.5.1 Untersuchung des Hirnstamms mittels Magnetresonanz-spektroskopie (MRS)

Für die ^{1}H-MRS wurden Vitamin E-behandelte transgene G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse im Alter von 120 Tagen einmalig wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben

narkotisiert und fixiert. Die ^{1}H-MR-Spektren des Hirnstamms und des Cerebellums wurden an einem Biospec 47/40 Tomographen (Bruker BioSpin, Ettlingen; Abb. 2-3) akquiriert. Für die Messung wurde ein Voxel im Bereich des Hirnstamms und ein Voxel im Bereich des Cerebellums platziert (Abb. 2-7), anschließend erfolgte die Akquisition mit einer PRESS-Sequenz (point-resolved spectroscopy) unter Verwendung folgender Parameter: TR 1600, TE 10ms, 1024 Mittelungen (NEX), 2048 Datenpunkte, SW (spektrale Weite) 4000Hz. Die Größe des Voxels im Hirnstamm betrug 3 x 1,35 x 2,4 mm^3, des Voxels im Cerebellum 2,5 x 1,35 x 2,4 mm^3. Die gesamte Messzeit betrug 54 min 36s.

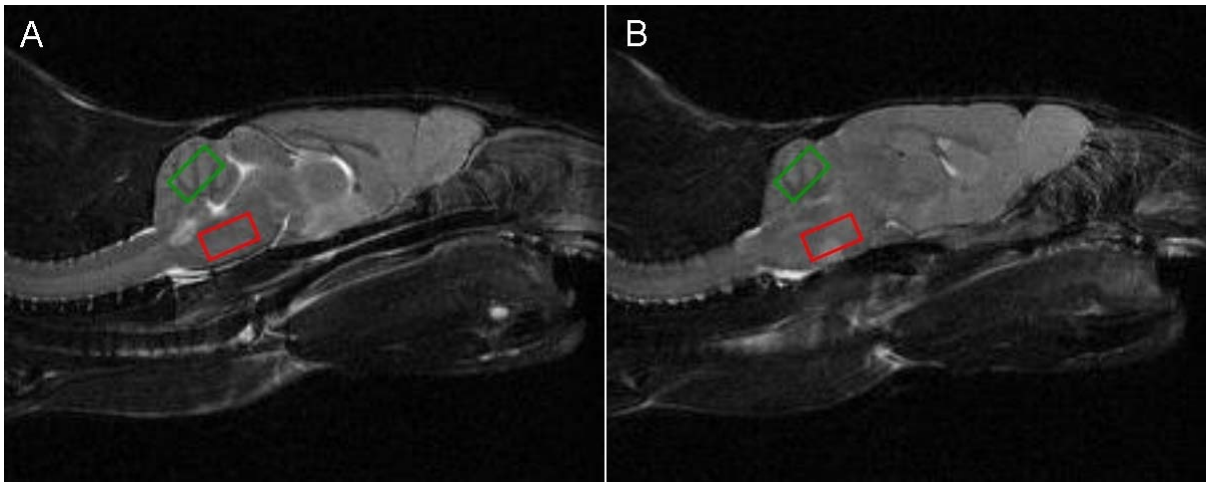

Abbildung 2-7: Voxel-Position im Hirnstamm (rot) und Cerebellum (grün) an Bregma-Position 0,0 mm (A) und Bregma-Position 0,6 mm (B) sagittal.

2.5.2 Auswertung der Magnetresonanz-Spektren

Die Auswertung der Spektroskopie-Daten erfolgte mit Hilfe des LCModel-Software-Pakets von S.W. Provencher (1993). Untersucht wurden folgende Metabolite: Inositol, Cholin, Kreatin, Glutamin, Glutamat, N-Acetylaspartat, Laktat und γ-Aminobuttersäure. Bei der Bestimmung der Metabolitenkonzentrationen wurde die Fläche unter der Kurve des entsprechenden Peaks ermittelt und als Verhältnis zu Kreatin ausgedrückt. Hiefür wurde Kreatin auf 100% gesetzt. Im G93A-SOD1 Mausmodell für ALS wurde bereits gezeigt, dass die Kreatinkonzentration im Hirnstamm konstant bleibt (Nießen et al., 2007).

2.5.3 Statistik zur Auswertung der Magnetresonanz-Spektren

Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat 3.1 und Sigma Plot 9.0. Nach statistischen Unterschieden in den Metabolitenkonzentrationen des Hirnstamms und des Cerebellums bei den transgenen und den Wildtyp-Mäusen wurden mit Hilfe des Student`s t-Test (Sachs, 1999) gesucht.
Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ bei zweiseitigen Tests festgelegt.

2.6 Histologische Untersuchungen des Hirnstamms

2.6.1 Präparation des Gehirns und Hämatoxilin und Eosin-Färbung

Transgene G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse wurden mit 25%-igem Chloralhydrat (0,36 mg/kg Körpergewicht; Merck) betäubt und durch intrakardiale Perfusion mit 0,9% NaCl getötet. Zur Fixierung wurden die Mäuse anschließend mit 4% Paraformaldeyd (Sigma-Aldrich, Steinheim) perfundiert und das Gehirn herauspräpariert. Formaldehyd reagiert mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung quervernetzter Hydroxymethylgruppen kommt. Somit ist die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering und die Struktur zytoplasmatischer Proteine wird kaum verändert.
Die Einbettung der Gehirne erfolgte in einem Einbettautomaten (STP 120, Microm, Walldorf). Daraufhin wurden die Gewebe in vorbereitete Formen gegeben mit Paraffin (Tyco Healthcare Group LP, Mansfield, USA) fixiert und bei Raumtemperatur ausgehärtet.
Mit einem Microtom (Microm) wurden Frontalschnitte des Hirnstammes von 7 µm Dicke angefertigt, im Wasserbad (Typ SB80, Medax Nagel, Kiel) gestreckt, auf Objektträger (Superfrost Objektträger, VWR) gezogen und zur vollständigen Streckung auf eine 40°C warme Heizplatte (Medax Nagel) gelegt. Für eine bessere Fixierung der Gehirnschnitte auf den Objektträgern wurden diese über Nacht bei 60°C in einen Wärmeschrank gebracht.

Zur Entparaffinierung der Schnitte wurden die Objektträger zweimal für 2 min in 100% Xylol gebracht. Im Anschluss wurden die entparaffinierten Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min 2x100% Isopropanol, 96% Isopropanol und 75% Isopropanol) gewässert. Nach kurzem Spülen in Aqua dest. erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun (Merck) für 6-7 min. Zum Bläuen wurden die Schnitte für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Nach der 1-minütigen Färbung mit 0,5% Eosin (Carl Roth, Karlsruhe) und wiederholtem Abspülen der Objektträger mit Aqua dest. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min 75% Isopropanol, 96% Isopropanol, 2x100% Isopropanol, 2x100% Xylol) entwässert und mit Entellan (Merck) eingebettet.

2.6.2 Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Gehirnschnitte

Nach der Färbung mit Hämatoxilin und Eosin (H & E) wurden die Schnitte bei 20-facher Vergrößerung am Lichtmikroskop (Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena) ausgewertet, wobei Bilder mit einer angeschlossenen Digitalkamera (AxioCam, Carl Zeiss, Jena) aufgenommen wurden. Bei jedem Tier wurden die Hirnstammkerne Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus mit Hilfe eines anatomischen Atlasses des Mäusegehirns (Paxinos und Franklin, 2000) identifiziert. Ausgewertet wurde je ein Schnitt pro Tier aus dem mittleren Drittel der Hirnstammkerne. Hierfür wurde ein Bild aufgenommen und in einem Feld von 17,5 mm^2 die Anzahl der Vakuolen gezählt. Um Doppelzählungen zu vermeiden wurde der Zählbereich zusätzlich in 9 gleich große Felder unterteilt. Nur Vakuolen mit einem Durchmesser größer als 3 µm wurden gezählt.

Zusätzlich wurden bei jedem Tier ebenfalls in einem Schnitt aus dem mittleren Drittel des Hirnstammkerns die Motoneurone gezählt, wobei nur Neurone, welche sich aufgrund der Größe von den anderen Neuronenklassen unterschieden, mit deutlich sichtbarem Nukleus und Nukleolus gezählt wurden. Die Anzahl der Motoneurone wurde hier nicht in einem Feld von 17,5 mm^2 bestimmt, sondern pro Fläche, die der Kern im jeweiligen histologischen Präparat einnahm.

2.6.3 Statistik zur Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Gehirnschnitte

Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat 3.1 und Sigma Plot 9.0. Die Anzahl der Vakuolen wurde zwischen verschiedenen Untersuchungszeitpunkten mit Hilfe einer Bonferroni-korrigierten einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch miteinander verglichen (Sachs, 1999). Auch die Anzahl an Motoneuronen wurde innerhalb des Genotyps (transgen oder wildtyp) mit Hilfe einer Bonferroni-korrigierten einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) statistisch untersucht (Sachs, 1999). Nach statistischen Unterschieden zwischen den Genotypen wurde mit dem Student`s t-Test (Sachs, 1999) gesucht.
Bei allen statistischen Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ bei zweiseitigen Tests festgelegt.

2.7 Histologische Untersuchungen der Zunge

2.7.1 Präparation der Zungen

Transgene G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen nach Geburt wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Zungen so schnell wie möglich herauspräpariert. Anschließend wurden die Zungen in 2-Methylbutan (Roth) auf Trockeneis schockgefroren. Im Gefriermikrotom (HM500 OM, Microm) wurden bei -12°C Frontalschnitte von 10 µm Dicke angefertigt, die auf Objektträger (Superfrost, VWR) aufgezogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

2.7.2 Hämatoxilin und Eosin-Färbung der Zungenschnitte

Zur Fixierung der Zungenschnitte wurden die Objektträger für 15 min in 4%iges Paraformaldeyd gebracht (J.T. Baker, Phillipsburg, USA), welches in 0,1M PBS (phosphate buffered saline) mit pH = 7,4 angesetzt wurde. Anschließend wurden

die Schnitte kurz in Leitungswasser abgespült und für 2 min in Aqua dest. gebracht. Nach der Kernfärbung mit filtriertem Hämalaun (Merck) für 1 min und kurzem Spülen mit Aqua dest. erfolgte eine Differenzierung in 1% HCl-Alkohol (Merck). Danach wurden die Schnitte zum Bläuen für 15 min unter fließendem Leitungswasser abgespült. Nach nochmaligem kurzen Spülen in Aqua dest. erfolgte die Zytoplasmafärbung für 10 min in 0,5%igem Eosin (Roth). Auch nach diesem Schritt wurden die Schnitte in Aqua dest. abgespült. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 min 70% Isopropanol, 80% Isopropanol, 96% Isopropanol, 2x100% Isopropanol, je 5 min 2x100% Xylol) wurde entwässert und mit Entellan (Merck) eingebettet.

2.7.3 Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Zungenschnitte

Nach der histologischen Bearbeitung wurden die Zungenschnitte unter dem Lichtmikroskop (Olympus BX 51, Olympus, Japan) bei 20facher Vergrößerung morphometrisch ausgewertet. Die Zunge ist aus Längs- und Quermuskulatur aufgebaut. Für die Auswertung wurde nur die Quermuskulatur betrachtet. Bei allen Tieren wurde der mittlere Faserdurchmesser bestimmt. Hierfür wurde der Durchmesser in jedem Muskelschnitt bei 40 durchschnittlich großen Muskelzellen bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass jede Muskelzelle ein Parallelogramm darstellt. Der kleinste Abstand zweier Seiten im Parallelogramm wurde als Muskelfaserdurchmesser bezeichnet. Der kleinste, bzw. größte Muskelfaserdurchmesser wurde bei den 40 kleinsten, bzw. größten im Schnitt auffindbaren Muskelzellen bestimmt.

2.7.4 Statistik zur Auswertung der Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Zungenschnitte

Die statistische Auswertung erfolgte mit Sigma Stat 3.1 und Sigma Plot 9.0. Der kleinste, mittlere und größte Muskelfaserdurchmesser wurde innerhalb des Genotyps (transgen oder wildtyp) mit einer Bonferroni-korrigerten einfaktoriellen

Varianzanalyse (ANOVA) statistisch miteinander verglichen (Sachs, 1999). Nach statistischen Unterschieden zwischen den Genotypen wurde mit dem Student`s t-Test (Sachs, 1999) gesucht.

Bei allen statistischen Tests wurde als Signifikanzniveau eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ bei zweiseitigen Tests festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm transgener G93A-SOD1 Mäuse

Die transgene G93A-SOD1 Maus zeigt einen progressiven Verlust von Motoneuronen, vor allem im Vorderhorn des Rückenmarks. Eine direkte Untersuchung des Rückenmarks ist aufgrund der limitierten Größe sehr schwierig. Da sich im Hirnstamm ebenfalls Motoneurone befinden, wurde dieser nun mit Hilfe von MRT *in-vivo* untersucht.

Alle transgenen Tiere zeigten im Laufe der Erkrankung Veränderungen im Hirnstamm. In Abbildung 3-1 sind T_2-gewichtete MRT-Bilder exemplarisch für eine transgene G93A-SOD1 und eine Wildtyp-Maus longitudinal dargestellt. Am Tag 80 nach der Geburt wurden bei allen transgenen Tieren zwei Hyperintensitäten in den Aufnahmen sichtbar (Abb. 3-1E). Sie lagen im Bereich des Nukleus hypoglossus (Nc. Nv. XII) und Nukleus facialis (Nc. Nv. VII). Im Alter von 100 Tagen zeigte sich bei den transgenen Mäusen eine weitere Hyperintensität im Bereich des Hirnstamms (Abb. 3-1G), welche dem Bereich des Nukleus trigeminus (Nc. Nv. V) zugeordnet werden konnte. Im Alter von 120 Tagen schließlich waren diese drei motorischen Hirnstammkerne deutlich in den Aufnahmen aller transgenen Tiere sichtbar. Vor dem Tag 80 konnten keine Veränderungen im Hirnstamm der transgenen Tiere festgestellt werden (Abb. 3-1A, C). Die MRT-Untersuchungen der Wildtyp-Tiere zeigten zu keinem Messzeitpunkt Veränderungen im Hirnstamm (Abb. 3-1B, D, F, H, K). Neben den Veränderungen im Hirnstamm, waren bei den SOD1-Mäusen in keinem anderen Bereich des Gehirns Veränderungen im MRT-Signal zu erkennen.

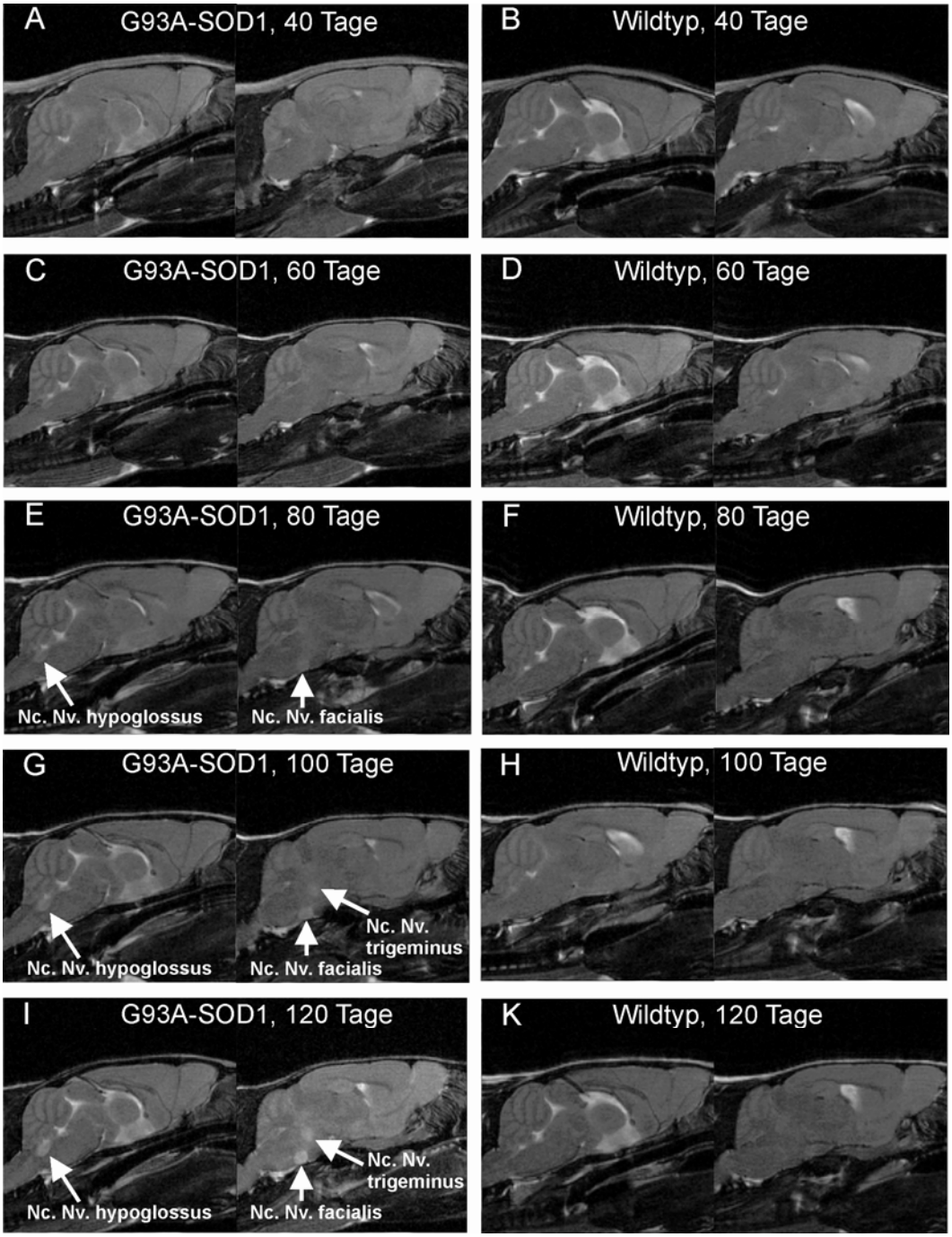

Abbildung 3-1: Entwicklung der Hyperintensitäten im Hirnstamm transgener G93A-SOD1 Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Sagittale RARE-Bilder an Bregma-Position 0,0 mm (links) und Bregma-Position 0,6 mm (rechts). A, C: In den Aufnahmen einer 40 und 60 Tage alten transgenen Maus sind keine Veränderungen erkennbar. E: Im Hirnstamm der transgenen Maus im Alter von 80 Tagen sind die motorischen Hirnstammkerne Nc. Nv. XII und Nc. Nv. VII als Hyperintensitäten sichtbar. G: An Tag 100 wird der Nc. Nv. V sichtbar. I: Am letzten Messzeitpunkt heben sich die drei Hirnstammkerne deutlich vom umliegenden Gewebe ab. B, D, F, H, K: Im Hirnstamm der Wildtyp-Maus sind zu keinem der fünf Messzeitpunkte Veränderungen sichtbar.

Damit lassen sich im Hirnstamm des G93A-SOD1 Mausmodells für die Amyotrophe Lateralsklerose im T_2-gewichteten MRT deutliche Veränderungen in Form von Hyperintensitäten in motorischen Hirnstammkernen nachweisen. Diese Veränderungen sind bereits sichtbar, bevor sich die ersten Anzeichen der Erkrankung bei den Mäusen in Form von Hinterbeinmuskelatrophie um den Tag 90 zeigen (Talbot, 2002). Im späteren Verlauf der Erkrankung werden die Hyperintensitäten immer ausgeprägter. Im Alter von 120 Tagen, wenn die Mäuse im Endstadium der Erkrankung bereits gelähmt sind, grenzen sich die drei motorischen Hirnstammkerne Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus deutlich vom umliegenden Gewebe ab.

Zur Quantifizierung der einzelnen Hyperintensitäten wurden die T_2-Relaxationszeiten für die beide Versuchsgruppen (G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere) für jeden Messzeitpunkt (40, 60, 80, 100 und 120 Tage nach Geburt) bestimmt. Die Werte waren teilweise nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurden sie nicht gemittelt. Stattdessen wurden alle Daten mit Median und Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) sowie den Spannweiten dargestellt, um einen Vergleich möglich zu machen.

In Abbildung 3-2 sind die T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis für die zwölf transgenen Tiere und die sieben Wildtyp-Tiere für die Messzeitpunkte 40, 60, 80, 100 und 120 Tage nach Geburt dargestellt. Die einzelnen Mediane der T_2-Relaxationszeiten für beide Versuchsgruppen sind in Tabelle 3-1 zu finden.

Die nichtparametrische zweifaktorielle Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich des Genotyps (ANOVA, $p < 0{,}001$) und des Alters (ANOVA, $p < 0{,}001$). Die T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis der transgenen Mäuse steigen signifikant von Tag 40 bis zum letzten Messzeitpunkt im Alter von 120 Tagen nach Geburt an (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0{,}01$). Die T_2-Relaxationszeit nimmt demzufolge altersabhängig zu. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten im Nukleus facialis der Wildtyp-Tiere ergab keine signifikanten Unterschiede (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p > 0{,}1$).

Ein Vergleich der beiden Versuchsgruppen ergab signifikante Unterschiede (U-Test, jeweils $p < 0{,}001$). Ab dem Alter von 80 Tagen waren die T_2-Werte der transgenen Tiere signifikant höher als die Werte der Wildtyp-Tiere. Zu diesem Zeitpunkt ist der Nukleus facialis auch in den RARE-Bildern als Hyperintensität bei den transgenen G93A-SOD1 Mäusen sichtbar.

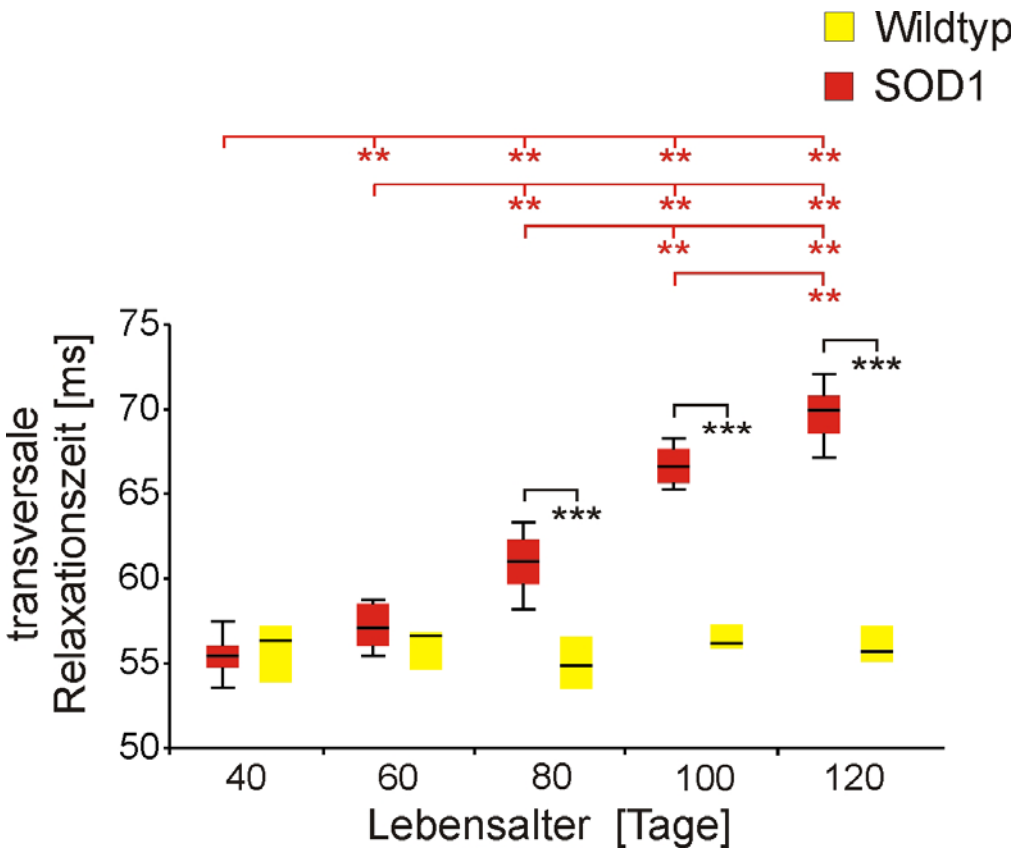

Abbildung 3-2: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus facialis transgener G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p < 0{,}01$) und * ($p < 0{,}001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Rote Klammern kennzeichnen Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten bei den transgenen Mäusen.**

Lebensalter [Tage]	T_2-Relaxationszeit [ms]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	55,45	56,36
60	57,09	56,61
80	61,00	54,87
100	66,61	56,17
120	69,95	55,70

Tabelle 3-1: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis von G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Abbildung 3-3 stellt die T_2-Relaxationszeiten im Nukleus hypoglossus der transgenen und Wildtyp-Mäuse dar. Die dazugehörigen Werte der Mediane für die T_2-Relaxationszeiten für beide Versuchsgruppen sind aus Tabelle 3-2 ersichtlich.

Auch hier steigen die T_2-Werte der transgenen Mäuse vom ersten bis zum letzten Messzeitpunkt signifikant an (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0,05$). Innerhalb der Versuchsgruppe der Wildtyp-Mäuse wurde mit dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen kein signifikanter Anstieg der T_2-Relaxationszeit im Nukleus hypoglossus von Tag 40 bis Tag 120 festgestellt (mindestens $p > 0,1$).
Der Vergleich von G93A-SOD1 und Wildtyp-Tieren ergab ab dem Alter von 80 Tagen signifikante Unterschiede (U-Test, jeweils $p < 0,001$), wobei ab diesem Alter der Nukleus hypoglossus auch in den RARE-Datensätzen sichtbar wurde. Die Werte der Mediane der T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus der transgenen Tiere waren ab Tag 80 nach Geburt höher als bei den Wildtyp-Mäusen.

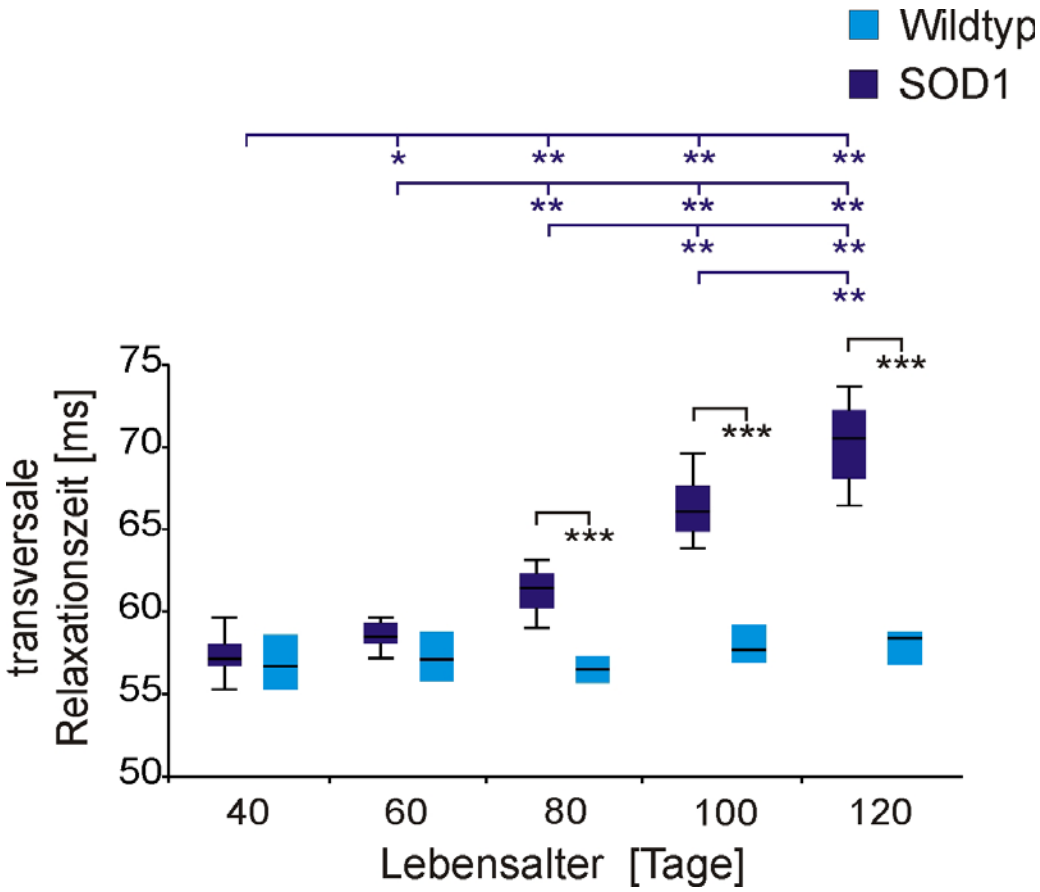

Abbildung 3-3: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus transgener G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Blaue Klammern kennzeichnen Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten bei den transgenen Mäusen.**

Lebensalter [Tage]	T_2-Relaxationszeit [ms]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	57,15	56,70
60	58,50	57,10
80	61,46	56,50
100	66,08	57,70
120	70,55	58,40

Tabelle 3-2: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus hypoglossus von G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus für die transgenen und Wildtyp-Mäuse sind in Abbildung 3-4 dargestellt. In Tabelle 3-3 finden sich die Werte der Mediane beider Versuchsgruppen für die T_2-Relaxationszeiten dieses Hirnstammkernes.

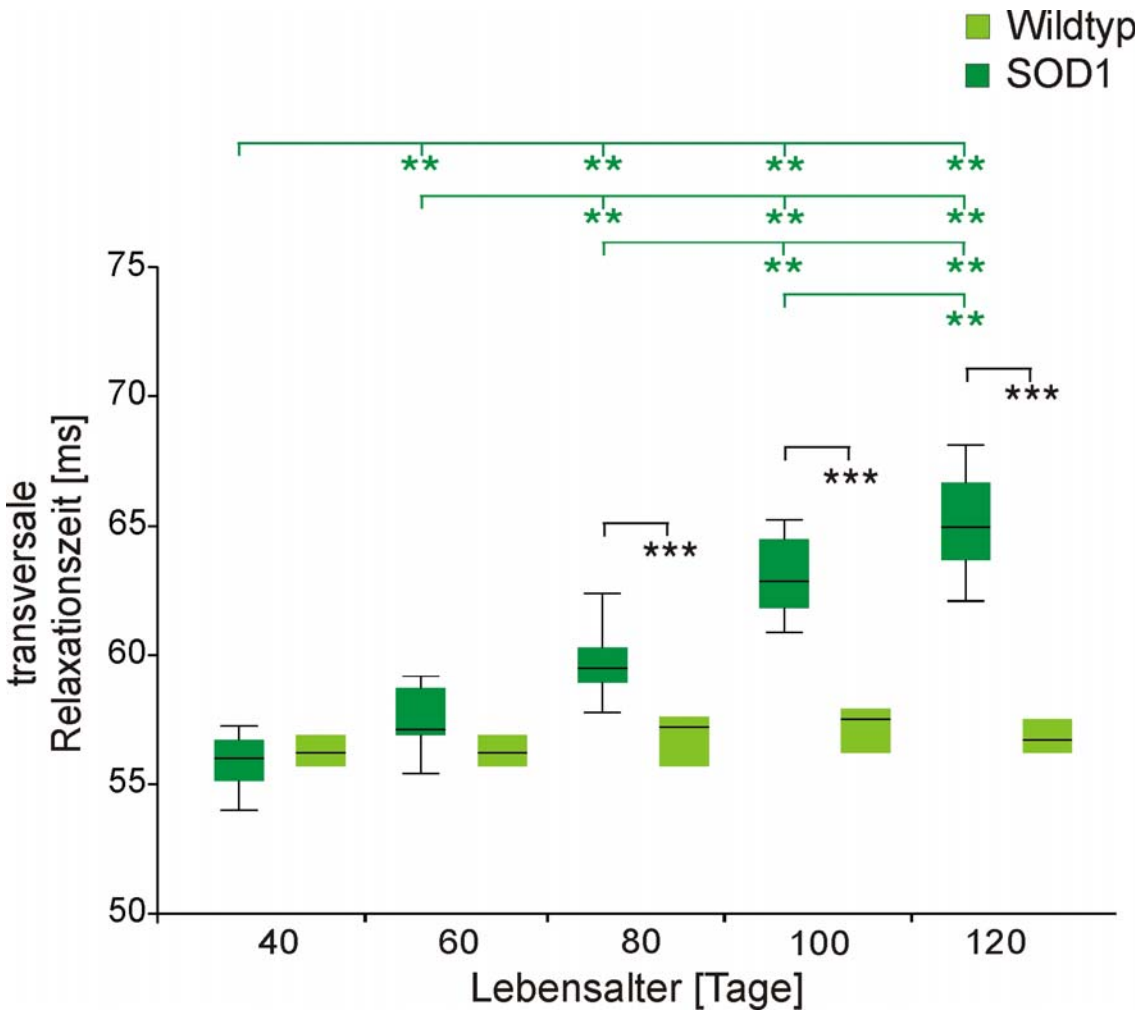

Abbildung 3-4: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus transgene G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Grüne Klammern kennzeichnen Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse.**

Wie aus Abbildung 3-4 hervorgeht, steigt hier die T_2-Relaxationszeit innerhalb der Versuchsgruppe der transgenen Tiere signifikant von Tag 40 bis Tag 120 an (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0,01$). Im gleichen Zeitraum

ändern sich die Werte der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus trigeminus der Wildtyp-Tiere nicht (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p > 0,1$).
Ein statistischer Vergleich der beiden Versuchsgruppen mit Hilfe des U-Tests ergab eine signifikanten Differenz in der T_2-Relaxationszeit von Tag 80 an (jeweils $p < 0,001$). Die mittleren Werte der T_2-Relaxationszeiten waren in der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse deutlich höher, als in der Versuchsgruppe der Wildtyp-Tiere. In den RARE-Bildern ist dieser Nukleus allerdings erst ab Tag 100 als Hyperintensität deutlich sichtbar. Auch steigt die T_2-Relaxationszeit im Nukleus trigeminus nicht so stark an wie bei den beiden anderen Hirnstammkernen Nukleus facialis und Nukleus hypoglossus.

Lebensalter [Tage]	**T_2-Relaxationszeit [ms]**	
	transgene Mäuse	**Wildtyp-Mäuse**
40	56,02	56,20
60	57,07	56,98
80	59,55	57,19
100	62,85	57,51
120	64,95	56,70

Tabelle 3-3: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus trigeminus von G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Obwohl die ersten sichtbaren klinischen Symptome der Erkrankung, eine Hinterbeinmuskel Atrophie, ab Tag 90 nach der Geburt bei den transgenen G93A-SOD1 Mäusen auftreten (Talbot, 2002), können mit Hilfe der T_2-gewichteten Bildgebung bereits präklinisch vor Tag 90 Veränderungen im Hirnstamm sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

3.2 Flächen der MRT-Hyperintensitäten

Um die Veränderungen in den T_2-gewichteten MRT-Bilder noch weiter zu beschreiben, wurden die Flächen der Hyperintensitäten, welche mit den motorischen Hirnstammkerne Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus korrespondieren, bestimmt. Die Flächen der drei Nuklei im Hirnstamm von Wildtyp-Tieren konnten nicht ermittelt werden, da sich die Kerne in den RARE-Bildern nicht vom umgebenden Gewebe abhoben. Die Werte waren zum Teil nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurden sie nicht gemittelt, sondern alle Daten mit Median und Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) sowie den Spannweiten dargestellt, um einen Vergleich möglich zu machen.

Abbildung 3-5 stellt die mittlere Fläche des Nukleus facialis an den Messzeitpunkten Tag 80, 100 und 120 in der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse dar. Der Hirnstammkern war bei den transgenen Tieren ab dem Alter von 80 Tagen in den RARE-Datensätzen sichtbar. Zu diesem Zeitpunkt entsprach der Median 0,94 mm^2. An Tag 100 konnte ein signifikanter Anstieg auf 1,03 mm^2 festgestellt werden (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0,01$). Die Fläche des Nukleus facialis stieg an Tag 120 noch weiter auf 1,12 mm^2 an, wodurch ein signifikanter Unterschied zur Fläche an Tag 80 (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0,001$) aber nicht zur Fläche des Kerns an Tag 100 erreicht wurde (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p > 0,1$).

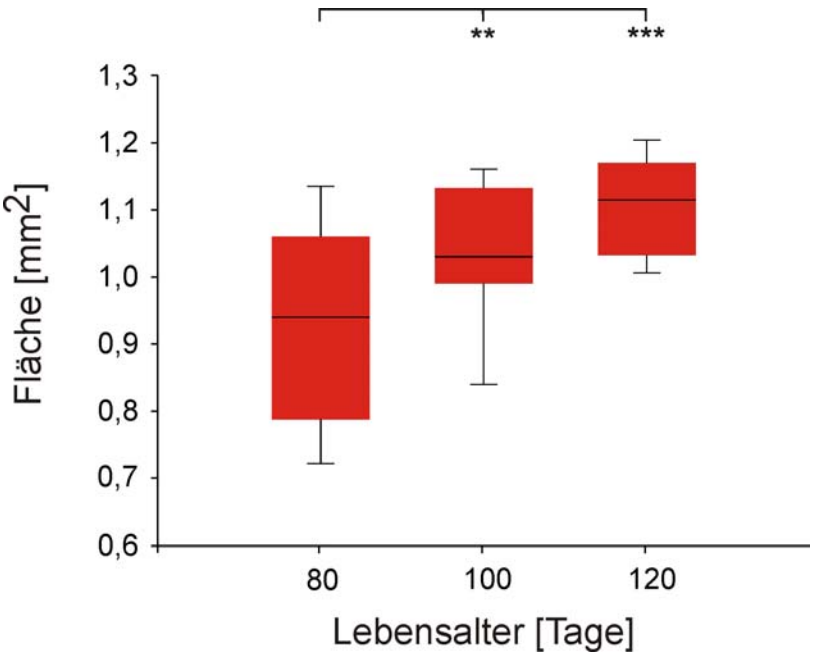

Abbildung 3-5: Fläche des Nukleus facialis der transgenen G93A-SOD1 Mäuse an Tag 80, 100 und 120. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede zwischen den Flächen sind mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter der Klammer gekennzeichnet.**

In Abbildung 3-6 ist die mittlere Fläche des Nukleus hypoglossus der transgenen Mäuse zwischen Tag 80 und Tag 120 dargestellt. Wie aus der Abbildung ersichtlich wird, ergab sich eine signifikante Zunahme der Fläche des Nukleus von 1,03 mm^2 auf 1,27 mm^2 (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p < 0,01$) zwischen Tag 80 und Tag 100 nach der Geburt. Danach konnte keine signifikanter Anstieg in der Fläche des Hirnstammkernes festgestellt werden (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, $p > 0,1$).

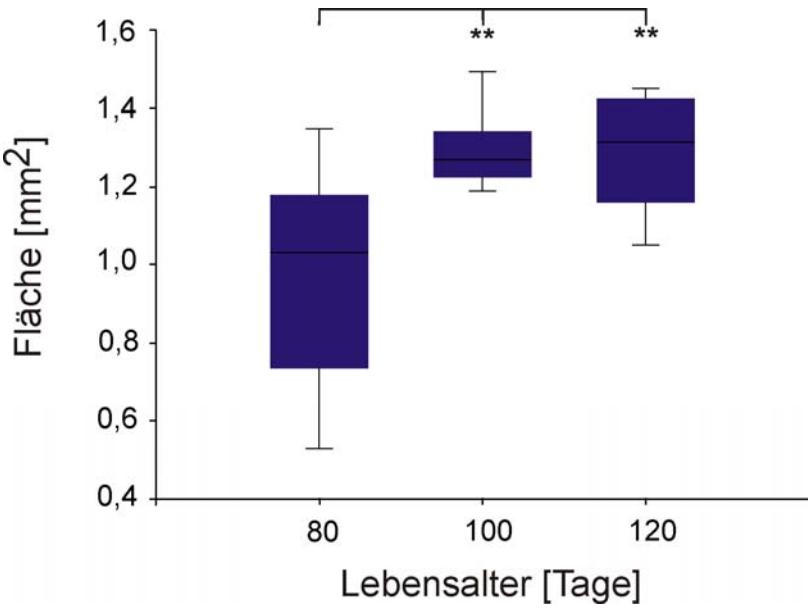

Abbildung 3-6: Fläche des Nukleus hypoglossus der transgenen G93A-SOD1 Mäuse an Tag 80, 100 und 120. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede zwischen den Flächen sind mit ** ($p < 0,01$) unter der Klammer gekennzeichnet.

Die Fläche des Nukleus trigeminus konnte erst ab dem Tag 100 ermittelt werden. Zuvor war der Kern nicht vom umliegenden Gewebe unterscheidbar. Ein statistischer Vergleich mit dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen zwischen der Fläche des Nukleus trigeminus der G93A-SOD1 Mäuse an den letzten beiden Messzeitpunkten Tag 100 und Tag 120 ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p > 0,1$). An Tag 100 betrug die Fläche 0,95 mm^2, an Tag 120 wurde eine Fläche von 0,96 mm^2 bestimmt.

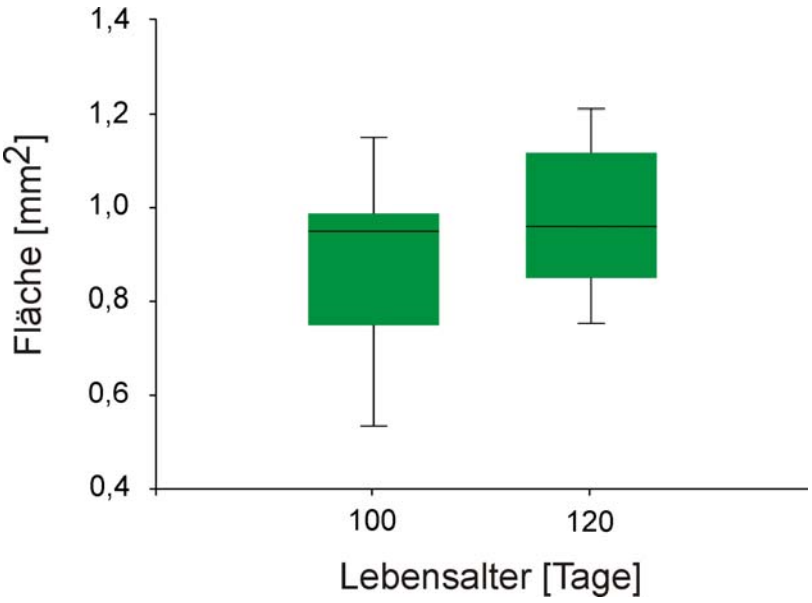

Abbildung 3-7: Fläche des Nukleus trigeminus der transgenen G93A-SOD1 Mäuse an Tag 100 und 120. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Flächen gefunden.

Damit nimmt in zwei der drei motorischen Hirnstammkerne ab dem Zeitpunkt, an dem sie auch in den RARE-Bildern sichtbar sind, die Fläche der Hyperintensität signifikant zu.

3.3 Morphologische Korrelate der MRT-Signalveränderung

3.3.1 Entwicklung der Vakuolisierung in den motorischen Hirnstammkernen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen des Hirnstamms dargestellt. Dabei soll auf die morphologische Korrelate für die MRT-Signalveränderungen im Hirnstamm eingegangen werden. Es wurden Hirnstammschnitte von transgenen G93A-SOD1 (n = 30) und Wildtyp-Tieren (n = 30) im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen untersucht.

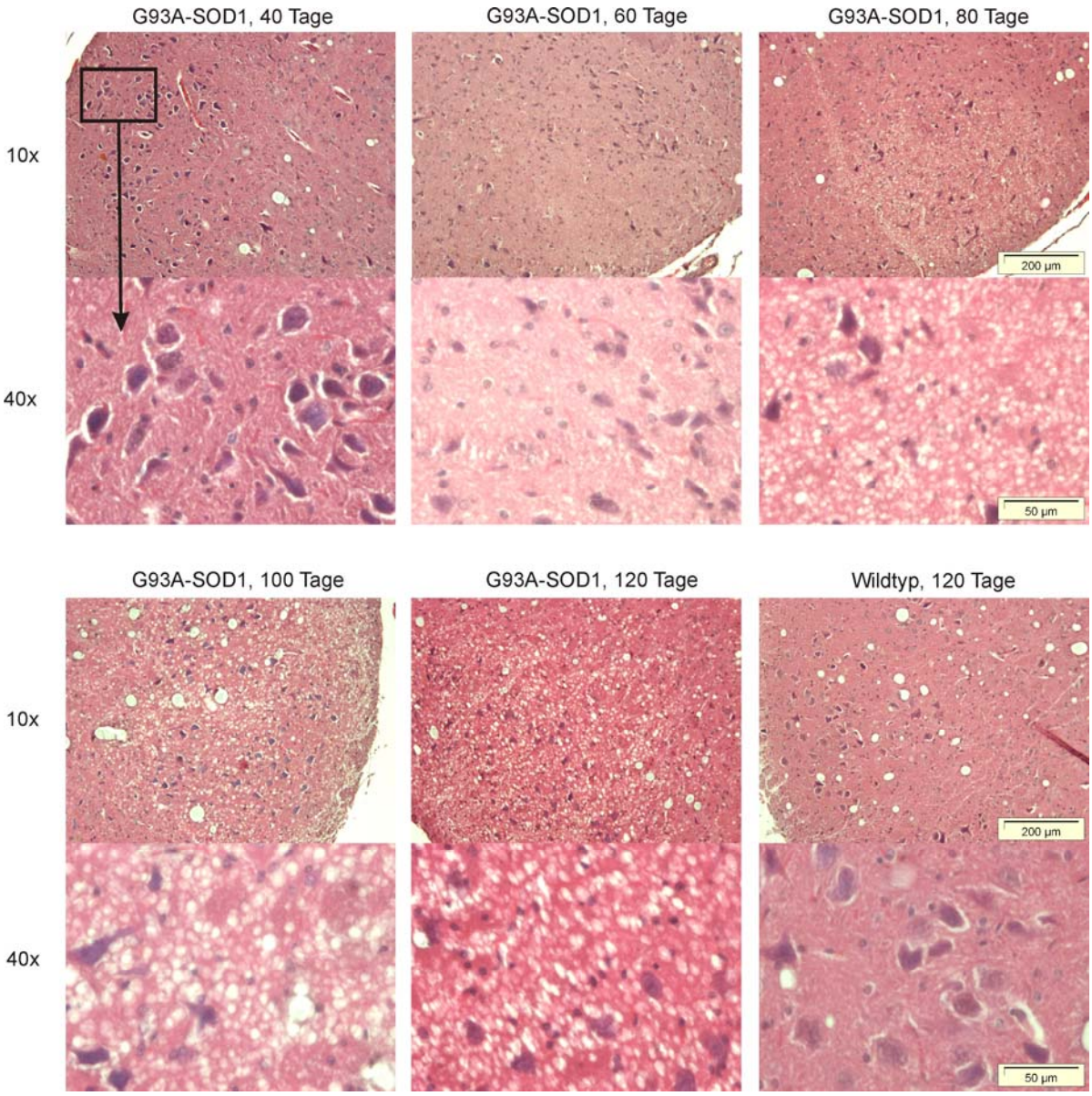

Abbildung 3-8: Lichtmikroskopische Aufnahmen des H & E-gefärbten Nukleus facialis von transgenen G93A-SOD1 Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen und einer 120 Tage alten Wildtyp-Maus, jeweils mit 10facher und 40facher Auflösung.

Die Untersuchung der H & E-gefärbten Hirnstammschnitte der transgenen Mäuse zeigte Vakuolen in den motorischen Hirnstammkernen im Verlaufe der Erkrankung. In Abbildung 3-8 ist die Entwicklung der Vakuolisierung im Nukleus facialis bei den transgenen Mäusen exemplarisch dargestellt. Bei den G93A-SOD1 Mäusen konnten im Alter von 40 und 60 Tagen keine sichtbaren Veränderungen festgestellt werden. Im Alter von 80 Tagen waren, vor allem bei höheren Vergrößerungen, lichtmikroskopisch Vakuolen zu erkennen. Diese Vakuolisierung nahm im anschließenden Verlauf der Erkrankung deutlich zu. Nach 120 Tagen waren diese

Vakuolen auch bei niedrigen Vergrößerungen deutlich erkennbar. Bei den Hirnschnitten der Wildtyp-Mäuse sind ebenfalls Vakuolen-ähnliche Strukturen sichtbar. Dabei handelt es sich um Artefakte, welche durch die intrakardiale Perfusion verursacht wurden. Diese Artefakte sehen den Vakuolen sehr ähnlich, sind aber durch einen deutlichen Größenunterschied unterscheidbar. Auch in den Hirnschnitten der transgenen Tiere sind solche Artefakte zu erkennen. Sie wurden bei der Auswertung nicht als Vakuolen gewertet. Damit waren bei den Wildtyp-Mäusen in keinem Alter Veränderungen, insbesondere Vakuolen, erkennbar.

Zur Quantifikation der Vakuolisierung, wurde in den einzelnen Kernen die Anzahl der sichtbaren Vakuolen in einer Fläche von 17,5 mm^2 gezählt. Die Mittelwerte der Anzahl an Vakuolen wurden an den verschiedenen Untersuchungstagen 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen mit einer Varianzanalyse verglichen. Aus Tabelle 3-4 sind die Mittelwerte der Vakuolenanzahl für den Nukleus facialis der transgenen Mäuse (n = 30) ersichtlich. In Abbildung 3-9 sind die Entwicklung der Anzahl an Vakuolen im Nukleus facialis der transgenen Tiere dargestellt. Ein signifikanter Anstieg in der Vakuolenzahl ergab sich ab Tag 80 (ANOVA, mindestens $p < 0,05$). Im Alter von 100 und 120 Tagen konnte eine nochmalige signifikante Vakuolenzahlerhöhung festgestellt werden (ANOVA, jeweils $p < 0,001$), so das im Alter von 120 Tagen nach Geburt 321,33 ± 47,56 Vakuolen in einem Bereich von 17,5 mm^2 gefunden wurden.

Lebensalter [Tage]	Anzahl Vakuolen
40	3,83
60	4,17
80	53,67
100	204,83
120	321,33

Tabelle 3-4: Mittelwerte der Anzahl an Vakuolen im Nukleus facialis der G93A-SOD1 Mäuse an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

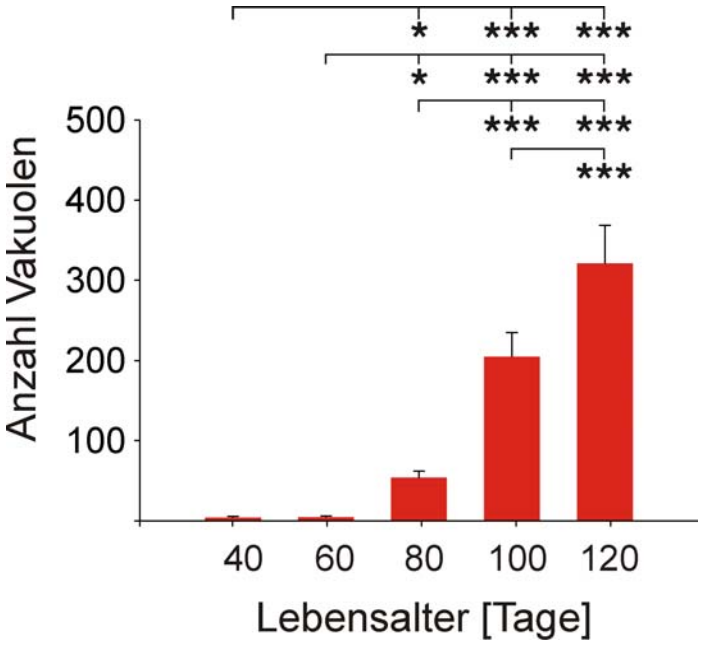

Abbildung 3-9: Mittlere Anzahl der Vakuolen im Nukleus facialis der transgenen G93A-SOD1 Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Im Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus konnte eine ähnliche Entwicklung der Vakuolisierung festgestellt werden. Die Entwicklung der Vakuolisierung im Nukleus hypoglossus ist exemplarisch in Abbildung 3-10 dargestellt. Wie auch im Nukleus facialis konnten in diesem Hirnstammkern die ersten Vakuolen an Tag 80 in der 40fachen Vergrößerung bei den transgenen G93A-SOD1 Mäusen beobachtet werden. In den Hirnstammschnitten der 100 und 120 Tage alten transgenen Mäuse waren die Vakuolen auch bei einer niedrigen Vergrößerung (10fach) deutlich im Nukleus hypoglossus zu erkennen. Bei den Wildtyp-Mäusen konnte zu keinem Zeitpunkt eine morphologische Veränderung beobachtet werden. Bei den Vakuolen-ähnlichen Strukturen handelt es sich um Artefakte verursacht durch die intrakardiale Perfusion. Solche Artefakte waren auch in den Gehirnschnitten der transgenen Tiere zu finden. Die Artefakte sind allerdings deutlich größer als die Vakuolen und wurden bei der Bestimmung der Vakuolenzahl nicht berücksichtigt.

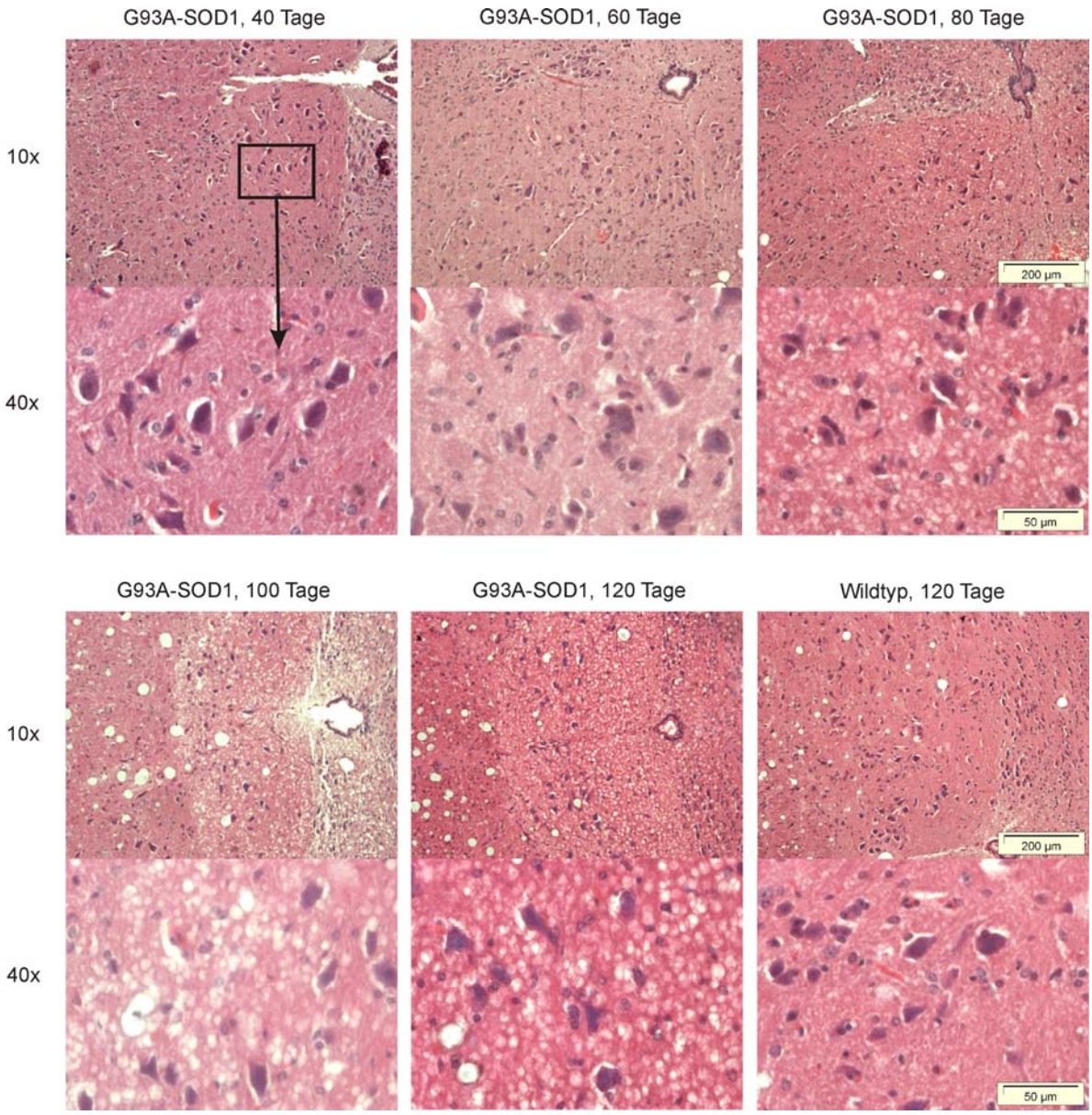

Abbildung 3-10: Lichtmikroskopische Aufnahmen des H & E-gefärbten Nukleus hypoglossus von transgenen G93A-SOD1 Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tage und einer 120 Tage alten Wildtyp-Maus, jeweils mit 10facher und 40facher Auflösung.

In Abbildung 3-11 ist die Zunahme der Vakuolenzahl im Nukleus hypoglossus dargestellt. Die mittleren Vakuolenzahlen im Nukleus der transgenen Mäuse sind aus Tabelle 3-5 ersichtlich. Im Alter von 40 und 60 Tagen wurden nur vereinzelt Vakuolen gefunden. Ab dem Alter von 80 Tagen allerdings stieg die Anzahl der Vakuolen signifikant an (ANOVA, jeweils $p < 0{,}001$), so dass am Tag 120 im Mittel 313,83 ± 31,02 Vakuolen gefunden wurden.

Lebensalter [Tage]	Anzahl Vakuolen
40	4,17
60	5,33
80	57,67
100	199,67
120	313,83

Tabelle 3-5: Mittelwerte der Anzahl an Vakuolen im Nukleus hypoglossus der G93A-SOD1 Mäuse an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

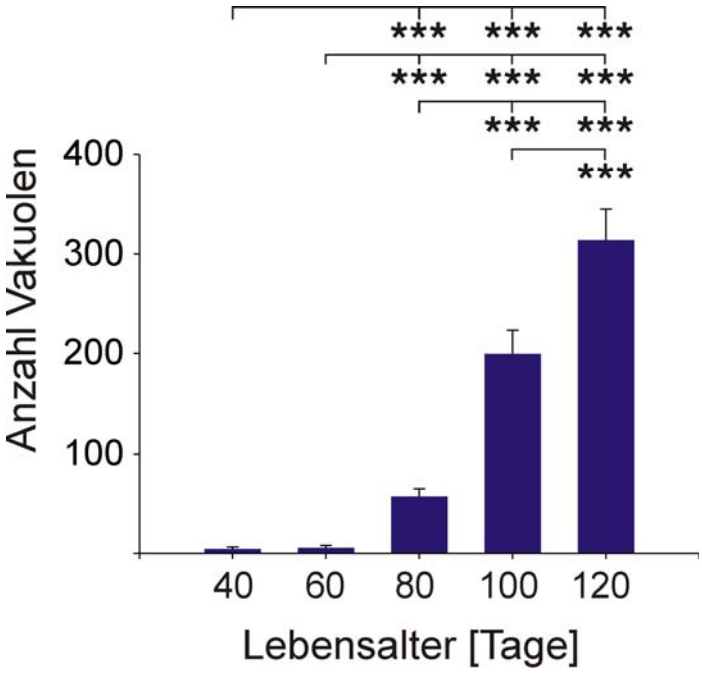

Abbildung 3-11: Mittlere Anzahl der Vakuolen im Nukleus hypoglossus der transgenen G93A-SOD1 Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Im Nukleus trigeminus der transgenen Mäuse wurden ebenfalls Vakuolen gefunden, wobei hier eine ähnliche Entwicklung wie bei den anderen beiden Hirnstammkernen festgestellt werden konnte. Dargestellt ist diese Entwicklung im Nukleus trigeminus exemplarisch in Abbildungen 3-12.

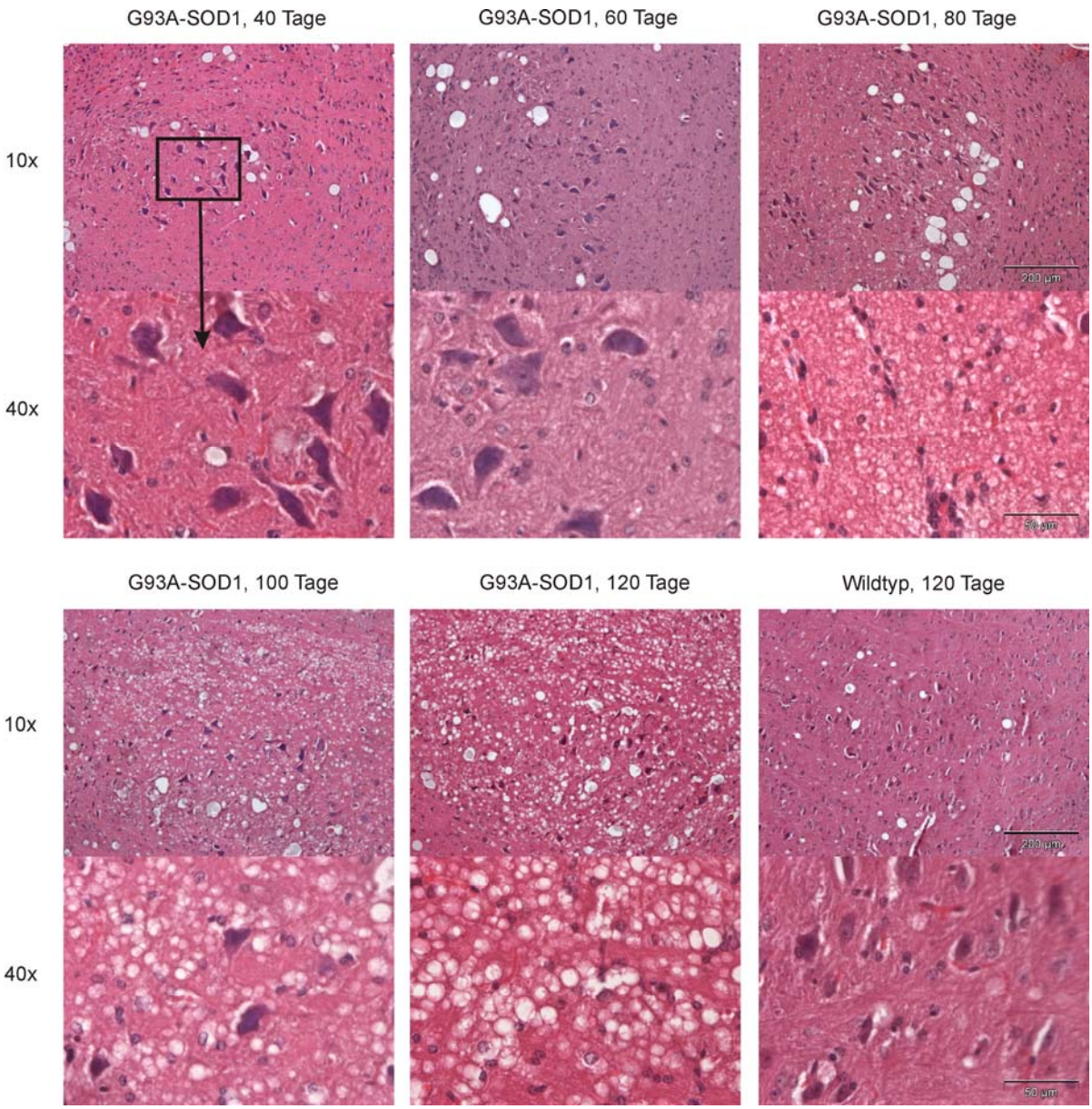

Abbildung 3-12: Lichtmikroskopische Aufnahmen des H & E-gefärbten Nukleus trigeminus von transgenen G93A-SOD1 Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tage und einer 120 Tage alten Wildtyp-Maus, jeweils bei 10facher und 40facher Auflösung.

Die ersten Vakuolen im Nukleus trigeminus waren bei transgenen Tieren bei hoher Vergrößerung am Tag 80 sichtbar. Im höheren Alter nahm diese Vakuolisierung deutlich zu, so dass die Vakuolen am Tag 120 deutlich auch bei 10facher Vergrößerung im Lichtmikroskop zu erkennen waren. Bei keiner der Wildtyp-Mäuse wurden Vakuolen in diesem motorischen Hirnstammkern gefunden. Bei den Vakuolen-ähnlichen Strukturen, welche im Nukleus trigeminus der Wildtyp-Mäuse auftreten, handelt es sich um Artefakte verursacht durch interkardiale Perfusion.

Artefakte traten auch in den Gehirnschnitten der transgenen Tiere auf. Die Artefakte sind deutlich größer als die Vakuolen.

Auch im diesem Kern wurde die Anzahl der Vakuolen bestimmt. In Tabelle 3-6 sind die mittleren Anzahlen der Vakuolen des Nukleus trigeminus der transgenen G93A-SOD1 Mäuse aufgelistet. Abbildung 3-13 zeigt die dazugehörige graphische Darstellung. Mit Hilfe der Varianzanalyse wurden signifikante Unterschiede in der Vakuolenzahl an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten festgestellt. Wie auch in den Daten bei den beiden anderen Hirnstammkernen konnten auch im Nukleus trigeminus in der präklinischen Phase (im Alter von 80 Tagen) signifikant höhere Vakuolenanzahlen gefunden werden (ANOVA, $p < 0,001$). Danach stiegen die Werte der Vakuolenanzahlen signifikant an (ANOVA, jeweils $p < 0,001$).

Lebensalter [Tage]	Anzahl Vakuolen
40	5,17
60	7,17
80	56,83
100	175,67
120	281,5

Tabelle 3-6: Mittelwerte der Anzahl an Vakuolen im Nukleus trigeminus der transgenen Mäuse an den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten.

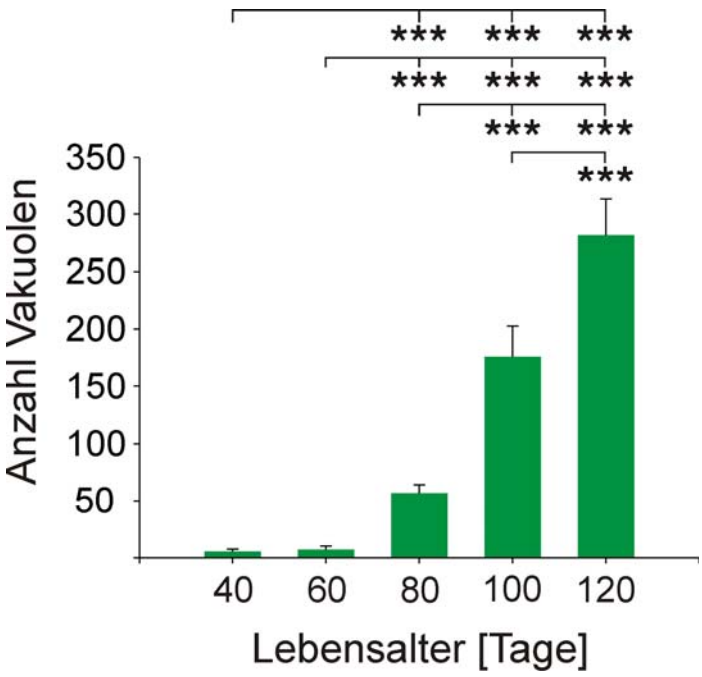

Abbildung 3-13: Mittlere Anzahl der Vakuolen im Nukleus trigeminus der transgenen G93A-SOD1 Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0{,}001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

In allen drei untersuchten motorischen Hirnstammkernen konnten bei der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse eine Vakuolisierung festgestellt werden, wobei die ersten Vakuolen bereits am Tag 80 nach der Geburt lichtmikroskopisch erfassbar waren. Zudem konnte eine altersabhängige Zunahme der Vakuolisierung festgestellt werden. Damit treten mikroskopische Veränderungen im Hirnstamm bereits in der präklinischen Phase der Erkrankung bei den G93A-SOD1 Mäusen auf. Die signifikante Erhöhung der Vakuolenanzahl korrespondiert zeitlich mit der signifikant ansteigenden T_2-Relaxationszeit im Verlauf der Erkrankung bei allen drei motorischen Hirnstammkernen. Durch den zeitgleichen Anstieg der T_2-Relaxationszeit und dem Erscheinen der Vakuolen kann angenommen werden, dass die Änderung des MRT-Signals durch die Vakuolisierung zustande kommt.

3.3.2 Motoneuronanzahl in den motorischen Hirnstammkernen

Sowohl bei Menschen als auch im Tiermodell ist der Verlauf von ALS durch den Untergang von Motoneuronen vor allem im Vorderhorn des Rückenmarks

charakterisiert (Brown, 1995; Cleveland & Rothstein, 2001; Mulder et al., 1986; Rowland & Shneider, 2001; Shaw, 1999; Talbot, 2002). Um den Hirnstamm auf Motoneurondegeneration zu untersuchen, wurde die Anzahl der Motoneurone in den motorischen Hirnstammkernen Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus in Hämatoxilin und Eosin-gefärbten Gehirnschnitten bei transgenen G93A-SOD1 Mäusen (n = 25) bestimmt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Tieren (n = 25). Es wurden jeweils fünf Tiere im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen quantifiziert, um einen möglichen Verlauf zu erfassen.

In Abbildung 3-14 ist die mittlere Anzahl an Motoneuronen im Nukleus facialis von transgenen und Wildtyp-Mäusen dargestellt. Die dazugehörigen Werte der Motoneuronanzahlen sind aus Tabelle 3-7 ersichtlich. Die Motoneuronanzahl variieren bei den transgenen Mäusen im Mittel zwischen minimal 26 ± 4,7 und maximal 28,4 ± 4,6 Motoneuronen an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Es wurden aber keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe gefunden (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Bei den Wildtyp-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Motoneuronanzahl an den fünf Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Die Anzahl an Motoneuronen lag im Mittel zwischen 36,8 ± 9,8 und 42,8 ± 8,3. Signifikante Unterschiede in der mittleren Anzahl der Motoneurone ergaben sich mit Hilfe des Student`s t-Test zwischen den Versuchsgruppen an jedem der Untersuchungszeitpunkte (mindestens $p < 0,05$).

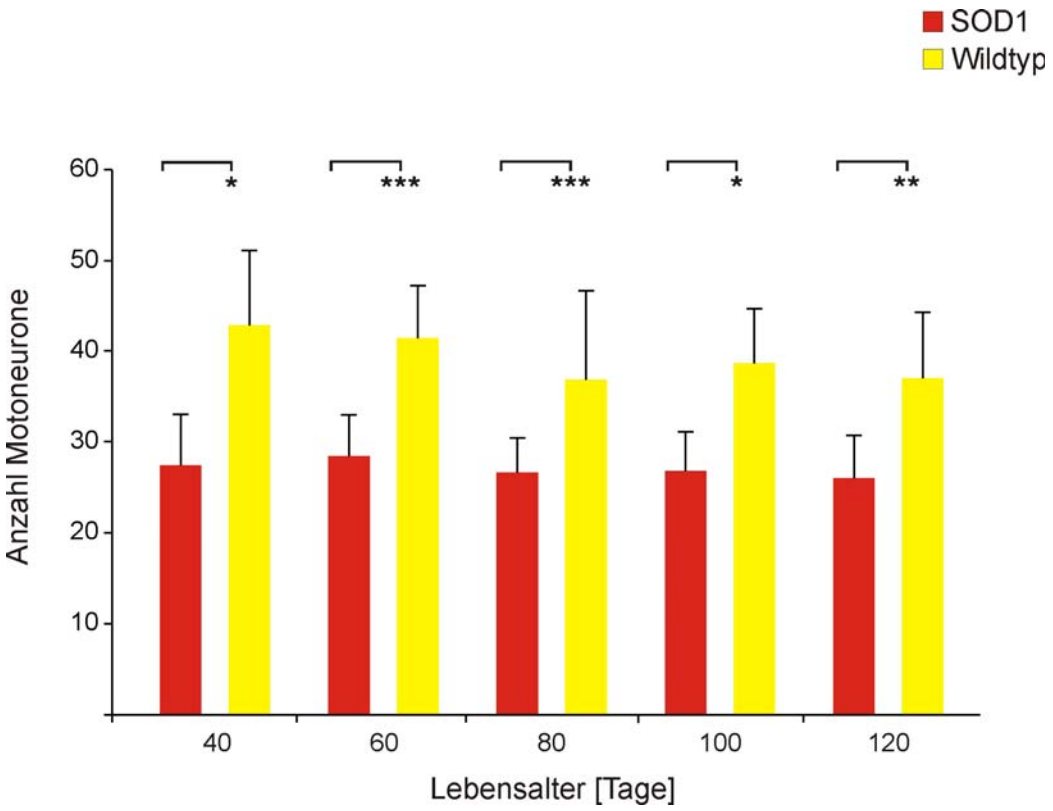

Abbildung 3-14: Mittlere Anzahl der Motoneurone im Nukleus facialis von transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl an Motoneuronen sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Lebensalter [Tage]	Anzahl der Motoneurone	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	27,4	42,8
60	28,4	41,4
80	26,6	36,8
100	26,8	38,6
120	26,0	37,0

Tabelle 3-7: Mittelwerte der Anzahl an Motoneuronen im Nukleus facialis der transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse am Tag 40, 60, 80, 100 und 120.

Abbildung 3-15 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Motoneurone im Nukleus hypoglossus. In der Tabelle 3-8 sind die dazugehörigen Mittelwerte bei transgenen

und Wildtyp-Mäusen ersichtlich. Im Nukleus hypoglossus der G93A-SOD1 Mäuse unterschieden sich die Motoneuronenzahlen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen nicht signifikant voneinander. So waren im Mittel maximal 12,4 ± 2,6 Motoneurone an Tag 100 und minimal 10,8 ± 3,1 Motoneurone an Tag 120 vorhanden (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Auch innerhalb der Versuchsgruppe der Wildtyp-Mäuse wurden im Nukleus hypoglossus im Mittel ähnliche Motoneuronanzahlen zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten gefunden, im Mittel minimal 18,2 ± 3,3 an Tag 100 und maximal 23,4 ± 3,8 Motoneurone an Tag 80 (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Allerdings, wie auch im Nukleus facialis, unterschieden sich die Motoneuronzahlen zwischen den beiden Versuchsgruppen signifikant voneinander (Student`s t-Test, mindestens $p < 0,05$). Die Zahl der Motoneurone war bei den transgenen Tieren an allen Untersuchungszeitpunkten signifikant niedriger.

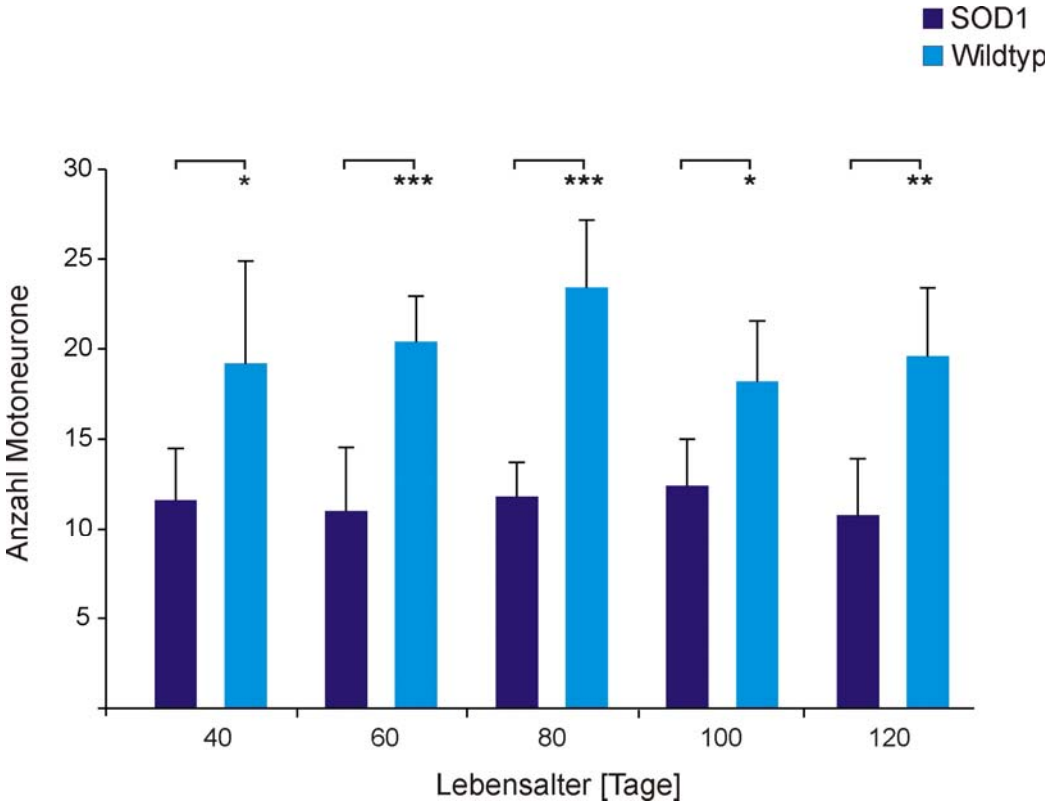

Abbildung 3-15: Mittlere Anzahl der Motoneurone im Nukleus hypoglossus von transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl an Motoneuronen sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Lebensalter [Tage]	Anzahl der Motoneurone	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	11,6	19,2
60	11,0	20,4
80	11,8	23,4
100	12,4	18,2
120	10,8	19,6

Tabelle 3-8: Mittelwerte der Anzahl an Motoneuronen im Nukleus hypoglossus der transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse am Tag 40, 60, 80, 100 und 120.

In Abbildung 3-16 ist die mittlere Anzahl der Motoneurone im Nukleus trigeminus dargestellt. In der dazugehörigen Tabelle 3-9 sind die Werte bei transgenen und Wildtyp-Mäusen ersichtlich. Im Nukleus trigeminus der G93A-SOD1 Mäuse ergaben sich im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen keine Unterschiede in der Anzahl. So ergaben sich im Mittel maximal 12,4 ± 1,1 Motoneurone an Tag 40 und minimal 10 ± 2,3 Motoneurone an Tag 80 (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Auch innerhalb der Versuchsgruppe der Wildtyp-Mäuse unterschieden sich die Motoneuronanzahlen an den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten nicht signifikant voneinander (ANOVA, mindestens $p > 0,1$). Der Vergleich beider Versuchsgruppen mit Hilfe des Student`s t-Tests zeigte einen signifikanten Unterschied: die Zahl der Motoneurone war bei den transgenen Tieren zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Mäusen (mindestens $p < 0,01$).

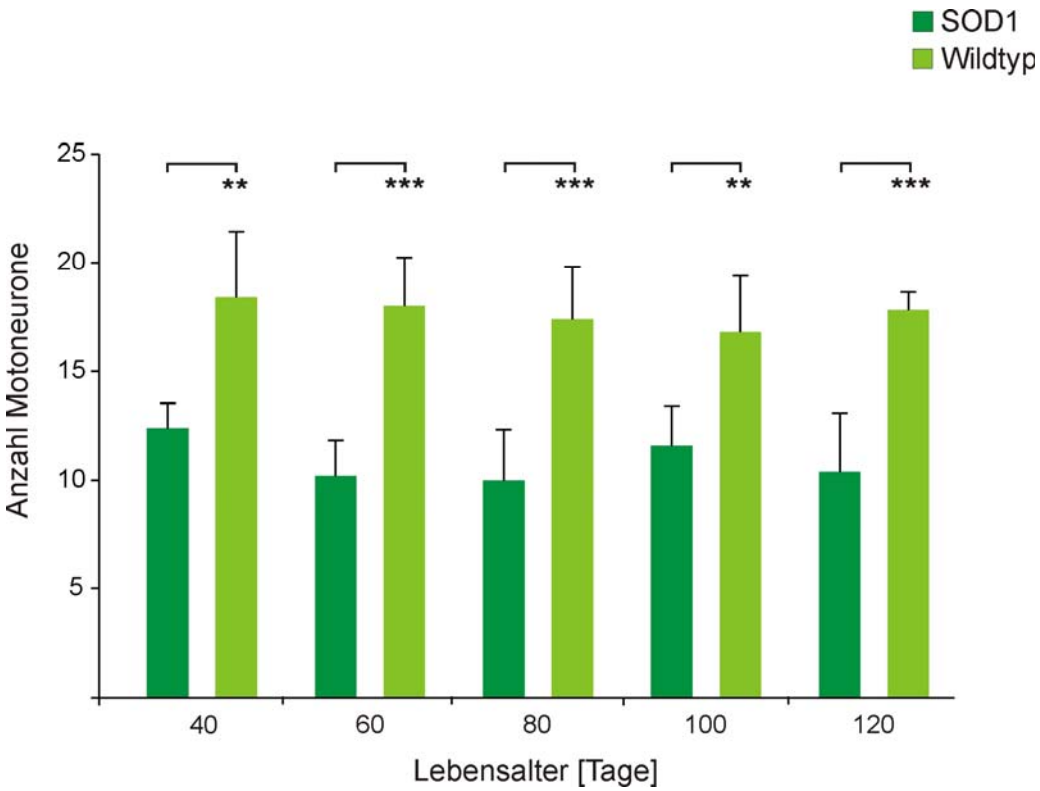

Abbildung 3-16: Mittlere Anzahl der Motoneurone im Nukleus trigeminus von transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen der Anzahl an Motoneuronen sind mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Lebensalter [Tage]	Anzahl der Motoneurone	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	12,4	18,4
60	10,2	18,0
80	10,0	17,4
100	11,6	16,8
120	10,4	17,8

Tabelle 3-9: Mittelwerte der Anzahl an Motoneuronen im Nukleus trigeminus der transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse am Tag 40, 60, 80, 100 und 120.

Im Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus der transgenen Mäuse wurden bereits ab einem Alter von 40 Tagen signifikant weniger Motoneurone gefunden, als bei den Wildtyp-Tieren. Es wurde aber kein

zusätzlicher Motoneuronverlust im zeitlichen Verlauf der Erkrankung bei den transgenen Mäusen festgestellt.

3.4 Veränderungen der Zungenmuskulatur

3.4.1 Hämatoxilin und Eosin-Färbung

Neben einem deutlichen Verlust von Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks (Talbot, 2002), wurde bei der G93A-SOD1 Maus eine Atrophie der Hinterbeinmuskulatur beschrieben (Gurney, 1997). Um Beeinträchtigungen der Zungenmuskulatur, welche durch den Nukleus hypoglossus innerviert wird, durch die Vakuolisierung zu untersuchen, wurden Zungenschnitte von 26 transgenen Mäusen sowie von 39 Wildtyp-Mäusen im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen angefertigt und mit H & E angefärbt.

Bei einem Großteil der transgenen Mäuse wurden unabhängig vom Alter geringe neurogene Veränderungen, in Form von eckig-elongierten, atrophen Muskelfasern festgestellt. In Abbildung 3-17 ist ein typischer Muskelschnitt mit diesen Veränderungen bei einer transgenen Maus im Vergleich zu einer nicht-betroffenen Wildtyp-Maus dargestellt. Auch die Gesamtstruktur aus Längs- und Quermuskulatur der Zunge ist bei den transgenen Mäusen nicht so erhalten, wie bei den Wildtyp-Mäusen. Sie scheint bei den G93A-SOD1 mehr aufgelöst, da zwischen den einzelnen Muskelfasern deutliche Zwischenräume sichtbar sind, während bei den Wildtyp-Tieren die Fasern dicht aneinander liegen.
Allerdings sind die Veränderungen nicht so stark, wie auf Grund der starken Vakuolisierung im Nukleus hypoglossus vermutet wurde. Auch konnten die neurogenen Veränderungen bereits bei jungen Mäusen im Alter von 60 Tagen festgestellt werden. Bei älteren Tieren wurden im Vergleich nicht mehr atrophe Muskelfasern gefunden.

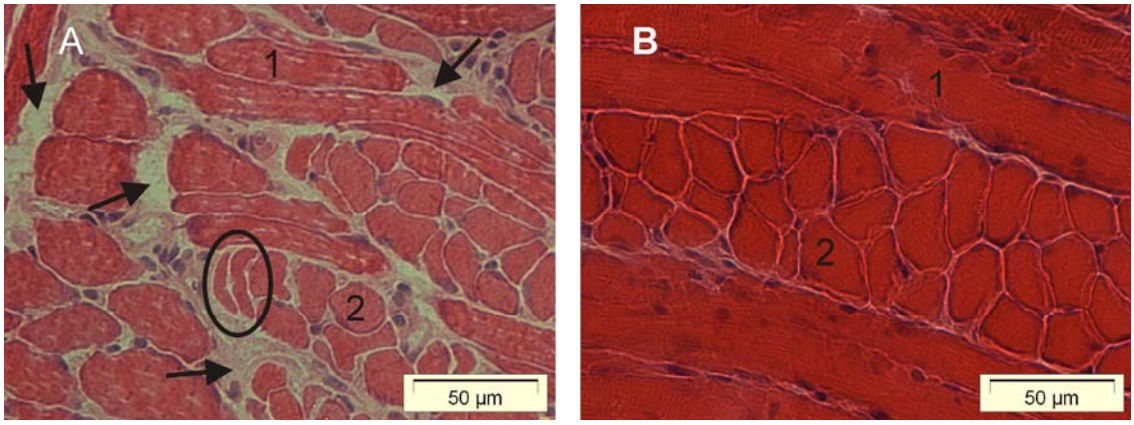

Abbildung 3-17: Repräsentativer H & E-gefärbter Muskelschnitt einer 60 Tage alten transgenen Maus (A) und einer Wildtyp-Maus im selben Alter (B) mit Längsmuskulatur (1) und Quermuskulatur (2). Die neurogenen Veränderungen in Form von eckig-elongierten Muskelfasern in der Zungenquermuskulatur der transgenen Maus sind durch eine schwarze Umrandung kenntlich gemacht. In der Zungenmuskulatur sind zwischen den Muskelfasern deutliche Zwischenräume zu erkennen (Pfeile).

Die Vakuolisierung im Nukleus hypoglossus scheint damit keinen großen Einfluss auf die Morphologie der Zungenmuskulatur zu haben, allerdings ist nicht klar, ob die Vakuolisierung Auswirkungen auf die Übertragung an der motorischen Endplatte und so die Funktion der Muskelzellen beeinträchtigt.

3.4.2 Zungenmuskelfaserdurchmesser

Zur weiteren Charakterisierung der Zungenmuskulatur wurde in den H&E-gefärbten Zungenschnitten der Faserdurchmesser bei den kleinsten, mittleren und größten Muskelzellen im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen bestimmt. Dadurch ergab sich der kleinste, mittlere und größte Muskelfaserdurchmesser.

Wie aus Abbildung 3-18 ersichtlich, ergab sich innerhalb der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse kein Unterschied im kleinsten Faserdurchmesser (ANOVA, $p > 0,05$). Zudem unterschieden sich die Faserdurchmesser der kleinsten Muskelzellen innerhalb der Gruppe der Wildtyp-Mäuse nicht signifikant voneinander (ANOVA, $p > 0,05$). In Tabelle sind die zugehörigen Mittelwerte des kleinsten Faserdurchmessers zu finden.

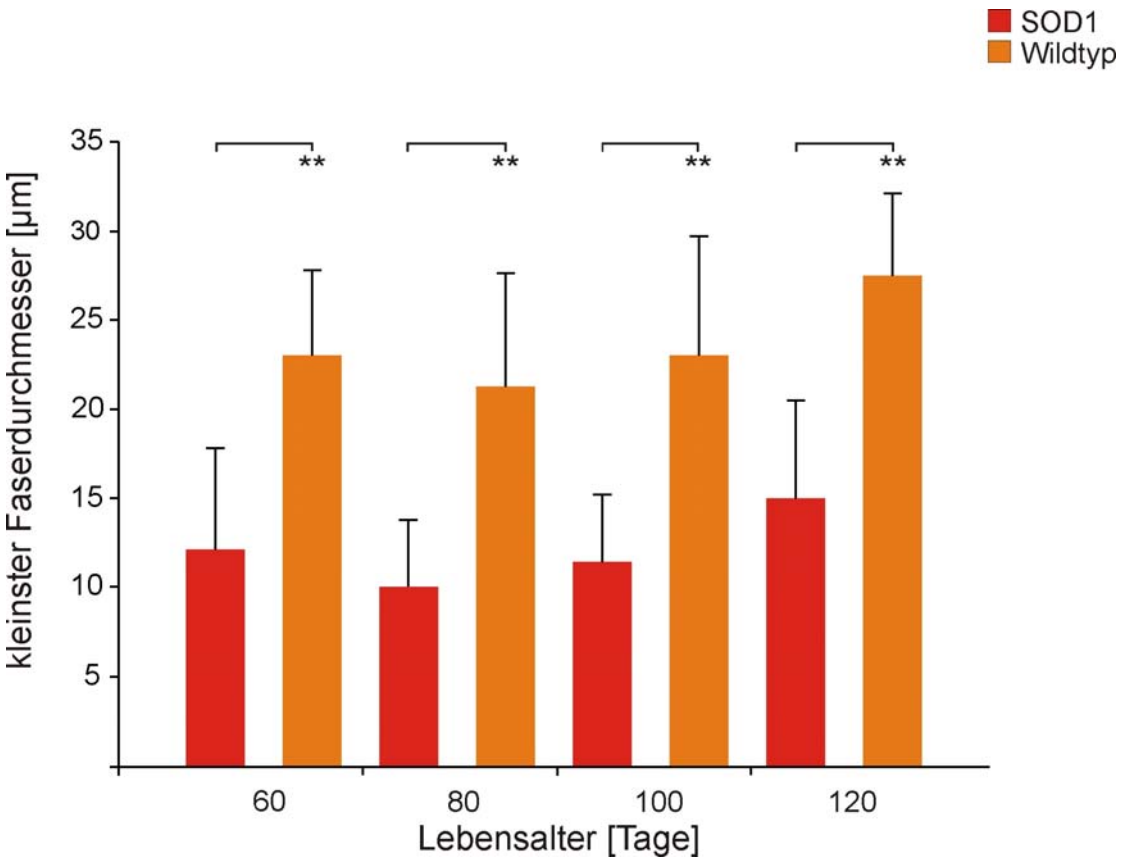

Abbildung 3-18: Kleinster Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur transgener und Wildtyp-Tiere im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Faserdurchmesser sind mit ** ($p < 0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.

Ein Vergleich beider Gruppen zeigt, dass der Durchmesser der kleinsten Muskelzellen in den Zungen der transgenen Tiere zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant geringer waren als bei den Wildtyp-Mäusen (Student`s t-Test, jeweils $p < 0,01$).

Lebensalter [Tage]	kleinster Faserdurchmesser [µm]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
60	12,14	23,00
80	10,00	21,25
100	11,43	23,00
120	15,00	27,50

Tabelle 3-10: Mittelwerte des kleinsten Faserdurchmessers im Nukleus hypoglossus beider Versuchsgruppen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

In den gleichen Zungenschnitten wurde auch der Faserdurchmesser der mittelgroßen Muskelfasern bestimmt. In Abbildung 3-19 sind die Ergebnisse dieser Untersuchung für die transgenen und Wildtyp-Mäuse im Alter zwischen 60 und 120 Tagen dargestellt, während in Tabelle 3-11 die entsprechenden Mittelwerte zu finden sind.

Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied im mittleren Faserdurchmesser sowohl bei den transgenen Mäusen im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen (ANOVA, $p > 0,05$), als auch bei den Wildtyp-Mäusen gibt (ANOVA, $p > 0,05$).

Der Vergleich beider Gruppen mit dem Student´s t-Test zeigte allerdings, dass der mittlere Faserdurchmesser in der Gruppe der transgene Tiere an Tag 60, 100 und 120 signifikant geringer war als bei den Kontroll-Tieren. Auch an Tag 80 war der mittlere Faserdurchmesser bei den transgenen Mäusen kleiner, allerdings konnte keine Signifikanz erreicht werden.

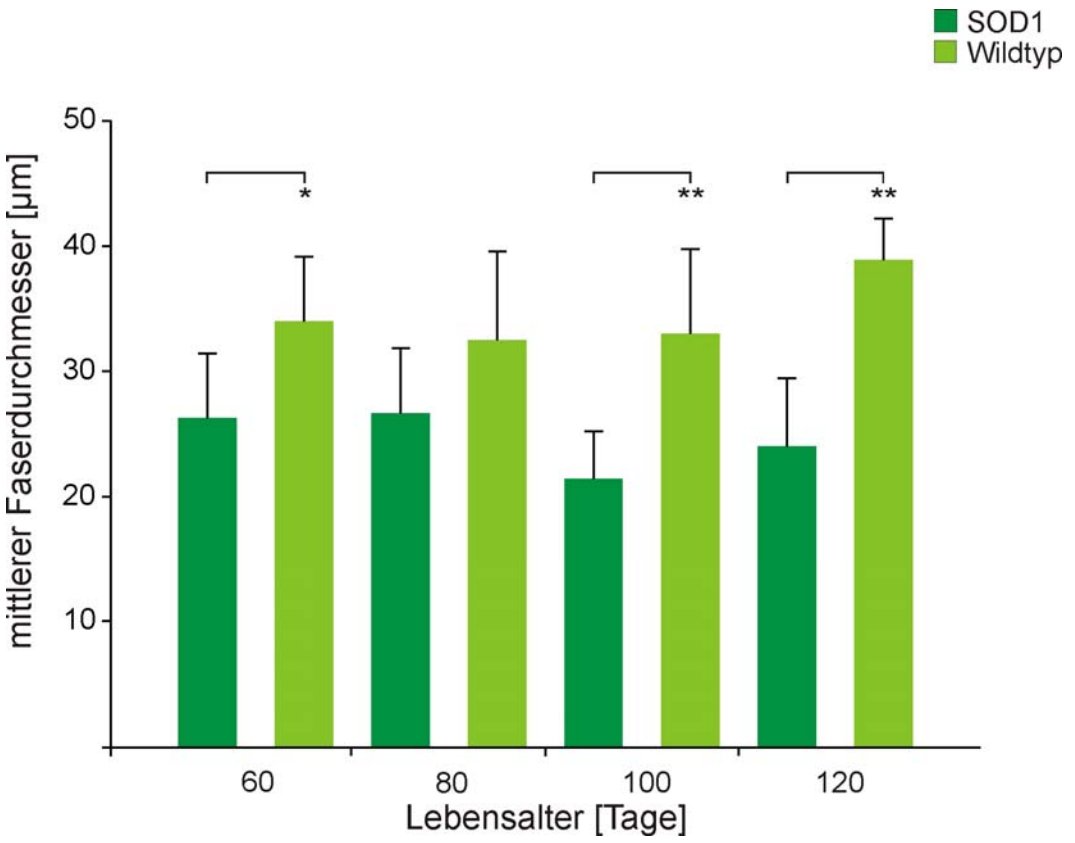

Abbildung 3-19: Mittlere Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur transgener und Wildtyp-Tiere im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Faserdurchmesser sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.

Lebensalter [Tage]	mittlerer Faserdurchmesser [µm]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
60	26,25	34,00
80	26,67	32,50
100	21,43	33,00
120	24,00	38,89

Tabelle 3-11: Mittelwerte des mittleren Faserdurchmessers im Nukleus hypoglossus beider Versuchsgruppen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Auch die Bestimmung des Faserdurchmessers der größten Muskelzellen ergab ein ähnliches Ergebnis, wie der kleinste und mittlere Faserdurchmesser. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der beiden Versuchsgruppen (ANOVA, jeweils $p > 0,05$), wie aus Abbildung 3-20 ersichtlich wird.

Der Vergleich beider Gruppen mit Hilfe des Student`s t-Test zeigte signifikante Unterschiede zu jedem Untersuchungszeitpunkt (mindestens $p < 0,05$). Die Mittelwerte sind in Tabelle 3-12 zu finden.

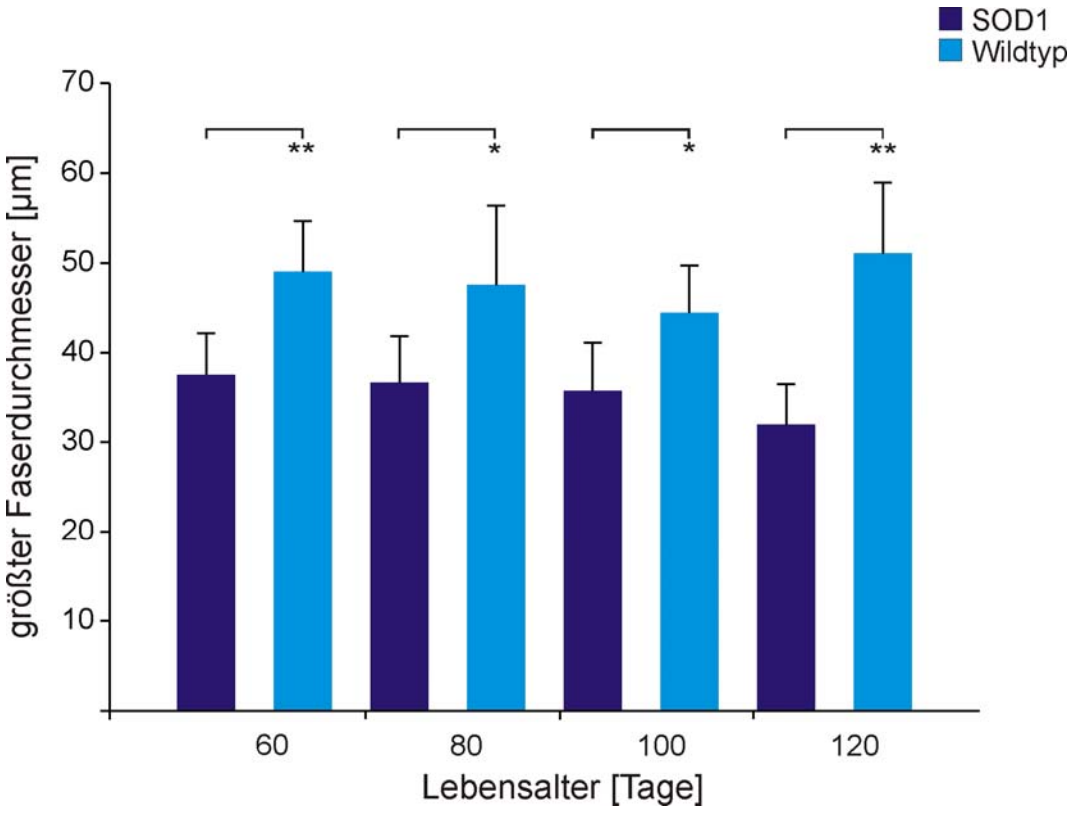

Abbildung 3-20: Größter Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur transgener und Wildtyp-Tiere im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede im Faserdurchmesser sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.

Lebensalter [Tage]	größter Faserdurchmesser [µm]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
60	37,50	49,00
80	36,67	47,50
100	35,71	44,44
120	32,00	51,11

Tabelle 3-12: Mittelwerte des größten Faserdurchmessers im Nukleus hypoglossus beider Versuchsgruppen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Durch die Bestimmung des kleinsten, mittleren und größten Muskelfaserdurchmessers konnte gezeigt werden, dass in den Zungen der transgenen Mäuse die Durchmesser der Muskelfasern zu jedem untersuchten Zeitpunkt deutlich geringer sind, als bei den Wildtyp-Tieren. Allerdings konnte keine Veränderung der Durchmesser im Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden.

3.5 Untersuchung des Hirnstamms Vitamin-E-behandelter G93A-SOD1 Mäuse

3.5.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm von Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 Mäusen

Verschiedene Antioxidantien werden bei der ALS als mögliche Therapieansätze diskutiert. Eines dieser antioxidativen Mittel ist Vitamin E. Um zu überprüfen, ob die Gabe von Vitamin E die in Abschnitt 3.1 beschriebene Erhöhung der T_2-Relaxationszeiten in den motorischen Hirnstammkernen bei transgenen G93A-SOD1 Mäusen beeinflussen kann, wurden transgene Mäuse (n = 15) und Wildtyp-Tiere (n = 11) ab einem Alter von 30 Tagen nach Geburt mit spezieller Nahrung, der Vitamin E beigemischt wurde, gefüttert. Um den Verlauf der Veränderungen im Hirnstamm zu detektieren, wurden die Tiere zwischen dem Alter von 40 und 120 Tagen alle 20 Tage untersucht.

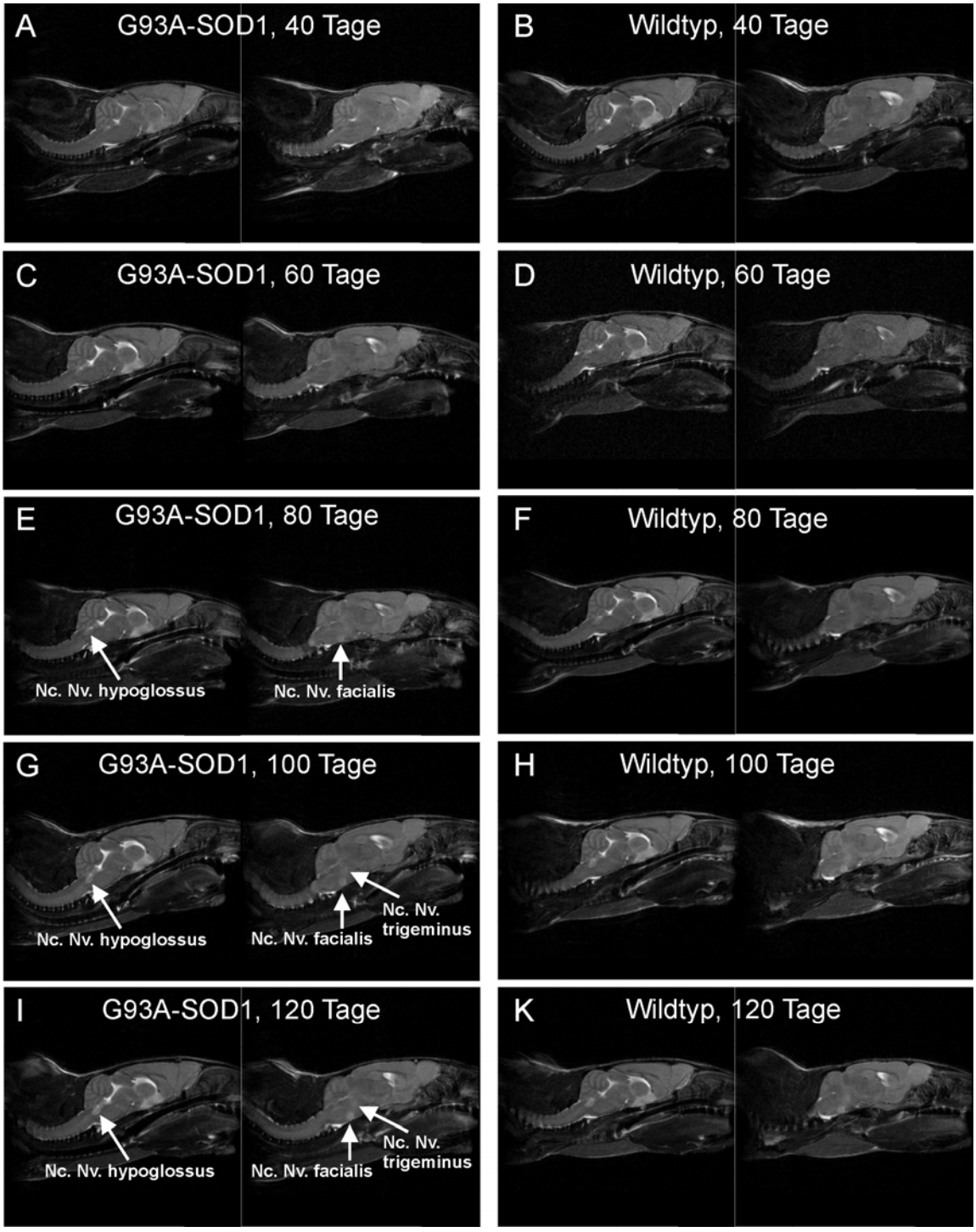

Abbildung 3-21: RARE-Bilder des Hirnstamms der Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse. Sagittale Bilder an Bregma-Position 0,0 mm (links) und Bregma-Position 0,6 mm (rechts). A, C: Aufnahmen einer 40 und 60 Tage alten transgenen Maus. Keine Veränderungen sind erkennbar. E: Im Hirnstamm einer transgenen Maus im Alter von 80 Tagen sind die motorischen Hirnstammkerne Nc. Nv. XII und Nc. Nv. VII als Hyperintensitäten sichtbar. G: An Tag 100 wird der Nc. Nv. V sichtbar. I: Am letzten Messzeitpunkt heben sich die drei Hirnstammkerne deutlich vom umliegenden Gewebe ab. B, D, F, H, K: Im Hirnstamm der Wildtyp-Maus sind zu keinem der fünf Messzeitpunkte Veränderungen sichtbar.

Wie auch bei den unbehandelten transgenen G93A-SOD1 Mäusen (vgl. Abschnitt 3.1), wurden bei allen behandelten transgenen Tieren im Laufe der Erkrankung Veränderungen im Hirnstamm festgestellt. In Abbildung 3-21 sind die sagittalen RARE-Bildsätze exemplarisch für eine transgene G93A-SOD1 und eine Wildtyp-Maus, welche beide mit Vitamin E behandelt wurden, zwischen Tag 40 und Tag 120 dargestellt. Am Tag 80 traten bei allen transgenen Tieren zwei Hyperintensitäten auf, welche dem Nukleus hypoglossus und Nukleus facialis zugeordnet werden konnten (Abb. 3-21E). Außerdem wurde an Tag 100 die dritte Hyperintensität, der Nukleus trigeminus, sichtbar (Abb. 3-21G), so dass am letzten Messzeitpunkt drei motorische Hirnstammkerne sichtbar waren (Abb. 3-21I). Die MRT-Untersuchungen der Vitamin E-behandelten Wildtyp-Tiere zeigten zu keinem Messzeitpunkt Veränderungen im Hirnstamm (Abb. 3-21B, D, F, H, K).

Auch in anderen Gebieten des Gehirns konnten bei den Vitamin E-behandelten transgenen und Wildtyp-Mäusen keine Veränderungen festgestellt werden. Wie auch bei den nicht-behandelten transgenen Mäusen traten im T_2-gewichteten MRT der Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 Tiere deutliche Veränderungen im Hirnstamm auf. In beiden Fällen waren die motorischen Hirnstammkerne Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus betroffen. Auch im zeitlichen Verlauf des Erscheinens der Hyperintensitäten ließen sich keine Unterschiede feststellen.

Aus den MSME Datensätzen wurden im Anschluss die T_2-Relaxationszeiten an jedem Messzeitpunkt für die transgenen Tiere und Wildtyp-Tiere, welche mit Vitamin E behandelt wurden, bestimmt. Die Werte waren zum Teil nicht normalverteilt. Aus diesem Grund wurden sie nicht gemittelt, sondern alle Daten wurden mit Median und Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) sowie den Spannweiten dargestellt, um einen Vergleich möglich zu machen. In Abbildung 3-22 sind die T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis für die 15 transgenen Tiere und die elf Wildtyp-Tiere für die Messzeitpunkte 40, 60, 80, 100 und 120 Tage nach Geburt dargestellt. Die einzelnen Mediane der T_2-Relaxationszeiten für beide Versuchsgruppen sind in Tabelle 3-13 zu finden.
Die nichtparametrische zweifaktorielle Varianzanalyse ergab signifikante Unterschiede hinsichtlich des Genotyps (ANOVA, $p < 0{,}001$) und des Alters

(ANOVA, $p < 0{,}001$). Die T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis der Vitamin E-behandelten transgenen Mäuse stiegen signifikant von Tag 40 bis zum letzten Messzeitpunkt im Alter von 120 Tagen nach Geburt an (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0{,}01$), wodurch sich eine altersabhängige Zunahme der T_2-Werte ergab. Die T_2-Relaxationszeiten des Nukleus facialis der Wildtyp-Mäuse bleiben an allen Messzeitpunkten relativ konstant auf einem Level, die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p > 0{,}1$).

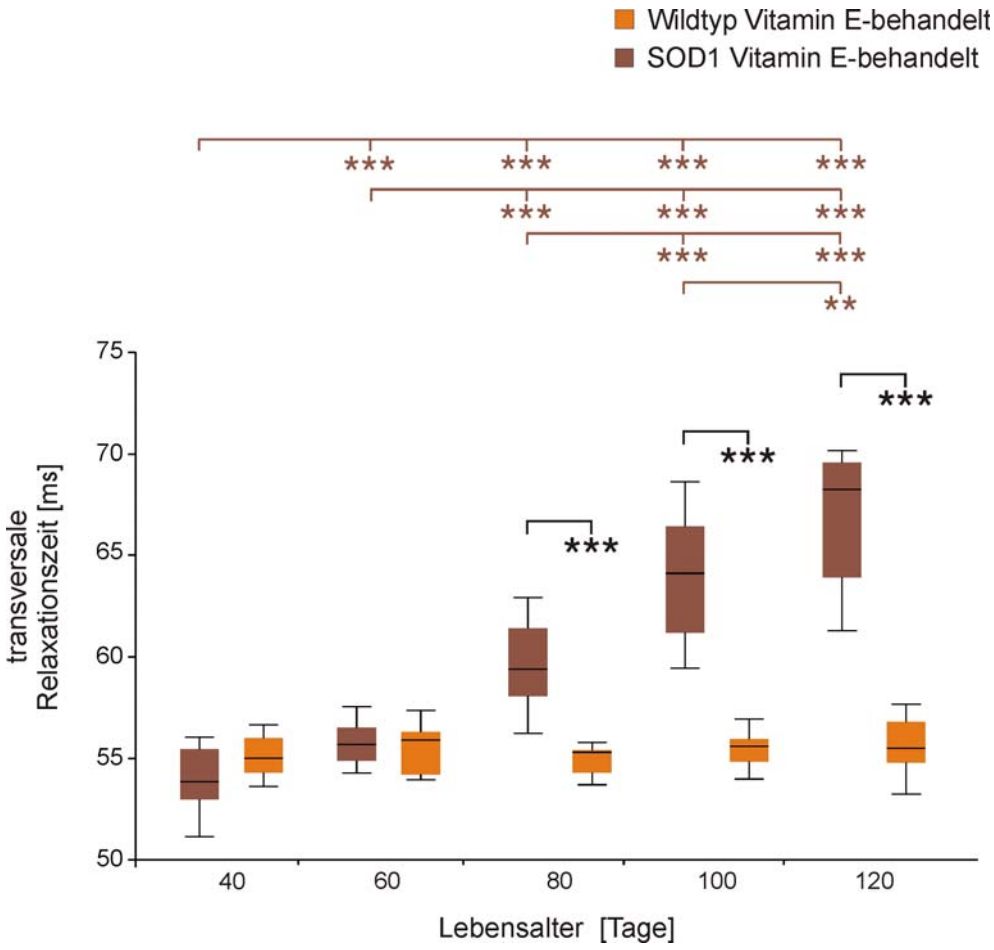

Abbildung 3-22: T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis der Vitamin E-behandelt transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p < 0{,}01$) und * ($p < 0{,}001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Braune Klammern kennzeichnen Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten bei den transgenen Mäusen.**

Lebensalter [Tage]	T_2-Relaxationszeit [ms]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	53,85	55,00
60	55,70	55,90
80	59,40	55,30
100	64,10	55,60
120	68,20	55,50

Tabelle 3-13: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis von Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäusen an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Ein Vergleich der beiden Versuchsgruppen ergab signifikante Unterschiede (U-Test, jeweils $p < 0,001$) ab dem Alter von 80 Tagen. Die T_2-Relaxationszeiten der transgenen Tiere waren signifikant höher als die Werte der Wildtyp-Tiere im selben Alter.

Abbildung 3-23 stellt die T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus für die Vitamin E-behandelten transgenen und Wildtyp-Mäuse dar. Die dazugehörigen Mediane der T_2-Relaxationszeiten für beide Versuchsgruppen sind aus Tabelle 3-14 ersichtlich. Die mittleren T_2-Relaxationszeiten an den fünf Messzeitpunkten unterschieden sich signifikant voneinander (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0,05$). Innerhalb der Versuchsgruppe der Wildtyp-Mäuse wurde mit dem Wilcoxon Test für Paardifferenzen kein signifikanter Unterschied der T_2-Relaxationszeit (mindestens $p > 0,1$) festgestellt.

Der Vergleich von G93A-SOD1 und Wildtyp-Tieren zeigte ab dem Alter von 80 Tagen signifikante Unterschiede bei den mittleren T_2-Werten (U-Test, mindestens $p < 0,05$). Die Werte des Nukleus hypoglossus der transgenen Tiere waren ab Tag 80 mehrere Millisekunden höher. Ab Tag 80 war der Nukleus hypoglossus auch in den RARE-Datensätzen sichtbar.

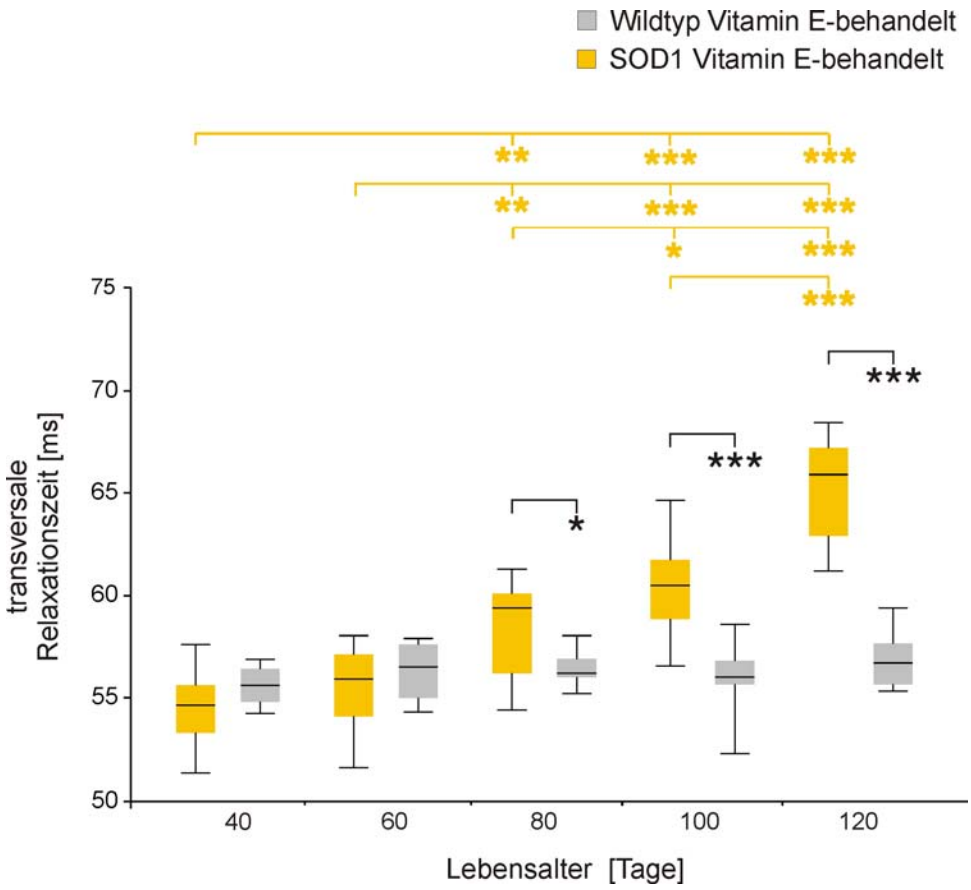

Abbildung 3-23: T_2-Relaxationszeiten im Nukleus hypoglossus der Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Gelbe Klammern kennzeichnen Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse.**

Lebensalter [Tage]	T_2-Relaxationszeit [ms]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	54,80	55,60
60	55,90	56,50
80	59,40	56,20
100	60,50	56,00
120	65,90	56,70

Tabelle 3-14: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus hypoglossus der Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

Die Ergebnisse der Quantifizierung der T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus für beide Vitamin E-behandelten Versuchsgruppen sind in Abbildung 3-24 dargestellt. In Tabelle 3-15 finden sich die dazugehörigen Werte der Mediane für die T_2-Relaxationszeiten. Aus Abbildung 3-24 geht hervor, dass es auch beim Nukleus trigeminus der transgenen Mäusen, wie auch bei den anderen Hirnstammkernen, einen longitudinalen signifikanten Anstieg der T_2-Relaxationszeit gibt (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p < 0,05$). Währenddessen ändern sich die Werte der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus trigeminus der behandelten Wildtyp-Tiere nicht (Wilcoxon Test für Paardifferenzen, mindestens $p > 0,1$).

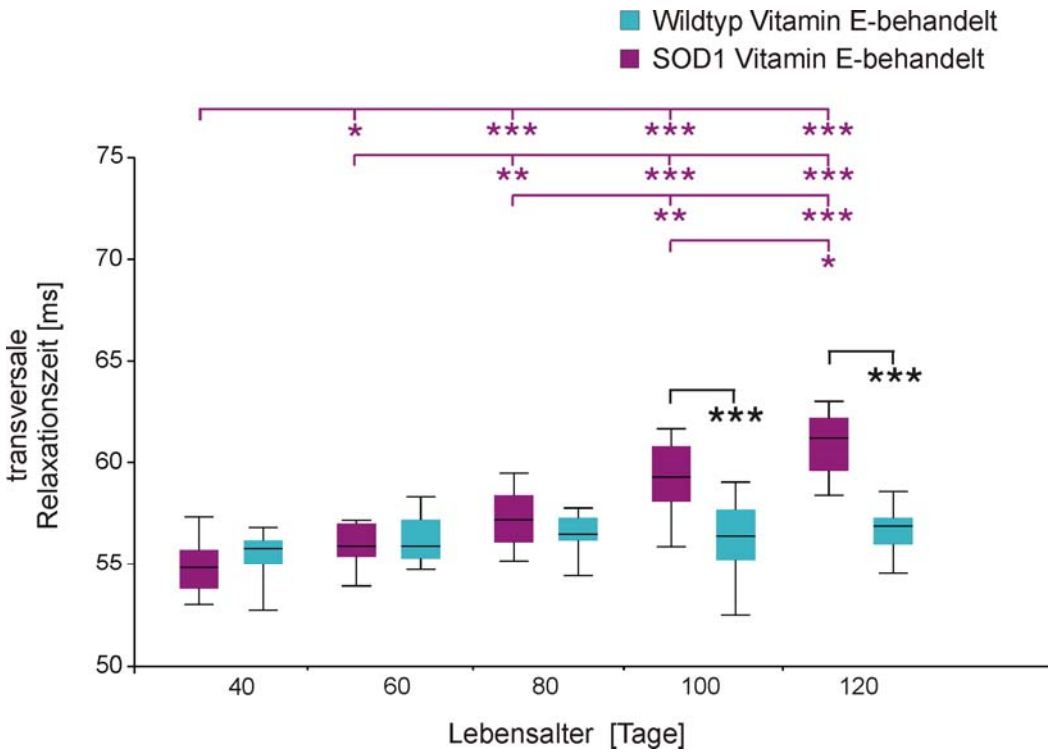

Abbildung 3-24: T_2-Relaxationszeiten im Nukleus trigeminus der Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Tiere in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet. Die schwarzen Klammern beziehen sich auf Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren. Lila Klammern kennzeichnen Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe der transgenen Mäuse.**

Unter Verwendung des U-Tests wurden beide Versuchsgruppen miteinander vergleichen. Es ergab sich einen signifikanter Unterschied in der T_2-

Relaxationszeit am Tag 100 und 120 (mindestens $p < 0{,}001$). Ab Tag 100 ist der Kern auch in den RARE-Bildern sichtbar.

Lebensalter [Tage]	T_2-Relaxationszeit [ms]	
	transgene Mäuse	Wildtyp-Mäuse
40	54,80	55,80
60	55,90	55,90
80	57,20	56,50
100	59,30	56,40
120	61,20	56,90

Tabelle 3-15: Mediane der T_2-Relaxationszeiten im Nukleus trigeminus der Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse an den unterschiedlichen Messzeitpunkten.

3.5.2 Vergleich mit den unbehandelten Tieren

Sowohl bei den unbehandelten transgenen G93A-SOD1 Mäusen als auch bei den Vitamin E-behandelten transgenen Tieren wurde ein signifikanter longitudinaler Anstieg der T_2-Relaxationszeit in den motorischen Hirnstammkernen Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus gemessen. Um den Einfluss von Vitamin E auf die T_2-Werte zu überprüfen, wurden die mittleren T_2-Relaxationszeiten der behandelten und unbehandelten Mäuse statistisch miteinander verglichen.

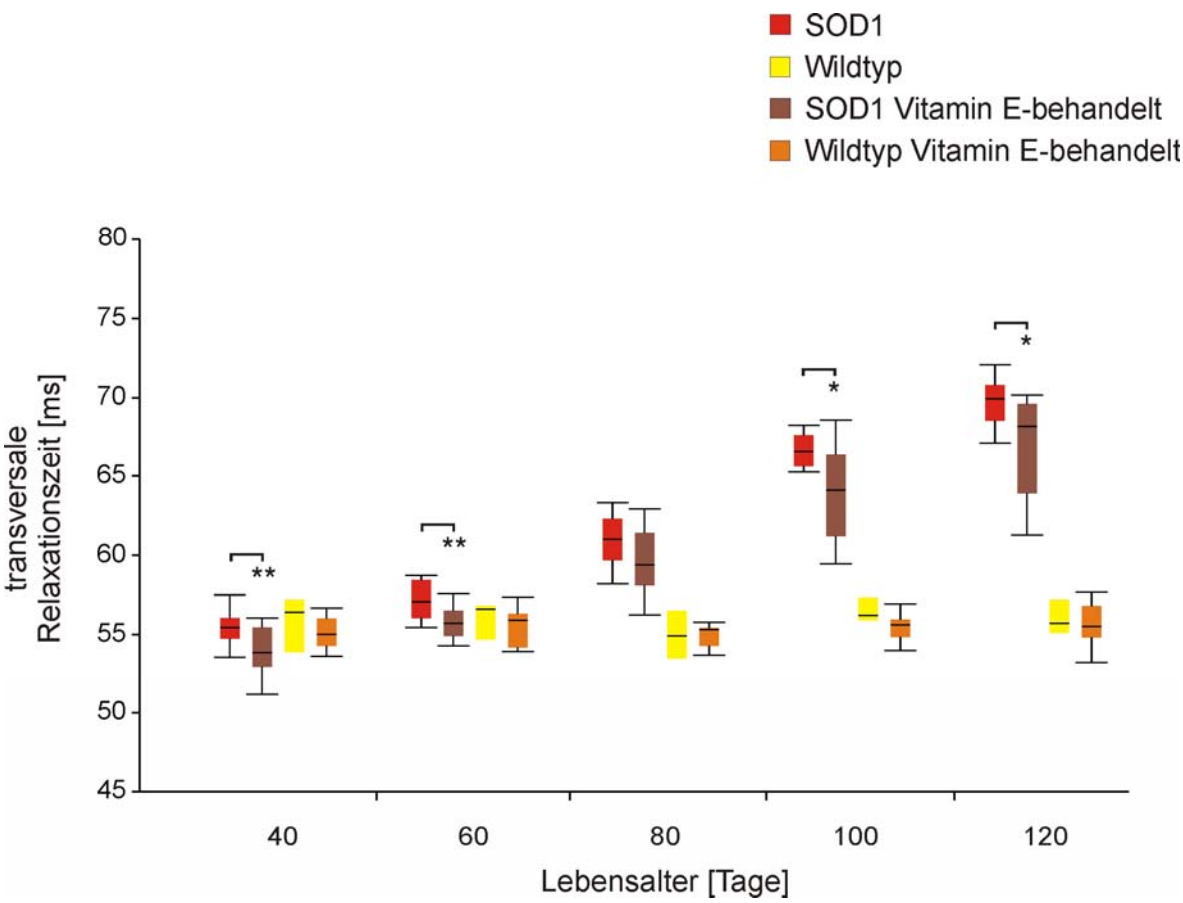

Abbildung 3-25: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus facialis der unbehandelten und Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und ** ($p < 0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.

Die mittleren T_2-Relaxationszeiten im Nukleus facialis der Vitamin E-behandelten transgenen Mäuse lagen zu jedem Messzeitpunkt unterhalb der mittleren Werte der unbehandelten transgenen Mäuse (Abb. 3-25). Signifikante Unterschiede ergaben sich zu allen Untersuchungszeitpunkten (U-Test, mindestens $p < 0,05$) außer an Tag 80 (U-Test, $p > 0,1$). Ein statistischer Vergleich mit dem U-Test zwischen den unbehandelten und behandelten Wildtyp-Mäusen zeigte keine signifikanten Unterschiede (mindestens $p > 0,05$).

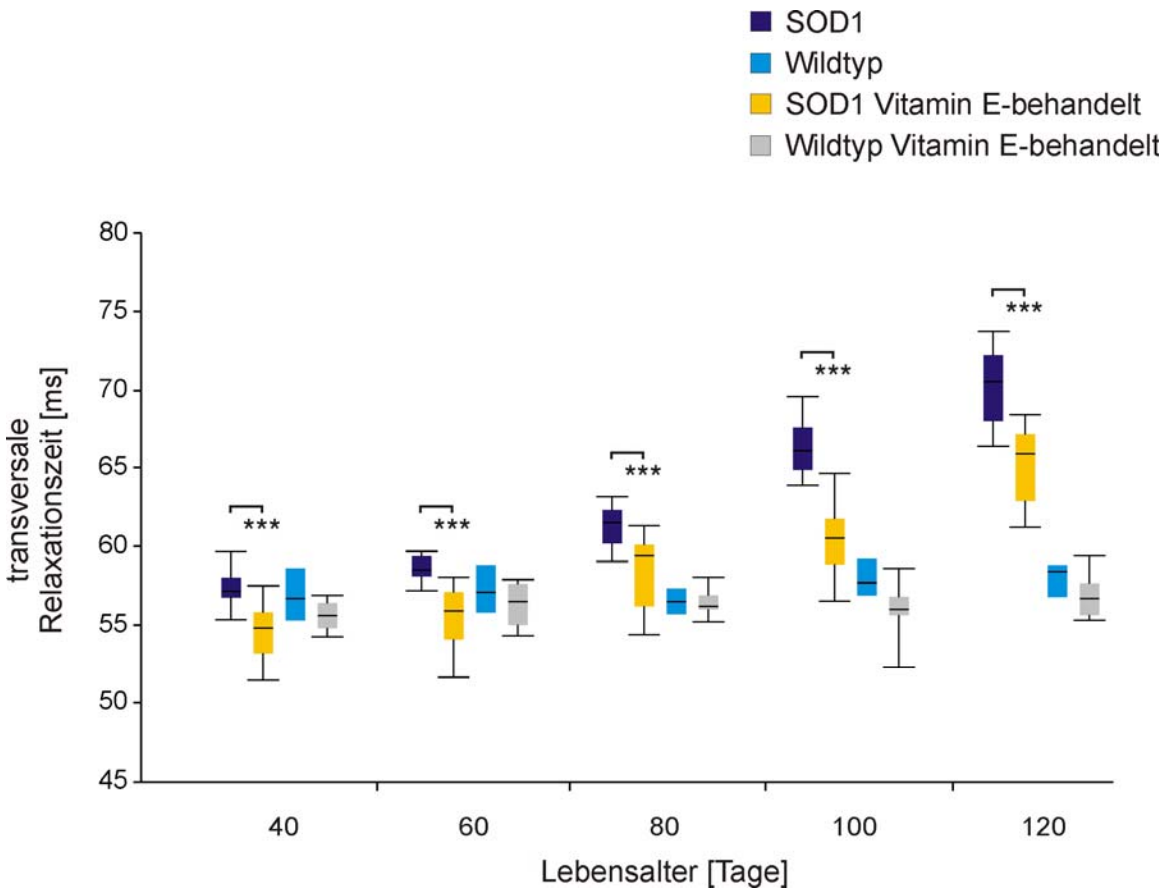

Abbildung 3-26: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus der unbehandelten und Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * (p < 0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Wie aus Abbildung 3-26 ersichtlich wird, sind die mittleren T_2-Werte des Nukleus hypoglossus der Vitamin E-behandelten transgenen Tiere ebenfalls zu jedem Messzeitpunkt signifikant geringer als bei den unbehandelten transgenen Tieren (U-Test, jeweils $p < 0,001$). Bei den behandelten und unbehandelten Wildtyp-Tieren waren keine signifikante Unterschiede vorhanden (U-Test, mindestens $p > 0,05$).

In Abbildung 3-27 sind die mittleren T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus an den fünf Messzeitpunkten für die unbehandelten und Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse dargestellt. Der statistische Vergleich der behandelten mit den unbehandelten Mäusen zeigt, dass die T_2-Werte der behandelten transgenen Tiere über alle Untersuchungszeitpunkte signifikant niedriger waren (U-Test, mindestens $p < 0,05$), während sich die Werte bei den

Wildtyp-Mäusen statistisch nicht voneinander unterschieden (U-Test, mindestens p > 0,1).

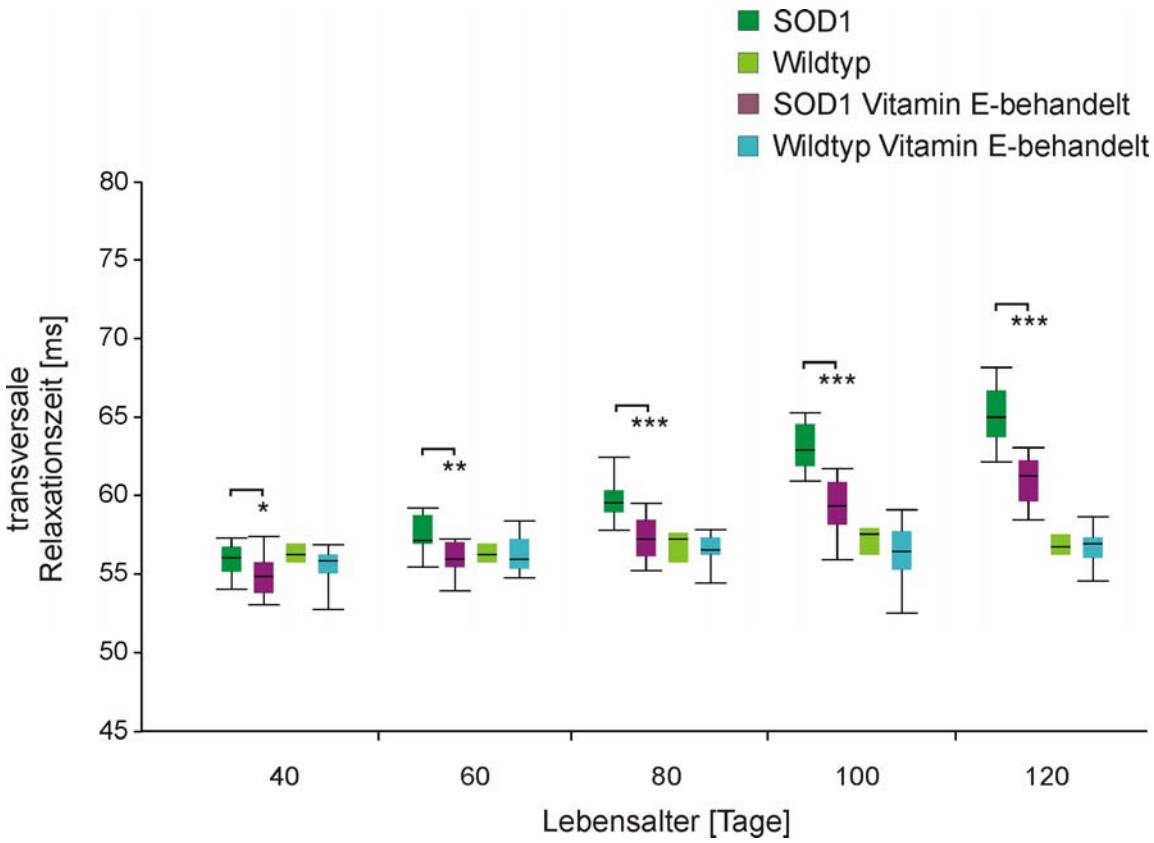

Abbildung 3-27: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus der unbehandelten und Vitamin E-behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse in unterschiedlichen Altersstufen. Dargestellt sind die Mediane mit Quartilen (Q_{25} und Q_{75}) und Spannweiten. Signifikante Unterschiede sind mit * (p < 0,05), ** (p < 0,01) und * (p < 0,001) unter den Klammern gekennzeichnet.**

3.5.3 Progression der T_2-Relaxationszeit

In den drei Hirnstammkernen waren die T_2-Werte der Vitamin E-behandelten G93A-SOD1 Mäuse zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant geringer als bei den unbehandelten transgenen Mäusen. Um den Einfluss von Vitamin E auf die T_2-Werte noch genauer zu untersuchen wurde die Progression der T_2-Relaxationszeiten in Abhängigkeit von Alter bestimmt. Dafür wurde eine lineare Regressionsgerade durch die T_2-Werte gegen das Alter aufgetragen, wobei die Werte an Tag 40 nicht mit einbezogen wurden, da erst ab dem Alter von 80 Tagen

signifikante Unterschiede zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren gefunden wurden. Somit ist der Tag 60 der letzte Untersuchungszeitpunkt, an dem es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ergab. Um den Effekt der Vitamin E-Behandlung auf die Progression der T_2-Werte zu bestimmen, wurden die Steigungen der Geraden statistisch miteinander verglichen.

In Abbildung 3-28 sind die Mittelwerte der Steigungen für die unbehandelten und für die behandelten transgenen G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse dargestellt. Die T_2-Relaxationszeiten stiegen abhängig vom Alter sowohl bei den unbehandelten, als auch bei den behandelten transgenen Tieren signifikant im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Tieren (behandelt und unbehandelt) an (ANOVA, jeweils $p < 0{,}001$). Allerdings ergab sich kein Unterschied für die T_2-Relaxationszeiten bei den Vitamin E-behandelten transgenen Tieren (ANOVA, $p > 0{,}1$). Die Steigungen der Regressionsgerade der Wildtyp-Tiere unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ANOVA, $p > 0{,}1$).

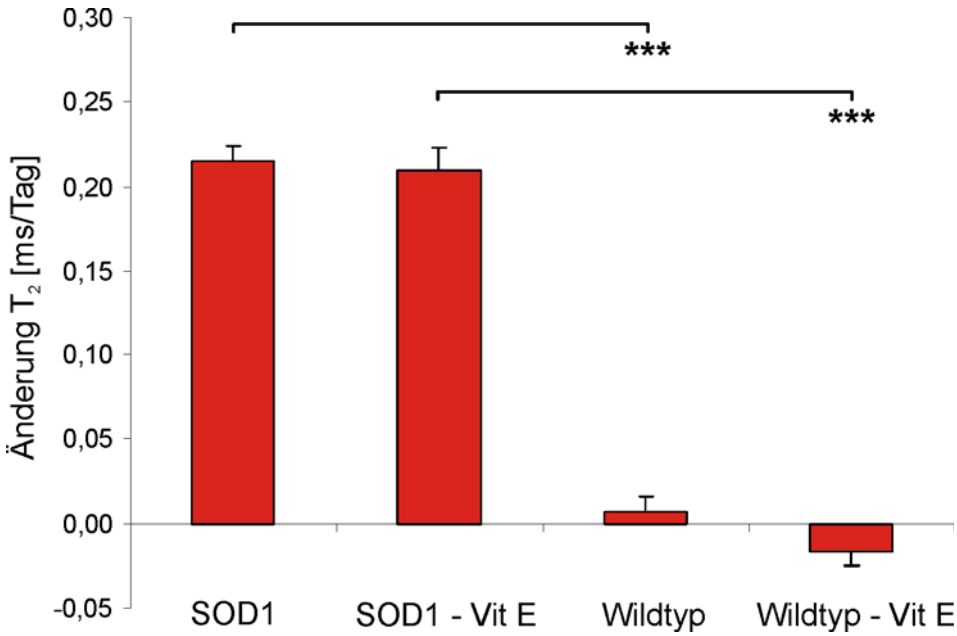

Abbildung 3-28: Mittlere Änderung der T_2-Relaxationszeit im Nukleus facialis in Abhängigkeit vom Alter für die unbehandelten und Vitamin E-behandelten transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0{,}001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Ein weniger starker altersabhängiger Anstieg der T_2-Relaxationszeiten konnten wiederum für den Nukleus hypoglossus bei den behandelten G93A-SOD1 Tieren

gezeigt werden (Abb. 3-29). Hier stiegen die T_2-Werte der behandelten transgenen Mäuse in Abhängigkeit vom Alter signifikant weniger stark an als bei den unbehandelten transgenen Tieren (ANOVA, $p < 0,05$). Die T_2-Werte der unbehandelten als auch der behandelten Wildtyp-Tiere änderten sich nicht über die Untersuchungszeitpunkte (ANOVA, $p > 0,1$).

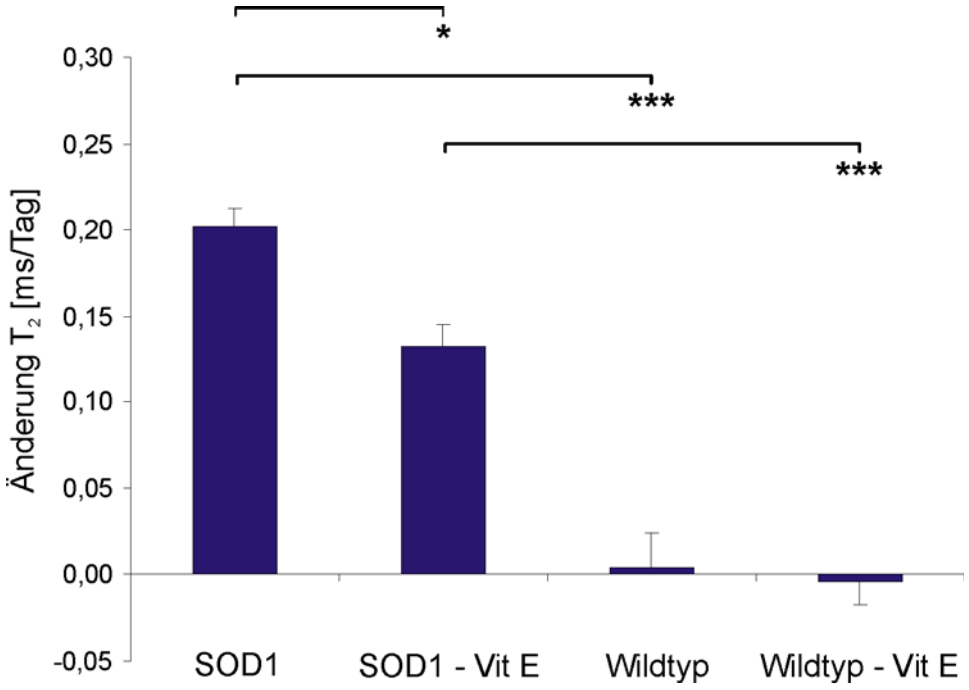

Abbildung 3-29: Mittlere Änderung der T_2-Relaxationszeit im Nukleus hypoglossus in Abhängigkeit vom Alter für die unbehandelten und die Vitamin E-behandelten transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit * ($p < 0,05$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Die T_2-Werte für den Nukleus trigeminus der unbehandelten und behandelten transgenen Mäuse stiegen im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Tieren in Abhängigkeit vom Alter signifikant an (Abb. 2-30, ANOVA, $p < 0,001$). Allerdings ergab sich im Vergleich zu den unbehandelten transgenen Tieren ein signifikant geringerer Anstieg bei den behandelten transgenen Mäusen (ANOVA, $p < 0,01$). Die T_2-Werte der unbehandelten, als auch der behandelten Wildtyp-Tiere änderten sich nicht (ANOVA, $p > 0,1$).

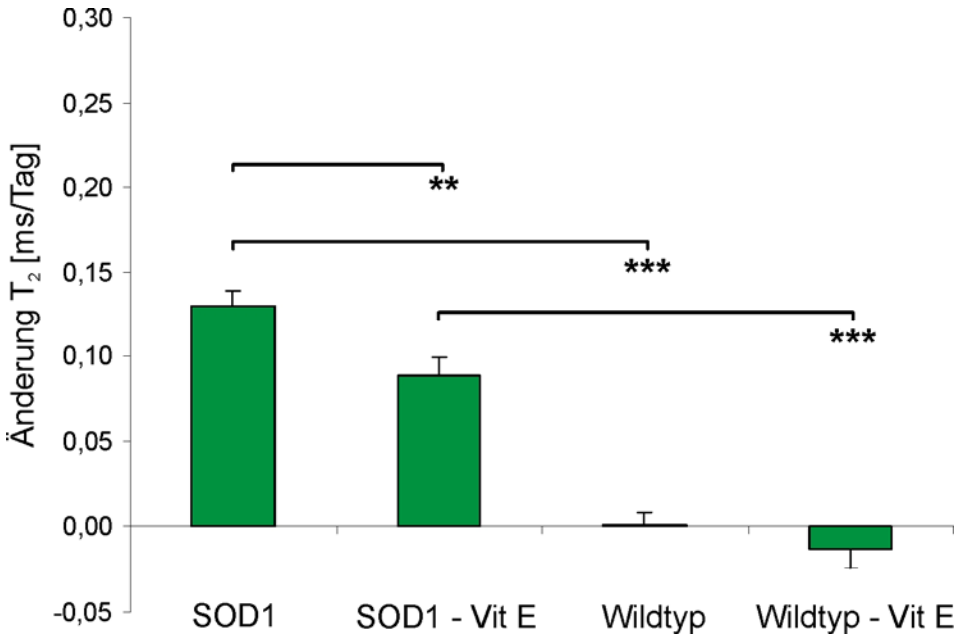

Abbildung 3-30: Mittlere Änderung der T_2-Relaxationszeit im Nukleus trigeminus in Abhängigkeit vom Alter für die unbehandelten und die Vitamin E-behandelten transgenen Mäuse und Wildtyp-Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung. Signifikante Unterschiede sind mit ** ($p < 0,01$) und * ($p < 0,001$) unter den Klammern gekennzeichnet.**

Durch den statistischen Vergleich der Steigungen konnte gezeigt werden, dass im Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus die T_2-Relaxationszeit abhängig vom Alter der Mäuse durch die Gabe von Vitamin E bei den transgenen Mäusen weniger stark anstieg.

3.6 Veränderungen des MR-Spektrums im Hirnstamm transgener G93A-SOD1 Mäuse

Bei *in-vitro* ^{1}H-MRS des Rückenmarks und des Hirnstamms von G93A-SOD1 Mäusen wurden Veränderungen in der Konzentration verschiedener Metabolite festgestellt (Nießen et al., 2007). In dieser Arbeit wurde der Hirnstamm von transgenen G93A-SOD1 Mäusen auf Veränderungen hinsichtlich der Metabolitenzusammensetzung *in-vivo* mittels ^{1}H-MRS untersucht. Die MR-Spektren des Cerebellums dienten dabei als Kontrolle, da dort in der T_2-gewichteten Bildgebung keine Veränderungen sichtbar waren. Sechs transgene G93A-SOD1 und neun Wildtyp-Tiere wurden im Alter von 120 Tagen MR-spektroskopisch untersucht.

Typische ^{1}H-MR-Spektren des Hirnstammes einer Wildtyp-Maus und einer transgenen Maus sind in Abbildung 3-31 dargestellt. In den Spektren konnten mehrere Metabolite identifiziert werden: Inositol, Cholin, Kreatin, Glutamin, Glutamat, N-Acetylaspartat und Laktat. Im Vergleich zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen war das Signal für N-Acetylaspartat im Hirnstamm der transgenen Mäuse deutlich reduziert.

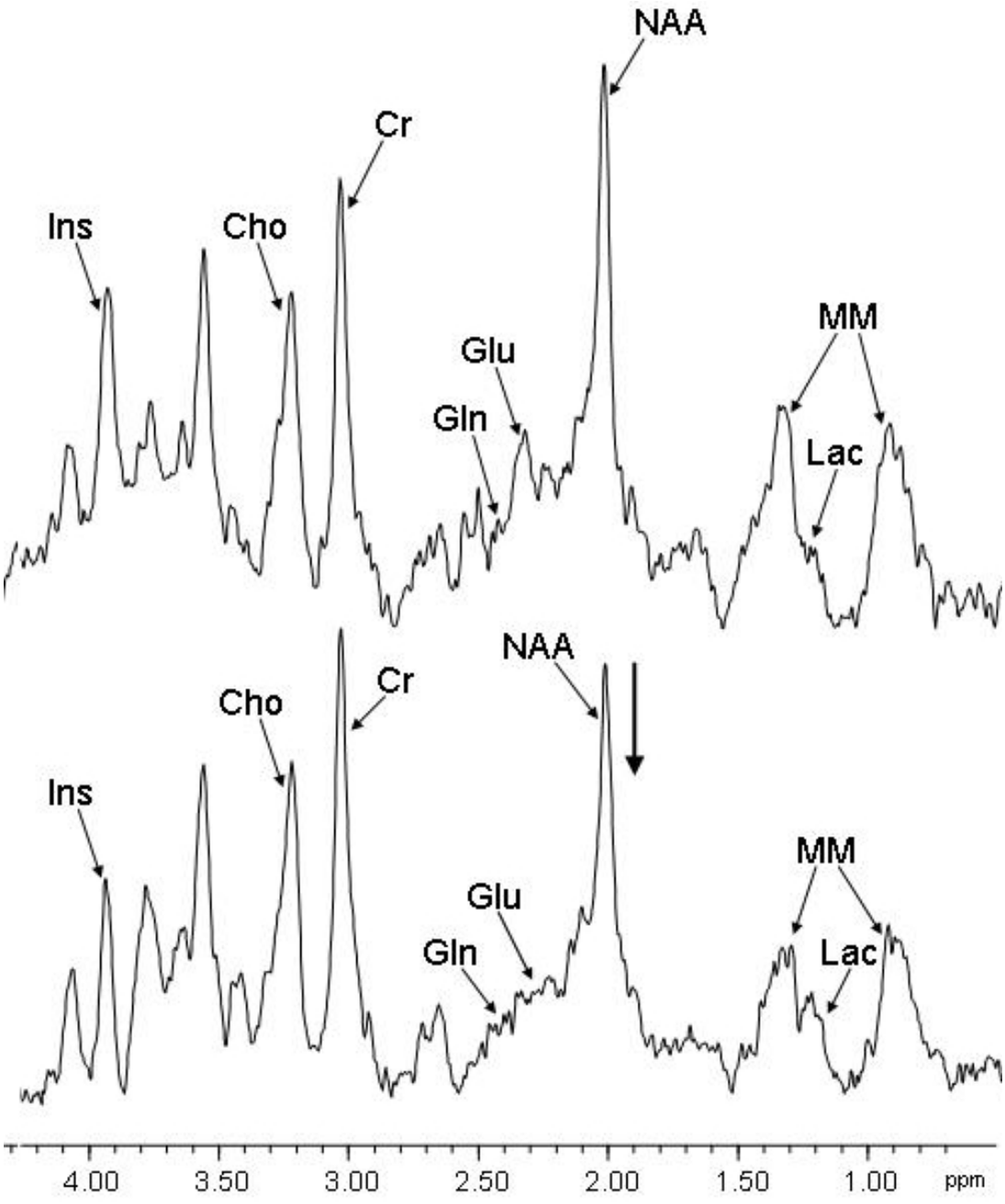

Abbildung 3-31: Repräsentatives ^{1}H-MR-Spektrum des Hirnstammes einer Wildtyp-Maus (oben) und einer transgenen G93A-SOD1 Maus (unten) an Tag 120 nach Geburt. Die Resonanzen der quantifizierten Metabolite sind folgendermaßen gekennzeichnet: Inositol (Ins), Cholin (Cho), Kreatin (Cr), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), N-Acetylaspartat (NAA), Makromoleküle (MM), Laktat (Lac). γ-Aminobuttersäure (GABA) konnte in den Spektren nicht identifiziert werden. Die chemische Verschiebung (proportionale Veränderung der Lamorfrequenz im Vergleich zu einer Referenzsubstanz) ist in ppm (parts per million) dargestellt.

Um systematische Fehler auszuschließen wurden alle Metabolitensignale bezogen auf Kreatin ausgewertet. *In-vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass die Kreatinkonzentration im Hirnstamm von G93A-SOD1 Mäusen im Verlauf der Erkrankung im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen konstant bleibt (Nießen et al., 2007). Auch in der hier vorliegenden Arbeit war die Kreatinkonzentration bei den transgenen Mäusen konstant.

In Abbildung 3-32 sind die verschiedenen Metabolitenkonzentrationen als Quotient zu Kreatin im Hirnstamm von G93A-SOD1 (n = 9) und Wildtyp-Tieren (n = 6) dargestellt. Bei den transgenen Mäusen wurde ein signifikanter Verlust von Laktat und N-Acetylaspartat festgestellt (Student`s t-Test, jeweils $p < 0,01$). Außerdem war die Glutaminkonzentration bei den transgenen Tieren im Vergleich mit den Wildtyp-Kontrolltieren signifikant erhöht (Student`s t-Test, $p < 0,01$). Eine Untersuchung der anderen Metabolite Cholin, γ-Aminobuttersäure, Glutamat und Inositol ergab keine signifikanten Unterschiede (Student`s t-Test, mindestens $p > 0,1$). Damit konnten zum ersten Mal Veränderungen im MR-Spektrum des Hirnstamms von G93A-SOD1 Mäusen *in-vivo* nachgewiesen werden.

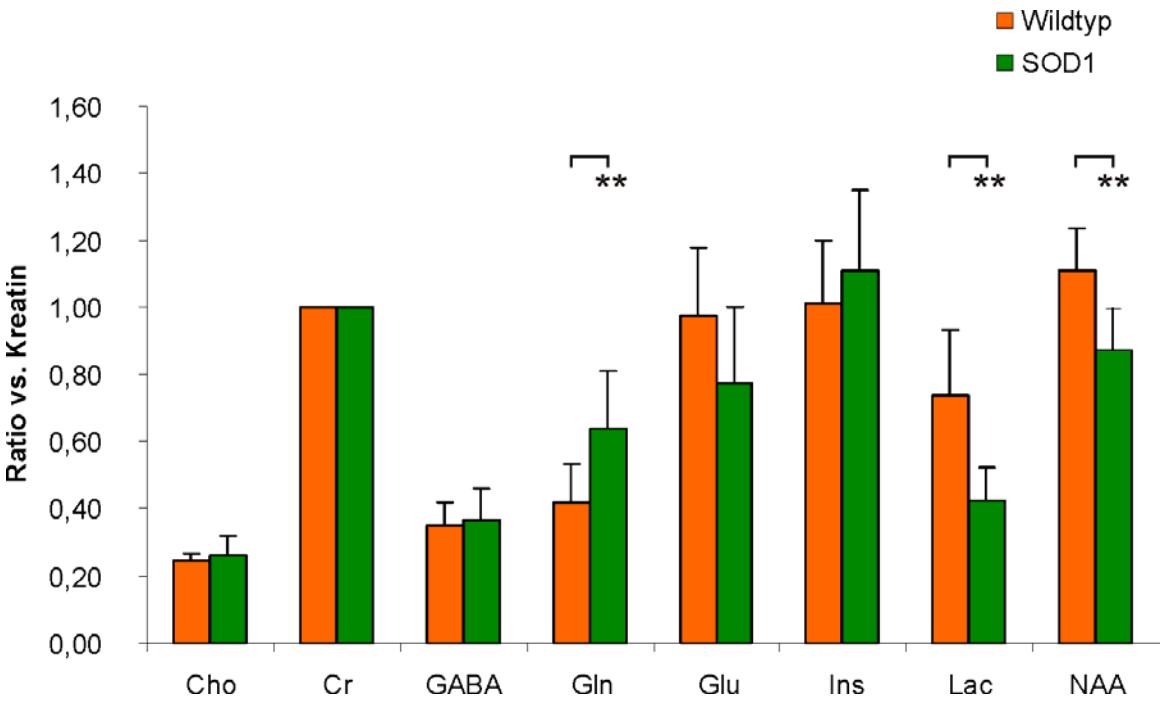

Abbildung 3-32: Mittlere Konzentrationen der verschiedenen Metabolite im Hirnstamm von G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse als Quotient zu Kreatin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen sind mit ** ($p < 0,01$) unter den Klammern gekennzeichnet.

Im Cerebellum der transgenen G93A-SOD1 Mäuse waren keine Veränderungen in der T_2-gewichteten Bildgebung sichtbar (vgl. Abschnitt 3.1). Aus diesem Grund wurde dieser Teil des Gehirns zusätzlich als interne Kontrolle untersucht. Bei neun transgenen und vier Wildtyp-Tieren wurde ein MR-Spektrum im Alter von 120 Tagen aufgenommen und die Konzentrationen der verschiedenen Metabolite quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Quantifizierung sind in Abbildung 3-33 dargestellt. Die Inositolkonzentration war bei den transgenen Tieren im Cerebellum signifikant erhöht (Student`s t-Test, $p < 0,01$). Die Konzentrationen der anderen Metabolite unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Student`s t-Test, mindestens $p > 0,1$).

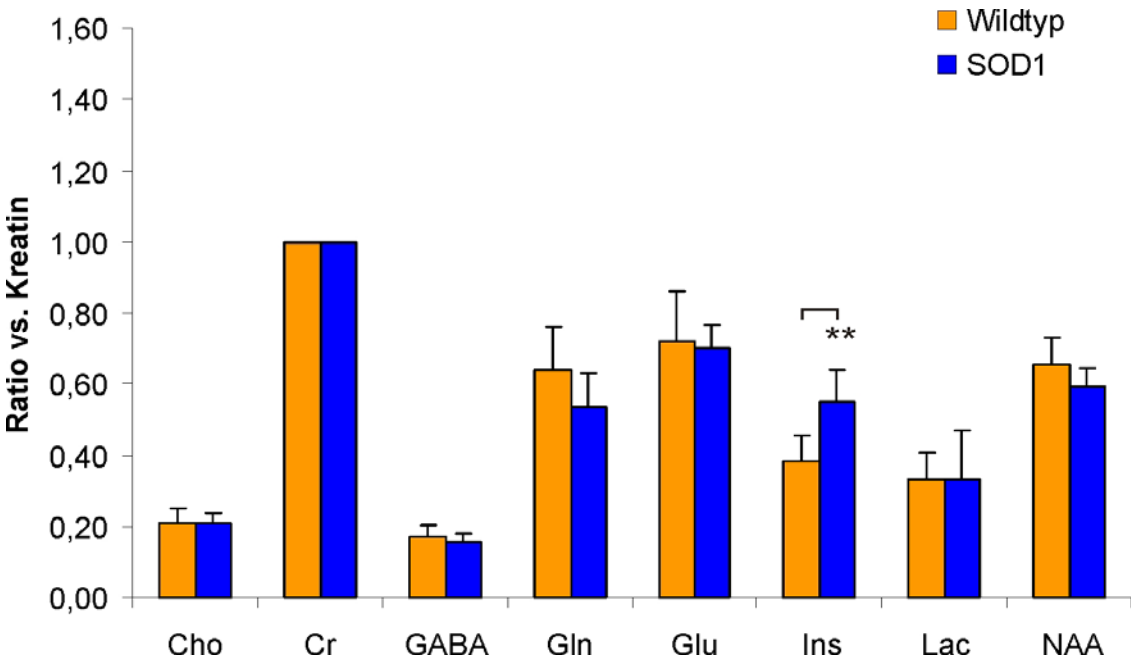

Abbildung 3-33: Mittlere Konzentrationen der verschiedenen Metabolite im Cerebellum von G93A-SOD1 und Wildtyp-Mäuse als Quotient zu Kreatin. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen.

4 Diskussion

Charakteristisch für die ALS ist eine Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons (Brown, 1995; Cleveland & Rothstein, 2001; Mulder et al., 1986; Rowland & Shneider, 2001; Shaw, 1999; Talbot, 2002). Die genauen pathologischen Mechanismen der selektiven Motorneurondegeneration sind immer noch unklar. Verschiedene Studien zeigten, dass die mutierte SOD1 eine oder mehrere zytotoxische Funktionen dazugewinnt („gain of function"-Theorie), welche zu einem Verlust der Motoneurone führen. Als mögliche Mechanismen für diese zusätzlichen Funktionen werden oxidativer Stress, aberrante Proteinaggregation, mitochondriale Degeneration oder Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität diskutiert (zusammengefasst in Bruijn et al., 2004). Zur Untersuchung möglicher Pathomechanismen werden sehr oft Mausmodelle verwendet. Dabei ist das G93A-SOD1 Mausmodell bisher am besten untersucht. Die Progression der Erkrankung im transgenen G93A-SOD1 Mausmodell wurde in den meisten Fällen durch biochemische Methoden (Gurney et al., 1994; Hafezparast et al., 2003; Kaspar et al., 2003; Kieran et al., 2005; Teuchert et al., 2006) oder Verhaltenstests (Dobrowolny et al., 2005; Schütz et al., 2005; Weydt et al., 2003) untersucht.
In dieser Arbeit konnte eine Verbindung zwischen der Erhöhung der T_2-Relaxationszeit in drei verschiedenen Hirnstammkernen und den morphologischen Korrelaten für diese Änderung im transgenen Mausmodell hergestellt werden. Außerdem konnte ich zeigen, dass die T_2-Relaxationszeit durch Gabe von Vitamin E beeinflusst werden kann. Diese neue Erkenntnis kann dazu beitragen, dass die T_2-Relaxationszeit als Biomarker für die Progression der Erkrankung in experimentellen Therapieversuchen verwendet werden kann.

4.1 Entwicklung des MRT-Signals im Hirnstamm

Die G93A-SOD1 Maus ist ein gut beschriebenes Modell für die Vorderhorndegeneration (Heiman-Patterson et al., 2005; Lambrechts et al., 2003; Talbot, 2002) bei der ALS. Aufgrund der limitierten Größe des Rückenmarks und damit der geringen Anzahl an Protonen, welche für MRT notwendig sind, ist das

Rückenmark im MRT nur sehr schwer zu untersuchen. Im Vergleich zum Rückenmark ist der Hirnstamm wesentlich größer. Dort ist ebenfalls das zweite Motoneuron zu finden ist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Hirnstamm des G93A-SOD1 Mausmodells mittels T_2-gewichtetem MRT hinsichtlich Veränderungen untersucht.

In den sagittalen RARE-Aufnahmen der transgenen Tiere konnte eine Signalzunahme im Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus gezeigt werden. Bei allen drei betroffenen Gebieten handelt es sich um Hirnstammkerne, in welchen auch Motoneurone zu finden sind. Dabei waren die Hirnstammkerne Nukleus facialis und Nukleus hypoglossus schon in der präklinischen Phase der Erkrankung (Heiman-Patterson et al., 2005; Talbot, 2002; Weydt et al., 2003) deutlich sichtbar, während der Nukleus trigeminus erst nach dem Auftreten der ersten Symptome in den Aufnahmen zu erkennen war. Im Gegensatz dazu waren bei keiner der Wildtyp-Mäuse Veränderungen im Hirnstamm oder in einem anderen Bereich des Gehirns zu erkennen. Angenstein et al. (2004), Zang et al. (2004) und Nießen et al. (2006) fanden im Hirnstamm ähnliche Ergebnisse in der T_2-gewichteten Bildgebung bei transgenen G93A-SOD1 Mäusen. So waren dieselben drei oben genannten Nuklei mit MRT bereits nachweisbar (Nießen et al., 2006). Bei Angenstein et al. (2004) und Zang et al. (2004) konnte zusätzlich auch noch der Nukleus ambiguus als Hyperintensität identifiziert werden. Dieser Kern war zwar zum Teil in den RARE-Bildern der transgenen Mäuse dieser Arbeit auch als Aufhellung zu erkennen, allerdings ist dieser Nukleus aufgrund der viel geringeren Größe im Vergleich zu den anderen drei Hirnstammkernen nur sehr schwer zu quantifizieren. Darum wurden in dieser Arbeit nur die deutlich erkennbaren Hyperintensitäten berücksichtigt. In Zang et al. (2004) wurden Veränderungen im Bereich des Nukleus hypoglossus nicht beschrieben. Der Nukleus hypoglossus wurde allerdings in dieser Arbeit bei den G93A-SOD1 Tieren nicht als hyperintens beschrieben. Dies könnte mit der Tatsache erklärt werde, dass der Nukleus hypoglossus direkt an den vierten Ventrikel angrenzt. Liquorgefüllte Bereiche des Gehirns sind in der T_2-gewichteten Bildgebung ebenfalls als Aufhellungen zu erkennen. Es ist deshalb vorstellbar, dass Zang et al. (2004) den Hirnstammkern und den Ventrikel aufgrund der direkten räumlichen Nähe nicht voneinander unterscheiden konnten.

In anderen Gehirnarealen der transgenen Mäuse habe ich keine Veränderungen in den RARE-Aufnahmen erkannt. Zang et al. (2004) beschrieben weitere Hyperintensitäten im Bereich der Substantia nigra, im Cerebellum und im lateralen cerebralen Kortex. Allerdings konnten weder in der vorliegenden Arbeit noch von anderen Gruppen Hyperintensitäten in diesen Bereichen nachgewiesen werden. Auch eine Vergrößerung des vierten Ventrikels und des zerebralen Aquädukts (Zang et al., 2004) im transgenen Mausmodell für ALS konnte mittels T_2-gewichteter Bildgebung nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Quantifizierung der T_2-Relaxationszeiten in den motorischen Hirnstammkernen der transgenen Tiere ergab einen signifikanten Anstieg im Verlauf der Erkrankung. Die T_2-Werte waren ab dem Tag 80 nach Geburt signifikant höher im Vergleich zu den Werten der Wildtyp-Tiere (vgl. Abb.3-2, Abb.3-3 und Abb. 3-4). Somit ist eine Erhöhung der T_2-Werte bereits in der präklinischen Phase der Erkrankung bei den transgenen Tieren detektierbar. Dies ermöglicht eine Charakterisierung der präklinischen Phase im G93A-SOD1 Mausmodell mittels MRT und zeigt, dass vor dem Erscheinen von Verhaltenssymptomen bereits neuronale Veränderungen auftreten müssen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die T_2-Werte in den drei motorischen Hirnstammkernen der G93A-SOD1 Maus erhöht sind (Angenstein et al., 2004; Nießen et al., 2006). Außerdem konnten Nießen et al. (2006) signifikante Unterschiede in der T_2-Relaxationszeit zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen in der präklinischen Phase feststellen. Ein direkter Vergleich der T_2-Werte der drei Hirnstammnuklei, welche in Nießen et al. (2006) für die G93A-SOD1 Maus publiziert wurden, zeigt, dass die Werte in dieser Arbeit etwas unterhalb der bereits veröffentlichten Werte liegen. Ein Grund für die Unterschiede in den Werten könnte eventuell in der etwas unterschiedlichen Lage der ROIs für die Auswertung oder auch in der Auswahl der untersuchten Schicht liegen. So ist es möglich, dass eine Schicht verwendet wurde, in welcher der jeweilige Nukleus nicht in seiner maximalen Größe zu sehen ist. Eine weitere Erklärung für die Unterschiede in den T_2-Werten könnte die unterschiedliche Software, welche zu Auswertung verwendet wurde, sowie die Auflösung der verwendeten Spule sein.

In der T_2-gewicheten Bildgebung sind normalerweise Liquor oder Ödeme mit einer hohen Signalintensität sichtbar. Damit ist auch ein verlängerter T_2-Wert verbunden. Eine mittlere Intensität haben bei dieser Bildgebung Fettgewebe und Knochenmark. Da die T_2-Werte im Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus erhöht sind (vgl. Abb.3-2, Abb.3-3 und Abb. 3-4), bedeutet dies, dass es in diesen Bereichen Flüssigkeitsansammlungen geben muss. Ein Grund für die Flüssigkeitsansammlungen könnte eine zytoplasmatische Vakuolisierung der Motoneurone sein (Angenstein et al., 2004; Zang et al., 2004). Das Entstehen von Vakuolen ist ein charakteristisches Zeichen für den Beginn der Motoneurondegeneration und wurde bereits für Neurone im Vorderhorn des Rückenmarks der G93A-SOD1 Mäuse beschrieben (Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2000; Kong und Xu, 1998). Die Vakuolen werden oft mit degenerierenden Mitochondrien assoziiert, bei denen der Intermembranenraum aufgebläht ist (Jaarsma et al., 2000; Mattiazzi et al., 2002). Der Mechanismus, welcher für die Bildung von Vakuolen verantwortlich ist, ist bisher noch unbekannt. Allerdings wird angenommen, dass die mutierte SOD1 für ihre Entstehung verantwortlich ist (Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2000; Kong und Xu, 1998).

T_2-gewichtete MRT an ALS-Patienten zeigte bisher hauptsächlich eine Signalzunahme im Kortikospinaltrakt (Abe et al., 1997; Cheung et al., 1995; Goodin et al., 1988; Hofmann et al., 1998; Peretti-Viton et al., 1999; Pradhan et al., 2006; Sarchielli et al., 2001; Thorpe et al., 1996; Waragai, 1997). Signalveränderungen in motorischen Hirnstammkernen konnten bisher noch nicht nachgewiesen werden, obwohl ca. 25% aller ALS-Patienten eine bulbäre Symptomatik besitzen. In den bisher veröffentlichten Studien wurde nicht zwischen einer spinalen und einer bulbären ALS bei den Patienten unterschieden. Es kann daher angenommen werden, dass hauptsächlich Patienten mit spinaler ALS im MRT untersucht wurden. Zur Klärung, ob sich Veränderungen in den motorischen Hirnstammkernen bei ALS-Patienten mittels MRT nachweisen lassen, sollten gezielt Patienten mit bulbären Symptomen untersucht werden.

Anhand der Flächenbestimmung der Hyperintensitäten ließ sich die Entwicklung der Veränderungen in den Hirnstammkernen verfolgen. Die, durch die Erkrankung im MRT sichtbar werdenden, Flächen der Hyperintensitäten, welche dem Nukleus

facialis und dem Nukleus hypoglossus entsprachen, nahmen im Verlauf der Erkrankung von Tag 80 bis Tag 120 signifikant zu (vgl. Abb.3-5 und Abb. 3-6). Die im MRT sichtbare Fläche der Hyperintensität, die dem Nukleus trigeminus entsprach, konnte erst ab Tag 100 bestimmt werden. Zwischen der Fläche im Alter von 100 und 120 Tagen wurden keine Unterschiede gefunden (vgl. Abb. 3-7). Die Flächen der Kerne in den Aufnahmen der Wildtyp-Tiere konnten nicht bestimmt werden, da sich die Kerne nicht vom umliegenden Gewebe abhoben. Bisher wurde noch keine Flächenzunahme der Hyperintensitäten im Hirnstamm beschrieben. Da angenommen wird, dass die Hyperintensitäten durch eine Vakuolisierung zustande kommen, wird die Flächenzunahme der Hyperintensitäten wahrscheinlich durch eine Ausbreitung der Vakuolen im Verlauf der Erkrankung verursacht. Dies wird im folgenden Kapitel noch diskutiert.

4.2 Morphologische Korrelate der MRT-Signalveränderung

In den motorischen Hirnstammkernen habe ich eine fortschreitende Vakuolisierung bei den transgenen G93A-SOD1 Mäusen festgestellt (vgl. Abb. 3-8, Abb.3-10 und Abb. 3-12). Die ersten Vakuolen traten bereits in der präklinischen Phase im Alter von 80 Tagen nach Geburt auf und die Vakuolenanzahl nahm ab diesem Zeitpunkt in allen drei Kernen signifikant zu (vgl. Abb.3-9, Abb. 3-11 und Abb. 3-13). Im Alter von 120 Tagen war die gesamte Fläche der Kerne mit Vakuolen angefüllt. Im Gegensatz dazu wurden bei keiner der Wildtyp-Mäuse Vakuolen gefunden. Es waren zwar Vakuolen-ähnliche Strukturen erkennbar, dabei handelte es sich allerdings im Artefakte, welche durch die interkardiale Perfusion der Tiere zustande kamen. Vakuolen konnten im G93A-SOD1 Mausmodell für ALS bereits im Vorderhorn des Rückenmarks (Bendotti et al., 2001; Chiu et al., 1995; Dal Canto und Gurney, 1995; Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001; Kirkinezos et al., 2005; Kong und Xu, 1998; Wong et al., 1995), aber auch im Hirnstamm (Chiu et al., 1995; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001; Sumi et al., 2006) vor dem Auftreten der ersten Symptome nachgewiesen werden (Higgins et al, 2003; Kong und Xu, 1998; Wong et al., 1995). Bei diesen Vakuolen handelt es sich um degenerierte Mitochondrien (Bendotti et al., 2001; Higgins et al., 2003; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001; Sumi et al., 2006). Durch die

mutierte SOD1 wird der Intermembranenraum der Mitochondrien aufgebläht und führt zu einem Anschwellen der Mitochondrien (Bendotti et al., 2001). Dies führt zu einem Absterben der Mitochondrien und damit zu einer Schädigung der Motoneurone, was letztendlich in einer Motoneurondegeneration endet. Dem Anschwellen geht eine Aggregation (Jaarsma et al., 2001; Liu et al., 2004) des normalerweise zytoplasmatischen Proteins SOD1 im Intermembranenraum der Mitochondrien voraus. Dies ist wahrscheinlich der Auslöser der mitochondrialen Degeneration (Jaarsma et al., 2001). Der Mechanismus, welcher zur Aufnahme der SOD1 durch die äußere Mitochondrienmembran führt, ist noch nicht bekannt, allerdings wird eine veränderte Permeabilität der Außenmembran angenommen (Bendotti et al., 2001; Jaarsma et al., 2001; Higgins et al., 2003), welche eine Aufnahme der mutierten SOD1 vermutlich durch spannungsabhängige Ionenkanäle möglich macht. Die SOD1-Aufnahme dient wahrscheinlich dazu, den kolloidosmotischen Druck der Mitochondrien, welcher hauptsächlich durch Proteine bestimmt wird, während der Ausdehnung aufrecht zu erhalten (Jaarsma et al., 2001). Wie die mutierte SOD1 die Funktion der Mitochondrien beeinflusst, ist bisher noch unklar. Allerdings konnte eine veränderte mitochondriale Proteinzusammensetzung in Mitochondrienpopulationen, die aus G93A-SOD1 transfizierten Zellen isoliert wurden, festgestellt werden (Fukada et al., 2004; Kirby et al., 2005; Lukas et al., 2006). Zudem wird angenommen, dass durch das Anschwellen der Mitochondrienaußenmembran deren Permeabilität verändert wird. Dies könnte durch eine Aktivierung der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitionspore (MPTP) verursacht werden. Die MPTP ist ein spannungsabhängiger Kationen-Kanal, welcher durch Depolarisation, Kalzium-Akkumulation in der Matrix oder durch reactive oxygen species (ROS) geöffnet wird (Miller, 1998). Es wurde bereits nachgewiesen, dass die G93A-SOD1 das Membranpotential und die Depolarisation der mitochondrialen Membranen, sowie den zytosolischen Ca^{2+}-Pegel verändert (Carri et al., 1997). Zusammen mit einer geringeren Konzentrationen von EAAT2, die bei ALS-Patienten bereits festgestellt wurde (Flowers et al., 2001; Ginsberg et al., 1995; Meyer et al., 1998; Meyer et al., 1999; Münch et al., 2000; Münch et al., 2002), könnte es zu einer verminderten Entfernung von Glutamat aus dem synaptischen Spalt und einem erhöhten Ca^{2+}-Einstrom in die Motoneuronen kommen. Durch eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration kommt es anschließend zu einer Aktivierung der MPTP und zu

einem Ca^{2+}-Einstrom in die Mitochondrien. Im Anschluss wird Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytoplasma freigesetzt, das über eine Signalkaskade Apoptose auslöst (Bendotti et al., 2001). Aus diesem Grund scheint ein Zusammenhang zwischen Exzitotoxizität und mitochondrialer Degeneration bei der ALS zu bestehen, der zur Motoneurondegeneration führt (Bendotti et al., 2001; Boillee et al., 2006; Jaarsma et al., 2001).

In der G93A-SOD1 Maus sind Vakuolen bisher hauptsächlich in den Dendriten, aber auch vermehrt in den Axonen aber nicht im Zytoplasma der Motoneurone zu finden (Bendotti et al., 2001; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001). Auch in meiner Arbeit scheinen die Vakuolen mehr in den Dendriten und Axonen und nicht im Zytoplasma der Motoneurone lokalisiert zu sein. Dies wird deutlich, da die Vakuolen in den Hämatoxilin und Eosin- gefärbten Gehirnschnitten nicht im Soma der Motoneurone, sondern im umliegenden Gewebe zu finden sind (Abb. 3-8, Abb.3-10, Abb. 3-12). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Dendriten und Axone im Vergleich zum Soma eine höhere Aktivität aufgrund von Aufnahme bzw. Weiterleitung von Aktionspotentialen zeigen (Wong-Riley et al., 1998). Außerdem ist die Reparatur oder Beseitigung von mitochondrialen Schädigungen in Dendriten und Axonen durch die Entfernung zum Zellsoma, wo die gesamten zellulären Synthetisierungsprozesse ablaufen, weniger effizient (Jaarsma et al., 2001).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Vakuolen zeitgleich mit einem signifikanten Anstieg der T_2-Relaxationszeit in den motorischen Hirnstammnuklei der G93A-SOD1 Mäuse am Tag 80 nach Geburt auftraten. Zudem nahmen die Vakuolenanzahl und die T_2-Relaxationszeit in allen drei Hirnstammkernen der transgenen Tiere, sowie die Flächen der Hyperintensitäten im Verlauf der Erkrankung zu. Somit kann angenommen werden, dass die beiden Parameter Vakuolenanzahl und T_2-Relaxationszeit miteinander korrelieren und die Erhöhung der T_2-Werte durch flüssigkeitsgefüllte Vakuolen verursacht wird (Angenstein et al., 2004; Nießen et al., 2006).

Im Gegensatz zum Vorderhorn des Rückenmarks (Chiu et al,. 1995; Guo et al., 2003; Kaspar et al., 2003; Sharp et al., 2005) konnte in der vorliegenden Arbeit bis zum Alter von 120 Tagen keine Verlust von Motoneuronen im Nukleus facialis,

Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus der G93A-SOD1 Maus festgestellt werden (Chiu et al., 1995). Die Mäuse befinden sich in diesem Alter bereits im Endstadium der Erkrankung. Dem Alter von 120 Tagen im Mausmodell entspricht bei ALS-Patienten ein sehr fortgeschrittenes Stadium der Erkrankung, in dem bereits sehr viele Muskelpartien gelähmt sind. Die Vakuolisierung ist ein langsamer Prozess (Bendotti et al., 2001; Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001). und beginnt im Vorderhorn des Rückenmarks schon im Alter von 14 Tagen, lange bevor es dort zum Absterben der Motoneurone und zum Auftreten von Verhaltenssymptome im Alter von 90 Tagen kommt (Bendotti et al., 2001). Im Hirnstamm waren um den Tag 80 nach der Geburt die ersten Vakuolen nachweisbar (vgl. Abb. 3-8. Abb. 3-10 und Abb. 3-12). Da es im Rückenmark mehr als 70 Tage bis es zum Absterben von Motoneuronen dauert, ist anzunehmen, dass die Vakuolisierung im Hirnstamm bis zum Tag 120 noch nicht zum Absterben der Motoneurone, aber zu einer Schädigung der Motoneurone geführt hat. Allerdings war die Anzahl der Motoneurone in allen drei Kernen der transgenen Mäuse zu jedem Untersuchungszeitpunkt signifikant geringer im Vergleich zu der Anzahl bei den Wildtyp-Mäusen (vgl. Abb. 3-14, Abb. 3-15 und Abb. 3-16). Da die verminderte Anzahl der Motoneurone bereits in einem frühen Alter von 40 Tagen auftritt, kann davon ausgegangen werden, dass dies zum Phänotyp der G93A-SOD1 Maus gehört. Es ist auch ein embryonaler Motoneuronverlust denkbar, der eventuell mit der Geburt stoppt. Zur Klärung dieses Befunds sind noch weitere Experimente notwendig. So sollte die Motoneuronanzahl im Hirnstamm der transgenen Tiere auch im Zeitraum zwischen der Geburt und Tag 40 und in verschiedenen Embryonalstadien bestimmt werden.

Ein Vergleich der Motoneuronenzahlen mit der T_2-Relaxationszeit zeigt, dass keine Korrelation der beiden Parameter besteht. Damit werden die im MRT sichtbaren Veränderungen nicht durch einen Motoneuronverlust sondern durch eine Schädigung von Motoneuronen durch Vakuolisierung ausgelöst.

4.3 Einfluss der morphologischen Veränderungen auf die periphere Muskulatur

Durch den Untergang des ersten und zweiten Motoneurons können bei ALS-Patienten neben einer Schwächung und Atrophie der Muskulatur auch Faszikulationen (Zuckungen) und Reflexabnormalitäten beobachtet werden (Rowland und Shneider, 2001). Die ersten Symptome treten entweder in der äußeren Extremitätenmuskulatur (spinale ALS) oder im Kopf- und Halsbereich (bulbäre ALS) auf. Das Auftreten von bulbären Symptomen ist bei der ALS mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (Rosen, 1978). Im G93A-SOD1 Mausmodell sind bisher hauptsächlich spinale Symptome beschrieben. So nimmt der Muskelfaserdurchmesser in der Hinterbeinmuskulatur im Verlauf der Erkrankung ab (Dobrowolny et al., 2005; Schütz et al., 2005), wodurch auch die Muskelkraft beeinträchtigt ist (Kieran et al., 2005). Über eine bulbäre Symptomatik bei der G93A-SOD1 Maus ist nur sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb der Einfluss der im MRT messbaren Veränderungen im Nukleus hypoglossus auf die Zunge, die von Nukleus hypoglossus innerviert wird, untersucht und der Muskelfaserdurchmesser bestimmt. Dieser änderte sich bei den transgenen Tieren im Verlaufe der Erkrankung nicht. Es wurde nur gezeigt, dass die transgenen Tiere einen signifikant geringeren Durchmesser im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen aufweisen (vgl. Abb. 3-18, Abb. 3-19 und Abb. 3-20). Da im Nukleus hypoglossus der transgenen Tiere kein Motoneuronverlust festgestellt werden konnte, lässt sich erklären, dass der Muskelfaserdurchmesser in der Zunge im Verlaufe der Erkrankung nicht abnimmt. Allerdings wurden in den Zungenmuskelschnitten einige eckig-elongierte Muskelfasern gefunden (vgl. Abb. 3-17A). Sie traten schon in einem sehr frühen Alter auf, nahmen aber nicht altersabhängig zu. Eckig-elongierte Muskelfasern sind normalerweise ein Zeichen für eine Schädigung des innervierenden Motoneurons (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Li et al., 2007). Da keine Motoneurondegeneration im Nukleus hypoglossus festgestellt werden konnte, könnte es sein, dass die synaptische Übertragung an der motorischen Endplatte vom Motoneuron auf die Muskelzelle geschädigt ist und es somit zu einer Denervierung kommt, was letztendlich zu einer Formveränderung von Muskelfasern führt. Beim Prozess der Denervierung könnte die Vakuolisierung in den Dendriten und Axonen (Bendotti et al., 2001;

Jaarsma et al., 2000; Jaarsma et al., 2001) eine wichtige Rolle spielen. Die Vakuolen stellen degenerierende Mitochondrien dar. Die Mitochondrien sind für die Energieversorgung in der Zelle notwendig. Eine mitochondriale Schädigung beeinflusst dadurch auch die Neurotransmission an der neuromuskulären Endplatte aufgrund mangelnder Transmitterausschüttung aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt, was schließlich zu einer Denervierung führt (Fischer et al., 2004; Frey et al., 2000; Li et al., 2007).
Smittkamp et al. (2008) zeigten bisher als einzige, dass die Zungenbeweglichkeit bei den transgenen Tieren beeinträchtig und eine Muskelkraftverringerung ab dem Alter von 115 Tagen messbar ist. Es wäre damit möglich, dass es zu einer Entwicklung von bulbären Symptomen bei der G93A-SOD1 Maus kommt. Diese treten wahrscheinlich später als die spinalen Symptome auf und werden aufgrund des Todes der Tiere im Alter von etwa 130 Tagen (Heiman-Patterson et al., 2005) nicht richtig ausgeprägt.

Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen der Motoneuronanzahl in den motorischen Hirnstammkernen steht ein relativ früh beginnender Motoneuronverlust im Vorderhorn im Alter von 90 Tagen (Chiu et al.,. 1995; Guo et al., 2003; Kaspar et al., 2003; Sharp et al., 2005), welcher auch zu Muskelatrophie der Hinterbeine (Dobrowolny et al., 2005; Schütz et al., 2005) und letztendlich zu einer Lähmung in diesem Bereich führt. Die Motoneurondegeneration im Rückenmark und die damit verbundenen Symptome könnten in diesem Mausmodell so schwerwiegend sein, dass die Tiere sterben, bevor sie bulbäre Symptome zeigen. Auch beim Menschen wird in 75% aller ALS-Fälle zuerst eine primär spinale Form der Erkrankung beobachtet, der erst später eine bulbäre Symptomatik folgt (Ludolph, 2000). Dies könnte auch bei der G93A-SOD1 Maus zutreffen.

Ein Vergleich der histologischen Daten der Zungenmuskulatur mit den Ergebnissen der MRT zeigt, dass die Parameter T_2-Relaxationszeit im Nukleus hypoglossus (vgl. Abb. 3-3) und der Muskelfaserdurchmesser der Zunge (vgl. Abb. 3-18, Abb. 3-19 und Abb. 3-20) nicht direkt miteinander korrelieren. Die im MRT messbaren Veränderungen des Hirnstamms, d.h. die Vakuolisierung, führt zu keinem Verlust der Motoneurone in den Hirnstammkernen und damit auch zu

keiner Muskelatrophie bei den transgenen Tieren bis zum Alter von 120 Tagen nach Geburt. Die signifikant geringeren Durchmesser der Muskelzellen bei den G93A-SOD1 Mäusen könnten zum Phänotyp dieser Mäuse gehören, was aber noch durch weitere Experimente geklärt werden muss. Ebenso sind weiterführende Experimente notwendig, die klären können, wie genau sich die Vakuolisierung der Hirnstammkerne auf die Funktion der peripheren Muskulatur auswirkt.

4.4 Beeinflussung des MRT-Signals durch Vitamin E

Oxidativer Stress scheint im Vulnerabilitätsmuster der ALS eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird angenommen, dass die mutierte SOD1 eine unbekannte toxische Funktion dazugewinnt (gain-of-function), welche den oxidativen Stress auf die Zelle erhöht. Antioxidantien werden deshalb in der ALS als Therapieansatz diskutiert, um dem oxidativen Stress in den Motoneuronen entgegenzuwirken. Vitamin E ist eines dieser Antioxidantien. Es wirkt der Lipidperoxidation durch Sauerstoffradikale entgegen (McCay, 1985). Durch Studien beim Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass die Einnahme von Vitamin E das Risiko, an ALS zu erkranken, erniedrigt (Ascherio et al., 2005; Veldink et al., 2007). Andere Studien dagegen zeigten nur einen geringen oder keinen Effekt bei einer Vitamin E-Einnahme (Desnuelle et al., 2001; Kwiecinski et al., 2001; Longnecker et al., 2000; Nelson et al., 2000; Pioro, 2000). Allerdings könnte in vielen Fällen die Dosierung von Vitamin E zu niedrig gewesen sein, um dem erhöhten Pegel an freien Radikalen bei ALS-Patienten entgegenzuwirken (McGeer und McGeer, 2005).

In dieser Arbeit wurden transgene G93A-SOD1 Mäuse mit speziellem Futter, welches eine hohe Dosis Vitamin E enthielt, gefüttert und der Einfluss auf die T_2-Relaxationszeiten in den Hirnstammkernen untersucht. Durch die Gabe von Vitamin E konnte das Auftauchen des Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus in den RARE Aufnahmen der transgenen Mäuse nicht verzögert werden. Der Vergleich mit den unbehandelten transgenen Mäusen

zeigte aber einen signifikant geringeren Anstieg der T_2-Relaxationszeiten in allen drei untersuchten Hirnstammkernen durch die Behandlung mit Vitamin E (vgl. Abb. 3-25, Abb. 3-26 und Abb. 3-27). Damit wurde die altersabhängige Progression der T_2-Relaxationszeit bei den behandelten Tieren verlangsamt. Da die T_2-Werte mit der Anzahl der Vakuolen korrespondieren, kann angenommen, werden, dass durch die Gabe von Vitamin E die Entstehung von Vakuolen in den Hirnstammkernen und damit die Progression der Erkrankung der transgenen Mäuse verlangsamt wurde, was aber durch weitere Untersuchungen noch überprüft werden muss. Im G93A-SOD1 Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Vitamin E das Einsetzen der klinischen Symptome und die Progression der Erkrankung verlangsamt. Das Überleben der Tiere wurde aber nicht verlängert (Gurney et al., 1996). Diese Tiere wurden mit einer geringeren Menge Vitamin E behandelt. So enthielt das Futter in dieser Studie nur 134 mg/kg Vitamin E. Ob das Einsetzen der Symptome und das Überleben durch die höhere Dosis Vitamin E beeinflusst wurde, wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Hier sind noch Verhaltenstests wie z.B. Laufraduntersuchungen zur Klärung notwendig. Die Menge von 450 mg/kg Futter, die ich in meiner Arbeit verwendet habe, dürfte bei einer Gabe über einen längeren Zeitraum nicht toxisch für die Mäuse sein. Die Firma Heyl (Berlin) gibt an, dass Vitamin E in Dosen von 0,5 bis 1,0 g/Tag über mehrere Wochen keine toxischen Effekte bei Mäusen und Ratten erzeugt. Über die toxische Wirkung von Vitamin E in hohen Dosen beim Menschen gibt es nur sehr wenige Informationen. Allerdings dürften die in dieser Arbeit verwendeten Mengen beim Menschen zu keiner Schädigung führen. So wurde schon eine Studie am Menschen durchgeführt bei der täglich 5000 mg Vitamin E pro Tag über 18 Monate verabreicht wurde (Graf et al., 2005).

Durch die Behandlung der G93A-SOD1 Mäuse mit Vitamin E konnten die T_2-Werte in den motorischen Hirnstammkernen positiv beeinflusst werden. Die T_2-Relaxationszeit in den motorischen Hirnstammkernen kann somit als Biomarker für die Progression der Erkrankung im transgenen G93A-SOD1 Mausmodell der ALS angesehen und zur Quantifizierung bei experimentellen Therapieansätzen herangezogen werden.

4.5 Veränderungen des MR-Spektrums im Hirnstamm

Neben der MRT steht mit der MRS ebenfalls eine nicht-invasive Methode zur Verfügung, mit der Stoffwechselvorgänge im Körper *in-vivo* untersucht werden können. Auf der Suche nach möglichen Biomarkern, mit denen die Progression der ALS verfolgt werden kann, wurden ALS-Patienten auch mit MRS untersucht. Verschiedene Studien haben dabei gezeigt, dass die Konzentration von N-Acetylaspartat (Suhy et al., 2002), gemessen über das Verhältnis N-Acetylaspartat/Kreatin (Abe et al., 2001) oder das Verhältnis N-Acetylaspartat/Cholin (Block et al., 1998), im Motorkortex reduziert ist. Auch im G93A-SOD1 Mausmodell wurde ein N-Acetylaspartat-Verlust im Rückenmark bereits im Alter von 34 Tagen nach der Geburt bei *in-vitro* Untersuchungen nachgewiesen (Nießen et al., 2007). Veränderungen im der Glutamin- und GABA-Konzentration wurden im Alter von 75 Tagen gefunden. Die Konzentrationen dieser drei Metaboliten sind ab dem Tag 75 nach der Geburt auch im Hirnstamm reduziert (Nießen et al., 2007). In meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass sich Veränderungen in der Konzentration verschiedener Metabolite im Hirnstamm von transgenen G93A-SOD1 Mäusen mittels H^1-MRS auch *in-vivo* nachweisen lassen. Dabei wurden ein signifikanter Verlust von N-Acetylaspartat und Laktat, sowie ein Anstieg der Glutaminkonzentration im Alter von 120 Tagen nach der Geburt im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt (vgl. Abb. 3-32). Im Cerebellum der transgenen Mäuse wurde eine erhöhte Inositolkonzentration gefunden (vgl. Abb. 3-33). Die Konzentrationen der anderen Metabolite im Hirnstamm und Cerebellum unterschieden sich nicht.

In-vitro wurde bereits ein N-Acetylaspartat-Verlust im Hirnstamm der transgenen Mäuse beschrieben (Nießen et al., 2007). Ich konnte diesen Verlust nun auch *in-vivo* nachweisen. Ein N-Acetylaspartat-Verlust wird oft mit einer Neurodegeneration (Nießen et al., 2007) verbunden. Die N-Acetylaspartat-Synthese ist mit dem mitochondrialen Energiemetabolismus verbunden, so dass Veränderungen in der N-Acetylaspartat-Konzentration vermutlich auch die mitochondriale Integrität reflektiert (Clark, 1998; Vielhaber et al., 2001). Dies steht auch im Einklang mit postmortem Studien an ALS-Patienten. Dort wurde ein N-Acetylaspartat-Verlust im Rückenmark (Plaitakis und Constantakakis, 1993; Rothstein et al., 1990) gefunden.

Die Laktatkonzentration ist verbunden mit der neuronalen Aktivität im Gehirn. Er steigt zum Beispiel bei visueller Stimulation an und spielt eine wichtige Rolle im Energiemetabolismus (Maddock et al., 2006). Eine geringere Laktatkonzentration im Gehirn konnte bei ALS-Patienten oder G93A-SOD1 Mäusen bisher noch nicht beobachtet werden. Die Kapazität der Mitochondrien ist entscheidend für die Laktatproduktion (Spriet et al., 2000). Da die Mitochondrien im G93A-SOD1 Mausmodell geschädigt sind, könnte auch die Laktatproduktion im Gehirn erniedrigt sein und damit die Laktatkonzentration im neuronalen Gewebe sinken.

In der vorliegenden Arbeit war die Glutaminkonzentration im Hirnstamm der transgenen Tiere im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (vgl. Abb. 3-32). Dies steht im Gegensatz zu einer erniedrigten Glutaminkonzentration im Hirnstamm, welche *in-vitro* bei den G93A-SOD1 Mäusen gefunden wurde (Nießen et al., 2007). Die Glutamin-Synthetase ist ein Schlüsselenzym in der glutamatergen Neurotransmission (Daikhin und Yudkoff, 2000). Nach der Aufnahme des Glutamats aus dem synaptischen Spalt in die angrenzenden Astrozyten wandelt das Enzym Glutamin-Synthetase Glutamat in Glutamin um, welches dann wiederum in die präsynaptische Endigung transportiert wird. Es wurde bereits berichtet, dass die Glutamin-Synthetase sensitiv auf oxidativen Stress reagiert (Amici et al., 1989; Oliver et al., 1990). Im G93A-SOD1 Mausmodell gibt es einige Hinweise, dass oxidativer Stress bei der Pathogenität eine wichtige Rolle spielt (Gurney et al., 1996; Kostic et al., 1997). Da in dieser Arbeit Vitamin E-behandelte transgene Tiere mittels MRS untersucht wurden, könnte durch die Behandlung der oxidative Stress erniedrigt worden sein, so dass die Glutamin-Synthetase-Aktivität im Vergleich zu den unbehandelten transgenen Tieren aus den *in-vitro* Versuchen weniger beeinträchtigt war. Zur Klärung des Einflusses von Vitamin E auf die MRS-Ergebnisse sind noch weitere Experimente mit unbehandelten transgenen Mäusen notwenig.

Die Inositolkonzentration war im Cerebellum, aber nicht im Hirnstamm der transgenen Tiere erhöht. Eine erhöhte Inositolkonzentration wird mit entzündlichen Prozessen im Gehirn in Verbindung gebracht (Mader et al., 2008). So wurde bei MS-Patienten eine Erhöhung der Inositolkonzentration aufgrund von Astrogliose nachgewiesen (Mader et al., 2008). Auch im G93A-SOD1 Mausmodell ist eine Aktivierung von Astroglia nachweisbar (Li et al., 2007; Schütz et al., 2005). Allerdings wurde noch keine Astroglia-Aktivierung im Cerebellum gefunden. In

meiner Arbeit konnte ich nur vier MR-Spektren des Cerebellums von Wildtyp-Tieren auswerten. Bei einer Auswertung von mehr als vier MR-Spektren ist es durchaus denkbar, dass dieser Effekt relativiert wird und somit kein Unterschied in der Inositolkonzentration zwischen transgenen und Wildtyp-Mäusen vorhanden ist.
Durch die hier vorgestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Konzentrationsveränderungen einzelner Metabolite im Hirnstamm mittels ^{1}H-MRS zumindest im Alter von 120 Tagen auch *in-vivo* quantifiziert werden können. Wie sensitiv die Methode zu einem früheren Zeitpunkt oder vor der Erkrankung ist, muss noch durch eine Verlaufsstudie geklärt werden. Der N-Acetylaspartat-Peak in den MR-Spektren ist allerdings sehr deutlich. Aus diesem Grund ist es durchaus denkbar, dass bereits geringe Konzentrationsänderungen im Hirnstamm der transgenen Tiere in der präklinischen Phase mit der MRS-Methode messbar sind. Da ein N-Acetylaspartat-Verlust im Gehirn des Mausmodells als auch bei ALS-Patienten gefunden wurde, könnte die N-Acetylaspartat-Konzentration als Marker für die ALS dienen.

5 Zusammenfassung

Die Amyotrophe Lateralsklerose 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 auch eine vererbbare familiäre Form der ALS (fALS), welche bei etwa 10% der ALS-Patienten vorliegt. Etwa 15 bis 20% dieser fALS-Fälle sind mit Mutationen im Gen des Enzyms Cu/Zn-Superoxid-Dismutase 1 (SOD1) assoziiert. Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung von Superoxid-Radikalen in nicht-toxische Stoffwechselprodukte und dient so in der Zelle als Radikalfänger.

Auf der Grundlage der mutierten SOD1 wurde 1994 eine transgene Maus entwickelt, welche das humane Enzym mit einer G93A-Mutation überexprimiert. Diese Tiere entwickeln eine, der menschlichen sehr ähnliche, Symptomatik einer selektiven Motoneurondegeneration. Heutzutage dient diese Maus als bewährtes Tiermodell, um die molekularen, aber auch die funktionellen Mechanismen der Erkrankung und den Verlauf der Erkrankung zu studieren und aufzuklären.

Die Progression der Erkrankung wird im Mausmodell hauptsächlich mit histologischen und immunhistochemischen Methoden untersucht. Durch diese Methoden besteht nur die Möglichkeit einer einmaligen Untersuchung. Aus diesem Grund werden *in-vivo* Methoden, mit welchen der Verlauf der Erkrankung über einen längeren Zeitraum am selben Tier verfolgt werden kann, benötigt. Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) steht eine solche Methode zu Verfügung. T_2-gewichtete MRT-Untersuchungen des Hirnstamms transgener G93A-SOD1 Mäuse haben bereits gezeigt, dass dort Veränderungen detektiert werden können. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit der Frage nachgegangen, ob eine Progression der Erkrankung im Hirnstamm bei transgenen G93A-SOD1 Mäusen mittels MRT dargestellt und quantifiziert werden kann.

Ich konnte in meiner Arbeit zeigen, dass sich die motorischen Hirnstammkerne Nukleus facialis, Nukleus hypoglossus und Nukleus trigeminus als Hyperintensitäten bei den G93A-SOD1 Mäusen im T_2-gewichteten MRT vom umliegenden Gewebe abheben. Wobei der Nukleus facialis und der Nukleus hypoglossus bereits im Alter von 80 Tagen, also in der präklinischen Phase der Erkrankung, in den MRT-Aufnahmen zu erkennen waren. Zudem nahm die

transversale Relaxationszeit in allen drei Kernen im Verlaufe der Erkrankung zu. Ich konnte außerdem zum ersten Mal zeigen, dass der Anstieg der transversalen Relaxationszeit mit einer Vakuolisierung einhergeht. Die Vakuolen können deshalb als morphologische Grundlage für die detektierten MRT-Signal Änderungen angenommen werden. Die detektierbaren MRT-Veränderungen können nicht mit einer Degeneration der Motoneurone gleichgesetzt werden, da bei den transgenen Tieren kein progressiver Verlust gefunden wurde. Durch eine Untersuchung der Zungenmuskulatur, welche durch den Nukleus hypoglossus innerviert wird, konnte ich zeigen, dass es nur einen minimalen Einfluss der Veränderungen im Hirnstamm auf die periphere Muskulatur, gibt.

Ich konnte außerdem, durch einen experimentellen Therapieversuch mit dem Antioxidant Vitamin E, zeigen, dass die transversale Relaxationszeit der Hirnstammkerne bei den transgenen Mäusen beeinflusst werden kann. Durch die Behandlung ergab sich ein signifikant geringerer Anstieg der T_2 Relaxationszeit im Verlauf der Erkrankung beim transgenen Mausmodell.

Die Magnetresonanzspektroskopie (MRS) des Hirnstamms der G93A-SOD1 Maus ergab Konzentrationänderungen bei verschiedenen Metaboliten. Die Ergebnisse zeigen eine signifikant reduzierte Konzentration von N-Acetylaspartat und Laktat und eine höhere Glutaminkonzentration bei den transgenen Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Damit können auch mit der MRS Veränderungen bei den G93A-SOD1 Mäusen *in-vivo* detektiert werden.

Meine Ergebnisse beweisen, dass die T_2 Relaxationszeit in den motorischen Hirnstammkernen als Biomarker für den Verlauf der Erkrankung im G93A-SOD1 Mausmodell verwendet werden kann. Dies ermöglicht in Zukunft den Erfolg eines Therapieversuchs im Mausmodell bereits *in-vivo* beurteilen zu können, ohne auf Methoden wie die Histologie oder Immunhistochemie zurückgreifen zu müssen, die einen Verlust der Maus zur Folge haben. Aber auch die mit *in-vivo* MRS messbaren Änderungen von Metabolitenkonzentrationen bieten die Möglichkeit einen Biomarker für den Verlauf der Erkrankung zu entwickeln. Damit können meine Ergebnisse dazu beitragen einen möglichen Biomarker, mit dem die ALS beim Menschen diagnostiziert werden kann, zu identifizieren.

6 Abstract

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive, neurodegenerative disease caused by a selective loss of upper and lower motorneurons. While approximately 90% of all ALS cases are sporadic (sALS), 10% are familial ALS (fALS) and linked to an autosomal dominantly inherited mutation. Furthermore, in about 15–20% of those fALS cases, a mutation in the Cu/Zn superoxide dismutase 1 (SOD1) gene has been found. This enzyme neutralizes radicals in the cell, while converting superoxide-radicals into non-toxic product.

Hence, to study the pathogenesis of the disease, a transgenic mouse model with a G93A-SOD1 mutation was developed, where the clinical and neuropathological symptoms are similar to a human selective anterior horn cell degeneration. This animal model is used to evaluate the molecular and functional mechanisms underlying the disease mostly by histological and immunohistochemical methods. Due to this methods every animal can be analysed once. Therefore *in-vivo* methods to study the progression of the disease in a single animal during a longer period are required. Magnetic resonance imaging (MRI) provides such a method. T_2-weighted MRI of transgenic G93A-SOD1 mice already revealed alterations in the brainstem. I applied MRI to evaluate the progression of the disease in the brainstem of the G93A-SOD1 mouse model.

In the brainstem of G93A-SOD1 mice the facial, hypoglossal and trigeminal nuclei were identified as hyperintensities. The T_2 values of these nuclei were significantly increased, as early as the age of 80 days, i.e. before the average disease onset at the age of about 90 days. This increase is associated with a progressive development of vacuoles in the brainstem motor nuclei but not with a loss of motorneurons. Moreover, the tonge musculature, which is innervated by the hypoglossal nucleus, is just slightly affected by the detectable morphological changes.

An antioxidant treatment with vitamin E influenced the T_2 relaxation time in the motor brainstem nuclei. T_2-weighted MRI of vitamin E-treated transgenic mice revealed a significant decreased T_2 relaxation time in the facial, trigeminal and hypoglossal nucleus in comparison with the untreated transgenic mice.

Magnetic resonance spectroscopy (MRS) also exhibited changes in the concentration of different metabolites in the brainstem. The MRS results

indicated a significantly decreased level of N-acetyl aspartate and lactate but also a significantly increased level of glutamine in the brainstem of the G93A-SOD1 mice *in-vivo*.

My results evaluate the T_2 relaxation time in the motor brainstem nuclei as *in-vivo* biomarker for the quantitative assessment of disease progression in the G93A-SOD1 mouse model during experimental drug therapy. In addition the metabolic changes detectable in the brainstem of G93A-SOD1 mice possibly enable the development of a biomarker. The results presented in this work hopefully will contribute to identify a biomarker for ALS diagnosis in humans.

7 Literaturverzeichnis

Abe K, Fujimura H, Kobayashi Y, Fujita N, Yanagihara T (1997) Degeneration of the pyramidal tracts in patients with amyotrophic lateral sclerosis. A premortem and postmortem magnetic resonance imaging study. J Neuroimaging 7(4): 208-212.

Abe K, Takanashi M, Watanabe Y, Tanaka H, Fujita N, Hirabuki N, Yanagihara T (2001) Decrease in N-acetylaspartate/creatine ratio in the motor area and the frontal lobe in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroradiology 43(7): 537-541.

Amici A, Levine RL, Tsai L, Stadtman ER (1989) Conversion of amino acid residues in proteins and amino acid homopolymers to carbonyl derivatives by metal-catalyzed oxidation reactions. J Biol Chem 264(6): 3341-3346.

Andersen PM (2000) Genetic factors in the early diagnosis of ALS. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1 Suppl 1: S31-S42

Andersen PM, Nilsson P, Ala-Hurula V, Keränen ML, Tarvainen I, Haltia T, Nilsson L, Binzer M, Forsgren L, Marklund SL (1995) Amyotrophic lateral sclerosis associated with homozygosity for an Asp90Ala mutation in CuZn-superoxide dismutase. Nat Genet 10(1): 61-66.

Angenstein F, Nießen HG, Goldschmidt J, Vielhaber S, Ludolph AC, Scheich H (2004) Age-dependent changes in MRI of motor brain stem nuclei in a mouse model of ALS. Neuroreport 15: 2271–2274.

Ascherio A, Weisskopf MG, O'Reilly EJ, Jacobs EJ, McCullough ML, Calle EE, Cudkowicz M, Thun MJ (2005) Vitamin E intake and risk of amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 57(1): 104-110.

Basak M, Erturk M, Oflazoglu B, Ozel A, Yildiz GB, Forta H (2002) Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. Acta Neurol Scand 105(5): 395-399.

Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH (1993) ALS, SOD and peroxynitrite. Nature 364: 584

Beckman JS, Chen J, Crow JP, Ye YZ (1994) Reactions of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite with superoxide dismutase in neurodegeneration. Prog Brain Res 103: 371-380.

Bendotti C, Calvaresi N, Chiveri L, Prelle A, Moggio M, Braga M, Silani V, De Biasi S (2001) Early vacuolization and mitochondrial damage in motor neurons of FALS mice are not associated with apoptosis or with changes in cytochrome oxidase histochemical reactivity. J Neurol Sci 191(1-2): 25-33.

Biscoe TJ, Straughan DW (1966) Micro-electrophoretic studies of neurones in the cat hippocampus. J Physiol 183(2): 341-359.

Bloch F, Hansen WW, Packard M (1946) Nuclear Induction. Phys Rev 69: 117.

Block W, Karitzky J, Träber F, Pohl C, Keller E, Mundegar RR, Lamerichs R, Rink H, Ries F, Schild HH, Jerusalem F (1998) Proton magnetic resonance spectroscopy of the primary motor cortex in patients with motor neuron disease: subgroup analysis and follow-up measurements. Arch Neurol 55(7): 931-936.

Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron 52(1): 39-59.

Borchelt DR, **Lee MK**, **Slunt HS**, **Guarnieri M**, **Xu ZS**, **Wong PC**, **Brown RH Jr**, **Price DL**, **Sisodia SS**, **Cleveland DW (1994)** Superoxide dismutase 1 with mutations linked to familial amyotrophic lateral sclerosis possesses significant activity. Proc Natl Acad Sci USA 91(17): 8292-8296.

Bossy-Wetzel E, Schwarzenbacher R, Lipton SA (2004) Molecular pathways to neurodegeneration. Nat Med 10 Suppl: S2-S9.

Bowling AC, **Barkowski EE**, **McKenna-Yasek D**, **Sapp P**, **Horvitz HR**, **Beal MF**, **Brown RH Jr (1995)** Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 64(5): 2366-2369.

Bowling AC, Schulz JB, Brown RH Jr, Beal MF (1993) Superoxide dismutase activity, oxidative damage, and mitochondrial energy metabolism in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 61(6): 2322-2325

Bradford HF, McIlwain H (1966) Ionic basis for the depolarization of cerebral tissues by excitatory acidic amino acids. J Neurochem 13(11): 1163-1177.

Bradley WG, Bowen BC, Pattany PM, Rotta F (1999) 1H-magnetic resonance spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Sci 169(1-2): 84-86.

Brown RH (1995) Superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis: models for gain of function. Curr Opin Neurobiol 5: 841–846.

Bruijn LI, **Houseweart MK**, **Kato S**, **Anderson KL**, **Anderson SD**, **Ohama E**, **Reaume AG**, **Scott RW**, **Cleveland DW (1998)** Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science 281(5384): 1851-1854.

Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. Annu Rev Neurosci 27: 723-749.

Caroscio JT, Mulvihill MN, Sterling R, Abrams B (1987) Amyotrophic lateral sclerosis. Its natural history. Neurol Clin 5: 1-8.

Carri MT, Ferri A, Battistoni A, Famhy L, Gabbianelli R, Poccia F, Rotilio G (1997) Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of

cytosolic Ca2+ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. FEBS Lett 414(2): 365-368.

Charcot JM, Joffroy A (1869) Deux cas d´atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antéro-latéraux de la moelle épinière. Arch Physiol Neurol Path 2: 744.

Cheung G, Gawel MJ, Cooper PW, Farb RI, Ang LC, Gawal MJ (1995) Amyotrophic lateral sclerosis: correlation of clinical and MR imaging findings. Radiology 194(1): 263-270.

Chiu AY, Zhai P, Dal Canto MC, Peters TM, Kwon YW, Prattis SM, Gurney ME (1995) Age-dependent penetrance of disease in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Mol Cell Neurosci 6(4): 349-362.

Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7(2): 369-379.

Clark JB (1998) N-acetyl aspartate: a marker for neuronal loss or mitochondrial dysfunction. Dev Neurosci 20(4-5): 271-276.

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillee S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ, Brown RH Jr, Julien JP, Goldstein LS, Cleveland DW (2003) Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science 302 (5642): 113-117.

Cleveland DW, Rothstein JD (2001) From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. Nat Rev Neurosci 2: 806–819.

Crow JP, Ye YZ, Strong M, Kirk M, Barnes S, Beckman JS (1997a) Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. J Neurochem 69(5): 1945-1953.

Crow JP, Sampson JB, Zhuang Y, Thompson JA, Beckman JS (1997b) Decreased zinc affinity of amyotrophic lateral sclerosis-associated superoxide dismutase mutants leads to enhanced catalysis of tyrosine nitration by peroxynitrite. J Neurochem 69(5): 1936-1944.

Daikhin Y, Yudkoff M (2000) Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. J Nutr 130(4S Suppl): 1026S-1031S.

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

Dal Canto MC, Gurney ME (1995) Neuropathological changes in two lines of mice carrying a transgene for mutant human Cu,Zn SOD, and in mice overexpressing wild type human SOD: a model of familial amyotrophic lateral sclerosis (FALS). Brain Res 676(1): 25-40.

Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, Warner C, Deng G, Soriano E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Hallewell RA, Pericakvance, MA, Siddique T (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. Science 261(5124): 1047-1051.

Desnuelle C, Dib M, Garrel C, Favier A (2001) A double-blind, placebo-controlled randomized clinical trial of alpha-tocopherol (vitamin E) in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. ALS riluzole-tocopherol Study Group. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 2(1): 9-18.

Dobrowolny G, Giacinti C, Pelosi L, Nicoletti C, Winn N, Barberi L, Molinaro M, Rosenthal N, Musaro A (2005) Muscle expression of a local Igf-1 isoform protects motor neurons in an ALS mouse model. J Cell Biol 168: 193–199.

Ellis CM, Simmons A, Andrews C, Dawson JM, Williams SC, Leigh PN (1998) A proton magnetic resonance spectroscopic study in ALS: correlation with clinical findings. Neurology 51(4): 1104-1109.

Ellis CM, Simmons A, Dawson JM, Williams SC, Leigh PN (1999a) Distinct hyperintense MRI signal changes in the corticospinal tracts of a patient with motor neuron disease. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1(1): 41-44.

Ellis CM, Simmons A, Jones DK, Bland J, Dawson JM, Horsfield MA, Williams SC, Leigh PN (1999b) Diffusion tensor MRI assesses corticospinal tract damage in ALS. Neurology 53(5): 1051-1058.

Ellis CM, Suckling J, Amaro E Jr, Bullmore ET, Simmons A, Williams SC, Leigh PN (2001) Volumetric analysis reveals corticospinal tract degeneration and extramotor involvement in ALS. Neurology 57(9): 1571-1578.

Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004) Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. Exp Neurol 185(2): 232-240.

Flowers JM, Powell JF, Leigh PN, Andersen P, Shaw CE (2001) Intron 7 retention and exon 9 skipping EAAT2 mRNA variants are not associated with amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 49(5): 643-649.

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(7): 2534-2542.

Fujita K, Yamauchi M, Shibayama K, Ando M, Honda M, Nagata Y (1996) Decreased cytochrome c oxidase activity but unchanged superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the spinal cords of patients with amyotrophic lateral sclerosis. J Neurosci Res 45(3): 276-281.

Fukada K, Zhang F, Vien A, Cashman NR, Zhu H (2004) Mitochondrial proteomic analysis of a cell line model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Mol Cell Proteomics 3(12): 1211-1223.

Gallassi R, Montagna P, Morreale A, Lorusso S, Tinuper P, Daidone R, Lugaresi E (1989) Neuropsychological, electroencephalogram and brain computed tomography findings in motor neuron disease. Eur Neurol 29(2): 115-120.

Gaudette M, Hirano M, Siddique T (2000) Current status of SOD1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1: 83-89

Ginsberg SD, Martin LJ, Rothstein JD (1995) Regional deafferentation down-regulates subtypes of glutamate transporter proteins. J Neurochem 65(6): 2800-2803.

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.

Goodin DS, Rowley HA, Olney RK (1988) Magnetic resonance imaging in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 23(4): 418-420.

Graf M, Ecker D, Horowski R, Kramer B, Riederer P, Gerlach M, Hager C, Ludolph AC, Becker G, Osterhage J, Jost WH, Schrank B, Stein C, Kostopulos P, Lubik S, Wekwerth K, Dengler R, Troeger M, Wuerz A, Hoge A, Schrader C, Schimke N, Krampfl K, Petri S, Zierz S, Eger K, Neudecker S, Traufeller K, Sievert M, Neundörfer B, Hecht M (2005) High dose vitamin E therapy in amyotrophic lateral sclerosis as add-on therapy to riluzole: results of a placebo-controlled double-blind study. J Neural Transm 112(5): 649-660.

Gredal O, Rosenbaum S, Topp S, Karlsborg M, Strange P, Werdelin L (1997) Quantification of brain metabolites in amyotrophic lateral sclerosis by localized proton magnetic resonance spectroscopy. Neurology 48(4): 878-881.

Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, Lin CL (2003) Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. Hum Mol Genet 12(19): 2519-2532.

Gurney ME (1997) The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. J Neuro Sci 152 (Suppl.1): S67–S73.

Gurney ME, Cutting FB, Zhai P, Doble A, Taylor CP, Andrus PK, Hall ED (1996) Benefit of vitamin E, riluzole, and gabapentin in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 39(2): 147-157.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, Chen WJ, Zhai P, Sufit RL, Siddique T (1994) Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu, Zn superoxide dismutase mutation. Science 264: 1772–1775.

Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH Jr, Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. Nat Genet 29(2): 166-173.

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.

Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schöneborn S, Schönling J, Zerres K, Wirth B (1995) Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. Hum Mol Genet 4(10): 1927-1933.

Hajnal JV, Bryant DJ, Kasuboski L, Pattany PM, De Coene B, Lewis PD, Pennock JM, Oatridge A, Young IR, Bydder GM (1992) Use of fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) pulse sequences in MRI of the brain. J Comput Assist Tomogr 16(6): 841-844.

Harris ED (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: a lesson in deficiency diseases. Nutr Rev 56: 81–84.

Hausser KH, Kalbitzer HR (1989) NMR für Mediziner und Biologen. Springer Verlag Berlin Heidelberg.

Hawkins SA, Nevin NC, Harding AE (1990) Pontobulbar palsy and neurosensory deafness (Brown-Vialetto-Van Laere syndrome) with possible autosomal dominant inheritance. J Med Gene 27(3): 176-179.

Heath PR, Shaw PJ (2002) Update on the glutamatergic neurotransmitter system and the role of excitotoxicity in amyotrophic lateral sclerosis. Muscle Nerve 26(4): 438-458.

Hecht MJ, Fellner F, Fellner C, Hilz MJ, Heuss D, Neundörfer B (2001) MRI-FLAIR images of the head show corticospinal tract alterations in ALS patients more frequently than T2-, T1- and proton-density-weighted images. J Neurol Sci 186(1-2): 37-44.

Hecht MJ, Fellner F, Fellner C, Hilz MJ, Neundörfer B, Heuss D (2002) Hyperintense and hypointense MRI signals of the precentral gyrus and corticospinal tract in ALS: a follow-up examination including FLAIR images. J Neurol Sci 199(1-2): 59-65.

Heiman-Patterson TD, Deitch JS, Blankenhorn EP, Erwin KL, Perreault MJ, Alexander BK, Byers N, Toman I, Alexander GM (2005) Background and gender effects on survival in the TgN (SOD1-G93A), 1Gur mouse model of ALS. J Neurosci 236: 1–7.

Hennig J, Nauerth A, Friedburg H (1986) RARE imaging: a fast imaging method for clinical MR. Magn Reson Med 3: 823–833.

Higgins CM, Jung C, Xu Z (2003) ALS-associated mutant SOD1G93A causes mitochondrial vacuolation by expansion of the intermembrane space and by involvement of SOD1 aggregation and peroxisomes. BMC Neurosci 4: 16.

Hilbush BS, Morrison JH, Young WG, Sutcliffe JG, Bloom FE (2005) New prospects and strategies for drug target discovery in neurodegenerative disorders. Neuro Rx 2(4): 627-637.

Ho YS, Gargano M, Cao J, Bronson RT, Heimler I, Hutz RJ (1998) Reduced fertility in female mice lacking copper-zinc superoxide dismutase. J Biol Chem 273(13): 7765-7769.

Hofmann E, Ochs G, Pelzl A, Warmuth-Metz M (1998) The corticospinal tract in amyotrophic lateral sclerosis: an MRI study. Neuroradiology 40(2): 71-75.

Imon Y, Yamaguchi S, Yamamura Y, Tsuji S, Kajima T, Ito K, Nakamura S (1995) Low intensity areas observed on T2-weighted magnetic resonance imaging of the cerebral cortex in various neurological diseases. J Neurol Sci 134 Suppl: 27-32.

Jaarsma D, Haasdijk ED, Grashorn JA, Hawkins R, van Duijn W, Verspaget HW, London J, Holstege JC (2000) Human Cu／Zn superoxide dismutase (SOD1) overexpression in mice causes mitochondrial vacuolization, axonal degeneration, and premature motorneuron death and accelerates motorneuron disease in mice expressing a familial amyotrophic lateral sclerosis mutant SOD1. Neurobiol Dis 7: 623–643.

Jaarsma D, Rognoni F, van Duijn W, Verspaget HW, Haasdijk ED, Holstege JC (2001) CuZn superoxide dismutase (SOD1) accumulates in vacuolated mitochondria in transgenic mice expressing amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutations. Acta Neuropathol 102(4): 293-305.

Kalra S, Arnold DL (2004) ALS surrogate markers. MRS. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord Suppl 1: 111-114.

Kalra S, Hanstock CC, Martin WR, Allen PS, Johnston WS (2006) Detection of cerebral degeneration in amyotrophic lateral sclerosis using high-field magnetic resonance spectroscopy. Arch Neurol 63(8): 1144-1148.

Kaspar BK, Llado J, Sherkat N, Rothstein JD, Gage FH (2003) Retrograde viral delivery of IGF-1 prolongs survival in a mouse ALS model. Science 301: 839–842.

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.

Kirby J, Halligan E, Baptista MJ, Allen S, Heath PR, Holden H, Barber SC, Loynes CA, Wood-Allum CA, Lunec J, Shaw PJ (2005) Mutant SOD1 alters the motor neuronal transcriptome: implications for familial ALS. Brain 128(Pt 7): 1686-1706.

Kirkinezos IG, Bacman SR, Hernandez D, Oca-Cossio J, Arias LJ, Perez-Pinzon MA, Bradley WG, Moraes CT (2005) Cytochrome c association with

the inner mitochondrial membrane is impaired in the CNS of G93A-SOD1 mice. J Neurosci 25(1): 164-172.

Kong J, Xu Z (1998) Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. J Neurosci 18: 3241–3250.

Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S (1997) Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 277(5325): 559-562.

Kumar A, Welti D, Ernst RR (1975) NMR Fourier zeugmatography. J Magn Reson 18(1): 69-83.

Kwiecinski H, Janik P, Jamrozik Z, Opuchlik A (2001) The effect of selegiline and vitamin E in the treatment of ALS: an open randomized clinical trials. Neurol Neurochir Pol 35(1 Suppl): 101-106.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Nat Genet 34(4): 383-394.

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

Li W, Brakefield D, Pan Y, Hunter D, Myckatyn TM, Parsadanian A (2007) Muscle-derived but not centrally derived transgene GDNF is neuroprotective in G93A-SOD1 mouse model of ALS. Exp Neurol 203(2): 457-471.

Lin CL, Bristol LA, Jin L, Dykes-Hoberg M, Crawford T, Clawson L, Rothstein JD (1998) Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. Neuron 20(3): 589-602.

Liu J, Lillo C, Jonsson PA, Vande Velde C, Ward CM, Miller TM, Subramaniam JR, Rothstein JD, Marklund S, Andersen PM, Brännström T, Gredal O, Wong PC, Williams DS, Cleveland DW (2004) Toxicity of familial ALS-linked SOD1 mutants from selective recruitment to spinal mitochondria. Neuron 43(1): 5-17.

Longnecker MP, Kamel F, Umbach DM, Munsat TL, Shefner JM, Lansdell LW, Sandler DP (2000) Dietary intake of calcium, magnesium and antioxidants in relation to risk of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroepidemiology 19(4): 210-216.

Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamat on the inner layers of the retina. Arch Ophtalmol 58: 193-204.

Ludolph AC (2000) Äthiologie und Pathogenese. In: Dengler R, Ludolph A, Zierz S. Amyotrophe Lateralsklerose. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag.

Lukas TJ, Luo WW, Mao H, Cole N, Siddique T (2006) Informatics-assisted protein profiling in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Mol Cell Proteomics 5(7): 1233-1244.

Maddock RJ, Buonocore MH, Lavoie SP, Copeland LE, Kile SJ, Richards AL, Ryan JM (2006) Brain lactate responses during visual stimulation in fasting and hyperglycemic subjects: a proton magnetic resonance spectroscopy study at 1.5 Tesla. Psychiatry Res 148(1): 47-54.

Mader I, Rauer S, Gall P, Klose U (2008) (1)H MR spectroscopy of inflammation, infection and ischemia of the brain. Eur J Radiol. 2008 Apr 11 [Epub ahead of print]

Mansfield P, Grannell PK (1973) NMR “diffraction” in solids? J Phys C 6: L422.

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(33): 29626-29633.

McCay PB (1985) Vitamin E: interactions with free radicals and ascorbate. Annu Rev Nutr 5: 323-340.

McGeer EG, McGeer PL (2005) Pharmacologic approaches to the treatment of amyotrophic lateral sclerosis. BioDrugs 19(1): 31-37.

McLennan H, Huffman RD, Marshall KC (1968) Patterns of excitation of thalamic neurones by amino-acids and by acetylcholine. Nature 219(5152): 387-388.

Megarbane A, Desguerres I, Rizkallah E, Delague V, Nabbout R, Barois A, Urtizberea A (2000) Brown-Vialetto-Van Laere syndrome in a large inbred Lebanese family: confirmation of autosomal recessive inheritance? Am J Med Gene. 92: 117-121.

Meldrum B, Garthwaite J (1990) Excitytory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. Trends Pharmacol Sci 11(9): 379-387.

Meyer T, Fromm A, Münch C, Schwalenstöcker B, Fray AE, Ince PG, Stamm S, Grön G, Ludolph AC, Shaw PJ (1999) The RNA of the glutamate transporter EAAT2 is variably spliced in amyotrophic lateral sclerosis and normal individuals. J Neurol Sci 170(1): 45-50.

Meyer T, Münch C, Knappenberger B, Liebau S, Völkel H, Ludolph AC (1998) Alternative splicing of the glutamate transporter EAAT2 (GLT-1). Neurosci Lett 241(1): 68-70.

Miller R (1998) Amyotrophic lateral sclerosis: where are we now? Int J Clin Pract Suppl 93: 3-5.

Miller RJ, Murphy SN, Glaum SR (1989) Neuronal Ca2+ channels and their regulation by excitatory amino acids. Ann NY Acad Sci 568: 149-158.

Miwa H, Kajimoto Y, Nakanishi I, Morita S, Komoto J, Kihira T, Kondo T (2003) T2-low signal intensity in the cortex in multiple system atrophy. J Neurol Sci 211(1-2): 85-88.

Münch C, Ebstein M, Seefried U, Zhu B, Stamm S, Landwehrmeyer GB, Ludolph AC, Schwalenstöcker B, Meyer T (2002) Alternative splicing of the 5'-sequences of the mouse EAAT2 glutamate transporter and expression in a transgenic model for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 82(3): 594-603.

Münch C, Schwalenstöcker B, Hermann C, Cirovic S, Stamm S, Ludolph A, Meyer T (2000) Differential RNA cleavage and polyadenylation of the glutamate transporter EAAT2 in the human brain. Brain Res Mol Brain Res 80(2): 244-251.

Mulder DW, Kurland LT, Offord KP, Beard CM (1986) Familial adult motor neuron disease: amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 36: 511–517.

Nelson LM, Matkin C, Longstreth WT Jr, McGuire V (2000) Population-based case-control study of amyotrophic lateral sclerosis in western Washington State. II. Diet. Am J Epidemiol 151(2): 164-173.

Nishimura AL, Al-Chalabi A, Zatz M (2005) A common founder for amyotrophic lateral sclerosis type 8 (ALS8) in the Brazilian population. Hum Genet 118(3-4): 499-500.

Nishimura AL, Mitne-Neto M, Silva HC, Richieri-Costa A, Middleton S, Cascio D, Kok F, Oliveira JR, Gillingwater T, Webb J, Skehel P, Zatz M (2004) A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset

spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. Am J Hum Genet 75(5): 822-831.

Nießen HG, Angenstein A, Sander K, Kunz WS, Teuchert M, Ludolph AC, Heinze H-J, Scheich H, Vielhaber S (2006) In vivo quantification of spinal and bulbar motor neuron degeneration in the G93A-SOD1 transgenic mouse model of ALS by T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient. Exp Neurol 201: 293–300.

Nießen HG, Debska-Vielhaber G, Sander K, Angenstein F, Ludolph AC, Hilfert L, Willker W, Leibfritz D, Heinze HJ, Kunz WS, Vielhaber S. (2007) Metabolic progression markers of neurodegeneration in the transgenic G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurosci 25: 1669–1677.

O`Brien RJ, Fischbach GD (1986) Modulation of embyonic chick motorneuron glutamate sensitivity by interneurons and agonists. J Neurosci 6(11): 3290-3296.

Oliver CN, Starke-Reed PE, Stadtman ER, Liu GJ, Carney JM, Floyd RA (1990) Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. Proc Natl Acad Sci USA 87(13): 5144-5147.

Paxinos G, Franklin KBJ (2000) The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edn. Academic Press, San Diego.

Peretti-Viton P, Azulay JP, Trefouret S, Brunel H, Daniel C, Viton JM, Flori A, Salazard B, Pouget J, Serratrice G, Salamon G (1999) MRI of the intracranial corticospinal tracts in amyotrophic and primary lateral sclerosis. Neuroradiology 41(10): 744-749.

Perry TL, Hansen S, Jones K (1987) Brain glutamate deficiency in amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 37(12): 1845-1848.

Phillis JW, **Horrocks LA**, **Farooqui AA (2006)** Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. Brain Res Rev 52(2): 201-243.

Pioro EP (2000) Antioxidant therapy in ALS. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 1 Suppl 4: 5-12; discussion 13-15.

Plaitakis A, Caroscio JT (1987) Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 22(5): 575-579.

Plaitakis A, Constantakakis E (1993) Altered metabolism of excitatory amino acids, N-acetyl-aspartate and N-acetyl-aspartyl-glutamate in amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res Bull 30(3-4): 381-386.

Pradhan S, Yadav R, Mishra VN, Aurangabadkar K, Sawlani V (2006) Amyotrophic lateral sclerosis with predominant pyramidal signs -- early diagnosis by magnetic resonance imaging. Magn Reson Imaging 24(2): 173-179.

Provencher S (1993) Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. Magn Reson Med 30: 672-679

Purcell EM, Torrey HC, Pound RV (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in solids. Phys Rev 69: 37-38.

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(1): 43-47.

Ripps ME, Huntley GW, Hof PR, Morrison JH, Gordon JW (1995) Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 92(3): 689-693.

Robberecht W, Aguirre T, Van den Bosch L, Tilkin P, Cassiman JJ, Matthijs G (1996) D90A heterozygosity in the SOD1 gene is associated with familial and apparently sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Neurology 47(5): 1336-1339.

Robberecht W, Sapp P, Viaene MK, Rosen D, McKenna-Yasek D, Haines J, Horvitz R, Theys P, Brown R Jr (1994) Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 62(1): 384-387.

Rosen AD (1978) Amyotrophic lateral sclerosis. Clinical features and prognosis. Arch Neurol 35(10): 638-642.

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, Rahmani Z, Krizus A, McKennayasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Vandenbergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericakvance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH (1993) Mutations in Cu／Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362: 59–62.

Rothstein JD, **Kuncl R**, **Chaudhry V**, **Clawson L**, **Cornblath DR**, **Coyle JT**, **Drachman DB (1991)** Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. Ann Neurol 30(2): 224-225

Rothstein JD, **Tsai G**, **Kuncl RW**, **Clawson L**, **Cornblath DR**, **Drachman DB**, **Pestronk A**, **Stauch BL**, **Coyle JT (1990)** Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 28(1): 18-25

Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 38(1): 73-84.

Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 344: 1688–1700.

Sach M, Winkler G, Glauche V, Liepert J, Heimbach B, Koch MA, Büchel C, Weiller C (2004) Diffusion tensor MRI of early upper motor neuron involvement in amyotrophic lateral sclerosis. Brain 127(Pt 2): 340-350.

Sachs L (1999) Angewandte Statistik. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Hihuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Sarchielli P, Pelliccioli GP, Tarducci R, Chiarini P, Presciutti O, Gobbi G, Gallai V (2001) Magnetic resonance imaging and 1H-magnetic resonance spectroscopy in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroradiology 43(3): 189-197.

Schapira AH (2005) Present and future drug treatment for Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 76(11): 1472-1478.

Schütz 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(3): 169-172.

Sharp PS, Dick JR, Greensmith L (2005) The effect of peripheral nerve injury on disease progression in the SOD1(G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Neuroscience 130(4): 897-910.

Shaw PJ (1999) Motor neurone disease. BMJ 318: 1118–1121.

Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ (1995) CSF and plasma amino acid level in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. Neurodegeneration 4: 209-216

Siesjö BK (1988) Historical overview. Calcium, ischemia and death of brain cells. Ann NY Acad Sci 522: 638-661.

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(2): 613-621.

Sommer B, Seeburg PH (1992) Glutamate receptor channels: novel properties and new clones. Trends Pharmacol Sci 13(7): 293-296.

Spriet LL, Howlett RA, Heigenhauser GJ (2000) An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise. Med Sci Sports Exerc 32(4): 756-763.

Stark D, Bradley W (1988) Magnetic resonance imaging. The C.V. Mosby Company, St. Louis.

Storm-Mathisen J, Otterson OP (1988) Localisation of excitatory amino acid transmitters. In: Lodg D (ed). Excitatory amino acids in health and disease. Wiley, Chichester.

Suhy J, Miller RG, Rule R, Schuff N, Licht J, Dronsky V, Gelinas D, Maudsley AA, Weiner MW (2002) Early detection and longitudinal changes in amyotrophic lateral sclerosis by (1)H MRSI. Neurology 58(5): 773-779.

Sumi H, Nagano S, Fujimura H, Kato S, Sakoda S (2006) Inverse correlation between the formation of mitochondria-derived vacuoles and Lewy-body-like

hyaline inclusions in G93A superoxide-dismutase-transgenic mice. Acta Neuropathol 112(1): 52-63.

Talbot K (2002) Motor neurone disease. Postgrad Med J 78: 513–519.

Tateno M, Sadakata H, Tanaka M, Itohara S, Shin RM, Miura M, Masuda M, Aosaki T, Urushitani M, Misawa H, Takahashi R (2004) Calcium-permeable AMPA receptors promote misfolding of mutant SOD1 protein and development of amyotrophic lateral sclerosis in a transgenic mouse model. Hum Mol Genet 13(19): 2183-2196.

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

Thorpe JW, Moseley IF, Hawkes CH, MacManus DG, McDonald WI, Miller DH (1996) Brain and spinal cord MRI in motor neuron disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 61(3): 314-317.

Traynor BJ, Codd MB, Corr B, Forde C, Frost E, Hardiman O (1999) Incidence and prevalence of ALS in Ireland, 1995-1997: a population-based study. Neurology 52: 504-509.

Tsai GC, Stauch-Slusher B, Sim L, Hedreen JC, Rothstein JD, Kuncl R, Coyle JT (1991) Reductions in acidic amino acids and N-acetylaspartylglutamate in amyotrophic lateral sclerosis CNS. Brain Res 556(1): 151-156.

Veldink JH, Kalmijn S, Groeneveld GJ, Wunderink W, Koster A, de Vries JH, van der Luyt J, Wokke JH, Van den Berg LH (2007) Intake of polyunsaturated fatty acids and vitamin E reduces the risk of developing amyotrophic lateral sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry 78(4): 367-371.

Vielhaber S, Kaufmann J, Kanowski M, Sailer M, Feistner H, Tempelmann C, Elger CE, Heinze HJ, Kunz WS (2001) Effect of creatine supplementation on metabolite levels in ALS motor cortices. Exp Neurol 172(2): 377-382.

Waragai M (1997) MRI and clinical features in amyotrophic lateral sclerosis. Neuroradiology 39(12): 847-851.

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.

Wiedau-Pazos M, Goto JJ, Rabizadeh S, Gralla EB, Roe JA, Lee MK, Valentine JS, Bredesen DE (1996) Altered reactivity of superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. Science 271(5248): 515-518.

Williams TL, Day NC, Ince PG, Kamboj RK, Shaw PJ (1997) Calcium-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptors: a molecular determinant of selective vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 42(2): 200-207.

Winter S, Ludolph AC (2004) Motoneuronerkrankungen. In: Winkler J, Ludolph AC Hrsg. Neurodegenerative Erkrankungen des Alters. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, Sisodia SS, Cleveland DW, Price DL (1995) An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. Neuron 14(6): 1105-1116.

Wong-Riley M, Anderson B, Liebl W, Huang Z (1998) Neurochemical organization of the macaque striate cortex: correlation of cytochrome oxidase with Na+K+ATPase, NADPH-diaphorase, nitric oxide synthase, and N-methyl-D-aspartate receptor subunit 1. Neuroscience 83(4): 1025-1045.

Yamanaka K, Vande Velde C, Eymard-Pierre E, Bertini E, Boespflug-Tanguy O, Cleveland DW (2003) Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease. Proc Natl Acad Sci USA 100(26): 16041-16046.

Yang Y, Hentati A, Deng H-X, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung W-Y, Ouahchi K, Yan, J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. Nature Genet 29: 160-165.

Yang W, Dunlap J. R, Andrews RB, Wetzel R (2002) Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. Hum Molec Genet 11: 2905-2917.

Yim MB, Kang JH, Yim HS, Kwak HS, Chock PB, Stadtman ER (1996) A gain-of-function of an amyotrophic lateral sclerosis-associated Cu,Zn-superoxide dismutase mutant: An enhancement of free radical formation due to a decrease in Km for hydrogen peroxide. Proc Natl Acad Sci USA 93(12): 5709-5714.

Young AB, Penney JB, Dauth GW, Bromberg MB, Gilman S (1983) Glutamate or aspartate as a possible neurotransmitter of cerebral corticofugal fibers in the monkey. Neurology 33(11): 1513-1516.

Zang DW, Yang Q, Wang HX, Egan G, Lopes EC, Cheema SS (2004) Magnetic resonance imaging reveals neuronal degeneration in the brainstem of the superoxide dismutase 1 transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Eur J Neurosci 20: 1745–1751.

Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G (2004) Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. Brain Res 1000: 32-39.

8 Anhang

8.1 Orginaldaten aus den Versuchen

8.1.1 Transversale Relaxationszeiten

Bei den fehlenden T_2-Werten handelt es sich um Ausreißer, die aufgrund eines Unterschiedes von zwei Standardabweichungen zum Mittelwert bei den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt wurden.

8.1.1.1 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus facialis

T_2-Relaxations-zeit [ms]	**Wildtyp-Mäuse**					**Transgene Mäuse**				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	56,4	56,6	53,5	56,8	55,1	54,2	58,6	59,9	65,9	66,9
Maus2	53,9	54,3	53,2	54,9	54,7	54,7	55,8		65,7	70,1
Maus3	57,2	54,7	54,9	56,1	55,7	55,1	55,3	59,7	67,0	70,9
Maus4	57,6	56,8	56,2	56,2	57,2	54,9	58,2	59,4	66,3	72,5
Maus5	53,6	56,6	54,9	57,3	55,3	56,1	58,5	62,3	65,6	69,8
Maus6	55,4	57,4	56,5	55,9	56,5	53,3	55,9	57,9	65,6	68,5
Maus7	56,9	55,1	56,8	57,3	58,4	55,8	56,5	59,9	65,1	68,8
Maus8						57,5	57,0	61,1	68,3	68,7
Maus9						55,9	58,8	62,6	67,8	71,1
Maus10						57,5	57,0	61,0	67,2	67,7
Maus11						55,2	58,3	63,5	68,2	70,5
Maus12						55,7	57,1	62,0	66,9	70,2

Tabelle 8-1: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus facialis für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.1.2 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus

T_2-Relaxations-zeit [ms]	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	56,7	57,1	55,7	57,7	56,8	59,3	59,2	60,2	63,8	69,2
Maus2	56,8	55,8	56,5	55,2	58,4	59,8	58,3		65,1	71,2
Maus3	55,3	56,1	55,8	57,6	54,7	57,3	58,1	62,5	66,4	73,9
Maus4	59,5	58,1	56,6	59,2	58,5	56,9	57,9	61,5	65,8	70,6
Maus5	55,3	58,8	57,3	56,9	57,8	56,7	58,1	60,5	66,9	70,5
Maus6	58,6	54,3	55,4	57,8	58,8	55,1	56,9	58,8	66,8	66,2
Maus7	55,2	59,1	57,6	59,4	59,1	56,9	59,4	59,9	64,8	67,0
Maus8						55,9	59,7	63,3	69,7	73,2
Maus9						57,0	58,7	62,3	69,4	72,5
Maus10						57,4	59,6	62,1	67,9	69,4
Maus11						58,2	58,3	61,5	65,7	71,5
Maus12						57,5	58,8	61,4	64,0	67,7

Tabelle 8-2: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.1.3 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus

T_2-Relaxations-zeit [ms]	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	55,7	55,7	55,3	57,9	57,5	55,2	58,1	59,0	61,8	65,2
Maus2	56,2	56,2	56,0	57,4	56,7	56,4	57,1		62,8	63,6
Maus3	55,3	55,3	55,7	55,6	56,2	53,6	58,9	60,2	64,7	65,9
Maus4	56,5	56,5	57,3	57,5	57,3	56,0	55,9	58,9	61,9	65,3
Maus5	55,9	55,9	57,6	57,6	54,8	56,0	56,9	59,5	63,9	67,9
Maus6	57,3	57,3	57,2	56,2	59,1	54,9	55,2	57,5	61,1	64,7
Maus7	56,9	56,9	58,6	59,2	56,6	55,1	57,1	58,8	60,8	61,5
Maus8						55,5	58,7	60,8	65,3	68,2
Maus9						57,1	59,3	60,3	62,5	64,4
Maus10						57,3	57,0	59,5	63,2	63,5
Maus11						56,8	58,7	62,8	65,1	66,9
Maus12						56,4	56,9	59,9	62,9	63,9

Tabelle 8-3: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.2 Flächen der Hyperintensitäten

8.1.2.1 Fläche des Nukleus facialis

Fläche [mm^2]			
Lebensalter [Tage]]	80	100	120
Maus1	0,77	0,99	1,02
Maus2	0,78	0,99	1,13
Maus3	0,81	0,78	1,02
Maus4	1,1	1,17	1,19
Maus5	1,15	1,14	1,17
Maus6	0,95	1,11	1,0
Maus7	0,93	0,99	1,21
Maus8	1,06	1,1	1,13
Maus9	0,96	1,06	1,17
Maus10	0,7	1,0	1,1
Maus11	1,06	1,14	1,07
Maus12	0,91	0,99	1,1

Tabelle 8-4: Fläche des Nukleus facialis für die transgenen Mäuse im Alter von 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.2.2 Fläche des Nukleus hypoglossus

Fläche [mm^2]			
Lebensalter [Tage]	80	100	120
Maus1	1,06	1,24	1,43
Maus2	1,15	1,52	1,07
Maus3	1,15	1,25	1,43
Maus4	0,96	1,36	1,39
Maus5	0,81	1,29	1,29
Maus6	1,19	1,19	1,33
Maus7	0,55	1,19	1,41
Maus8	1,0	1,24	1,22
Maus9	1,37	1,29	1,46
Maus10	0,71	1,43	1,3
Maus11	1,3	1,22	1,04
Maus12	0,52	1,29	1,14

Tabelle 8-5: Fläche des Nukleus hypoglossus für die transgenen Mäuse im Alter von 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.2.3 Fläche des Nukleus trigeminus

Fläche [mm^2]		
Lebensalter [Tage]	100	120
Maus1	1,18	1,13
Maus2	0,71	0,84
Maus3	0,59	1,08
Maus4	0,95	1,19
Maus5	0,96	0,73
Maus6	0,95	0,88
Maus7	0,98	0,96
Maus8	0,87	0,96
Maus9	0,51	0,88
Maus10	0,99	1,22
Maus11	0,92	0,96
Maus12	1,08	0,81

Tabelle 8-6: Fläche des Nukleus trigeminus für die transgenen Mäuse im Alter von 100 und 120 Tagen.

8.1.3 Anzahl an Vakuolen

8.1.3.1 Anzahl an Vakuolen im Nukleus facialis

Anzahl Vakuolen					
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120
Maus1	2	3	49	196	273
Maus2	5	4	61	219	287
Maus3	6	2	63	175	312
Maus4	2	6	51	248	395
Maus5	3	7	41	222	298
Maus6	5	3	57	169	363

Tabelle 8-7: Anzahl an Vakuolen im Nukleus facialis für die transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.3.2 Anzahl an Vakuolen im Nukleus hypoglossus

Anzahl Vakuolen					
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120
Maus1	7	3	45	206	301
Maus2	2	6	67	166	299
Maus3	5	2	63	219	319
Maus4	6	6	55	231	367
Maus5	3	7	56	198	322
Maus6	2	8	60	178	275

Tabelle 8-8: Anzahl an Vakuolen im Nukleus hypoglossus für die transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.3.3 Anzahl an Vakuolen im Nukleus trigeminus

Anzahl Vakuolen					
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120
Maus1	8	3	45	154	281
Maus2	3	6	52	166	312
Maus3	2	9	63	175	319
Maus4	7	6	64	215	270
Maus5	5	7	56	145	232
Maus6	6	12	61	199	275

Tabelle 8-9: Anzahl an Vakuolen im Nukleus trigeminus für die transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.4 Anzahl an Motoneuronen

8.1.4.1 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus facialis

Anzahl Motoneurone	**Wildtyp-Mäuse**					**Transgene Mäuse**				
Lebensalter [Tage]]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	32	40	40	40	30	20	29	21	32	21
Maus2	38	51	48	32	49	32	31	31	27	25
Maus3	54	38	38	48	36	34	33	29	30	33
Maus4	44	36	37	38	33	25	28	25	23	28
Maus5	46	42	21	35	37	26	21	27	22	23

Tabelle 8-10: Anzahl an Motoneuronen im Nukleus facialis für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.4.2 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus hypoglossus

Anzahl Motoneurone	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	23	19	24	19	23	11	14	11	13	8
Maus2	27	18	17	19	24	8	11	10	13	10
Maus3	16	24	27	15	16	16	15	11	8	11
Maus4	13	22	24	15	19	12	7	15	15	9
Maus5	17	19	25	23	16	11	8	12	13	16

Tabelle 8-11: Anzahl an Motoneuronen im Nukleus hypoglossus für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.4.3 Anzahl an Motoneuronen im Nukleus trigeminus

Anzahl Motoneurone	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	19	15	14	16	18	14	8	10	12	10
Maus2	22	17	16	17	17	12	9	9	12	14
Maus3	20	18	19	20	17	13	11	9	11	9
Maus4	17	21	20	13	18	11	11	8	14	7
Maus5	14	19	18	18	19	12	12	14	9	12

Tabelle 8-12: Anzahl an Motoneuronen im Nukleus trigeminus für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.5 Zungenfaserduchmesser

8.1.5.1 Kleinster Zungenfaserdurchmesser

Faserdurchmesser [µm]	Wildtyp-Mäuse				Transgene Mäuse			
Lebensalter [Tage]	60	80	100	120	60	80	100	120
Maus 1	30	10	20	20	10	10	20	20
Maus 2	30	30	30	30	20	10	10	10
Maus 3	30	20	30	30	10	10	10	10
Maus 4	20	20	10	30	10	10	10	10
Maus 5	20	20	20	30	10	10	10	20
Maus 6	20	20	20	30	5	10	10	20
Maus 7	20	20	20	20	20		10	
Maus 8	20	30	20	30				
Maus 9	20		30					
Maus 10	20		30					

Tabelle 8-13: Kleinste Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.5.2 Mittlerer Zungenfaserdurchmesser

Faserdurchmesser [µm]	Wildtyp-Mäuse				Transgene Mäuse			
Lebensalter [Tage]	60	80	100	120	60	80	100	120
Maus 1	40	20	30	30	30	30	30	30
Maus 2	40	40	40	40	20	30	20	20
Maus 3	40	40	40	40	30	30	20	20
Maus 4	40	40	20	40	30	20	20	20
Maus 5	30	30	30	40	20	20	20	30
Maus 6	30	30	30	40	20	30	20	
Maus 7	30	30	30	40	30		20	
Maus 8	30	30	30	40	30			
Maus 9	30		40	40				
Maus 10	30		40					

Tabelle 8-14: Mittlere Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.5.3 Größter Zungenfaserdurchmesser

Faserdurchmesser [µm]	Wildtyp-Mäuse				Transgene Mäuse			
Lebensalter [Tage]	60	80	100	120	60	80	100	120
Maus 1	50	30	40	50	40	40	40	40
Maus 2	50	50	50	50	40	40	30	30
Maus 3	50	60	50	50	40	40	30	30
Maus 4	50	40	40	50	40	30	40	30
Maus 5	60	50	40	50	30	30	40	30
Maus 6	50	50	40	40	40	40	30	
Maus 7	40	50	40	60	40		40	
Maus 8	40	50	50	60	30			
Maus 9	50		50	40				
Maus 10	50							

Tabelle 8-15: Größter Faserdurchmesser der Zungenmuskulatur für die Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.6 Transversale Relaxationszeiten nach Gabe von Vitamin E

Bei den fehlenden T_2-Werten handelt es sich um Ausreißer, die aufgrund eines Unterschiedes von zwei Standardabweichungen zum Mittelwert bei den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt wurden.

8.1.6.1 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus facialis

T_2-Relaxations-zeit [ms]	**Wildtyp-Mäuse**					**Transgene Mäuse**				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	55,0	56,3	53,6	54,9	53,1	55,6	56,9	58,8	67,5	68,7
Maus2	54,7	55,4	54,1	55,8	57,8	56,3	58,6	59,6	68,5	66,3
Maus3	54,3	54,2	55,8	55,6	54,8	55,8	55,6	60,9	66,4	70,1
Maus4	54,6	56,0	55,4	56,4	55,4	53,5	54,1	58,1	64,1	68,0
Maus5	56,7	55,0	55,7		55,4	50,6	56,5	58,2	62,0	59,3
Maus6	55,9	55,9	54,3	55,4	55,5	53,0	55,7	57,2	62,9	68,8
Maus7	54,1	57,4	55,1	55,6	56,8	54,1	54,9	56,4	58,8	62,6
Maus8	56,5	53,9	55,3	57,0	57,2	53,6	54,4	59,3	59,9	65,3
Maus9	55,4	57,2	55,3	53,9	53,8	55,4	55,6	60,2	65,2	70,3
Maus10	53,5	54,1	55,3	54,7	55,6	51,7	56,4	59,4	68,7	68,2
Maus11	56,0	56,3	54,9	55,6	56,8	52,9	56,9	61,4	63,2	69,6
Maus12						54,1	54,7	61,7	65,4	68,7
Maus13						53,0	56,2	63,1	65,9	63,8
Maus14							56,1	62,8	60,6	70,1
Maus15						55,4	55,0	56,0	61,2	63,9

Tabelle 8-16: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus facialis für die Vitamin E-behandelten Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.6.2 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus

T_2-Relaxations-zeit [ms]	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	55,6	57,9	56,0	58,6	59,4	58,1	55,9	54,8	60,8	64,4
Maus2	55,4	55,2	58,3	52,3	55,3	54,8	53,7	59,4	61,9	68,3
Maus3	56,8	57,9	55,1		55,5	53,7	56,5	59,5	57,1	67,1
Maus4	54,2	54,2	56,2	56,0	56,5	54,2	55,3	57,8	58,5	65,0
Maus5	56,9	57,5	56,0		56,9	55,8	57,3	56,7		60,7
Maus6	56,1	57,4	56,6	55,6	59,3	54,8	54,1	56,2	61,0	63,2
Maus7	56,4	56,5	56,9	56,4	57,0	55,9	50,4	55,7	56,3	
Maus8	54,8	57,6	56,0	55,7	57,1	52,7	52,4	57,8	60,2	65,8
Maus9	54,9	54,8	55,6	56,0	55,7	51,8	56,3	61,3	65,8	66,9
Maus10	54,4	55,0	57,0	57,0	56,3	50,9	56,9	59,6		61,7
Maus11	55,6	55,5	56,3	56,6		54,8	55,0	60,1	59,9	66,0
Maus12						57,1	58,1	60,0	61,9	67,0
Maus13						53,7	58,0	60,9	60,1	68,6
Maus14						53,2	55,6	61,3		67,5
Maus15						55,5	57,1	53,8	61,3	62,0

Tabelle 8-17: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus hypoglossus für die Vitamin E-behandelten Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.6.3 Transversale Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus

T_2-Relaxations-zeit [ms]	Wildtyp-Mäuse					Transgene Mäuse				
Lebensalter [Tage]	40	60	80	100	120	40	60	80	100	120
Maus1	56,5	55,8	56,6	57,7	57,1	58,0	57,1	60,5	60,5	61,5
Maus2	56,2	56,8	57,8	59,2	58,8	53,4	57,0	56,3	62,2	60,0
Maus3	55,8	55,3	57,2	52,3	57,3	55,7	55,9	58,4	59,2	62,2
Maus4	55,3	55,6	55,2	57,7	57,8	54,5	54,9	55,6	60,3	61,2
Maus5	56,2	54,6	56,2		57,0	53,0	55,8	55,3	55,7	59,6
Maus6	52,2	55,9	57,3	54,1	56,9	55,1	55,7	57,6	61,0	62,6
Maus7	54,8	58,1	56,4	55,6	56,3	54,5	55,4	57,2	58,9	57,8
Maus8	55,0	55,2	56,4	55,7	56,9	55,3	53,3	56,5	59,9	60,4
Maus9	55,8	58,4	54,2	56,2	54,6	54,3	55,7	57,0	59,3	63,6
Maus10	55,6	56,2	56,5	57,1	56	53,0	55,9	57,7	56,0	61,1
Maus11	56,9	57,2	57,7	56,6	54,5	55,8	57,0	58,6	60,8	61,5
Maus12						53,9	54,3	55,0	61,3	62,5
Maus13						55,2	56,8	58,2	58,8	58,8
Maus14							56,2	58,8	56,6	62,1
Maus15						56,7	57,3	56,1	58,1	59,0

Tabelle 8-18: T_2-Relaxationszeiten des Nukleus trigeminus für die Vitamin E-behandelten Wildtyp-Mäuse und transgenen Mäuse im Alter von 40, 60, 80, 100 und 120 Tagen.

8.1.6.4 Steigungsanalyse

Für den Vergleich der T_2-Werte zwischen Vitamin E-behandelten und unbehandelten transgenen Mäusen und Wildtyp-Mäusen wurden die T_2-Werte der einzelnen Hirnstammkerne gegen die Untersuchungszeitpunkte 60, 80, 100 und 120 Tage aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade durch die Werte gelegt. Von dieser Geraden wurde die Steigungen bestimmt.

8.1.6.4.1 Nukleus facialis

Steigung				
Maus	**SOD1**	**SOD1-Vitamin E**	**Wildtyp**	**Wildtyp – Vitamin E**
1	0,15	0,26	-0,01	-0,03
2	0,24	0,2	0,01	0,02
3	0,27	0,26	0,02	-0,02
4	0,25	0,26	0,01	-0,04
5	0,19	0,14	-0,01	0,01
6	0,23	0,26	-0,02	0
7	0,21	0,17	0,05	-0,01
8	0,21	0,18		0,02
9	0,21	0,26		-0,03
10	0,19	0,23		-0,06
11	0,21	0,2		-0,04
12	0,22	0,25		
13		0,11		
14		0,2		
15		0,17		

Tabelle 8-19: Steigungen der Regressionsgeraden durch die T_2-Werte des Nukleus facialis gegen die Untersuchungszeitpunkte 60, 80, 100 und 120 Tage für die Vitamin E-behandelten und unbehandelten G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse.

8.1.6.4.2 Nukleus hypoglossus

Steigung				
Maus	**SOD1**	**SOD1-Vitamin E**	**Wildtyp**	**Wildtyp – Vitamin E**
1	0,17	0,11	0,006	-0,001
2	0,22	0,22	0,03	-0,01
3	0,26	0,16	-0,1	-0,01
4	0,21	0,13	0,02	0,05
5	0,22	0,1	-0,02	-0,07
6	0,18	0,16	0,08	-0,01
7	0,14	0,05	0,01	-0,05
8	0,23	0,22		0,06
9	0,24	0,18		0,03
10	0,18	0,08		0,04
11	0,22	0,16		-0,07
12	0,15	0,09		
13		0,13		
14		0,05		
15		0,14		

Tabelle 8-20: Steigungen der Regressionsgeraden durch die T_2-Werte des Nukleus hypoglossus gegen die Untersuchungszeitpunkte 60, 80, 100 und 120 Tage für die Vitamin E-behandelten und unbehandelten G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse.

8.1.6.4.3 Nukleus trigeminus

Steigung				
Maus	**SOD1**	**SOD1-Vitamin E**	**Wildtyp**	**Wildtyp – Vitamin E**
1	0,12	0,07	0,01	0,03
2	0,11	0,06	0	0,02
3	0,13	0,12	0	-0,09
4	0,16	0,12	0,01	-0,02
5	0,19	0,04	-0,03	0,02
6	0,16	0,12	0,03	-0,01
7	0,08	0,05	-0,01	0,03
8	0,16	0,14		-0,01
9	0,09	0,11		-0,01
10	0,11	0,07		-0,05
11	0,13	0,06		-0,05
12	0,12	0,18		
13		0,07		
14		0,08		
15		0,04		

Tabelle 8-21: Steigungen der Regressionsgeraden durch die T_2-Werte des Nukleus trigeminus gegen die Untersuchungszeitpunkte 60, 80, 100 und 120 Tage für die Vitamin E-behandelten und unbehandelten G93A-SOD1 Mäuse und Wildtyp-Mäuse.

8.1.7 Metabolitenkonzentrationen aus der MR-Spektroskopie im Verhältnis zu Kreatin

8.1.7.1 Hirnstamm

Metabolitenkonzentrationen im Verhältnis zu Kreatin									
Metabolit		Cho	Cr	GABA	Gln	Glu	Ins	Lac	NAA
Wildtyp-Mäuse	**Maus 1**	0,22	1,00	0,28	0,74	1,02	1,31	0,51	0,81
	Maus 2	0,29	1,00	0,40	0,67	0,57	1,28	0,50	0,98
	Maus 3	0,22	1,00	0,35	0,50	0,65	1,04	0,26	0,83
	Maus 4	0,36	1,00	0,53	0,40	0,80	0,66	0,36	1,01
	Maus 5	0,23	1,00	0,33	0,88	1,06	1,15	0,39	0,91
	Maus 6	0,25	1,00	0,32	0,63	0,52	1,23	0,05	0,68
transgene Mäuse	**Maus 1**	0,30	1,00	0,26	0,25	0,68	0,94	0,58	1,02
	Maus 2	0,25	1,00	0,33	0,56	0,91	1,42	0,80	1,20
	Maus 3	0,24	1,00	0,37	0,38	0,73	0,92	0,55	1,08
	Maus 4	0,23	1,00	0,47	0,40	1,01	1,04	0,63	1,26
	Maus 5	0,23	1,00	0,33	0,51	1,03	0,98	0,43	0,92
	Maus 6	0,34	1,00	0,34	0,37	1,19	0,83	0,95	1,05
	Maus 7	0,23	1,00	0,42	0,61	1,11	0,89	0,76	1,23
	Maus 8	0,25	1,00	0,26	0,28	0,84	0,87	1,00	0,98
	Maus 9	0,25	1,00	0,34	0,28	1,27	1,21	0,91	1,24

Tabelle 8-22: Metabolitenkonzentrationen im Verhältnis zu Kreatin im Hirnstamm von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen. Die Metabolite sind folgendermaßen abgekürzt: Cholin (Cho), Kreatin (Cr), γ-Aminobuttersäure (GABA), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), Inositol (Ins), Laktat (Lac), N-Acetylaspartat (NAA).

8.1.7.2 Cerebellum

Metabolitenkonzentrationen im Verhältnis zu Kreatin									
Metabolit		Cho	Cr	GABA	Gln	Glu	Ins	Lac	NAA
Wildtyp-Mäuse	**Maus 1**	0,25	1,0	0,16	0,61	0,78	0,44	0,21	0,54
	Maus 2	0,18	1,0	0,18	0,58	0,63	0,56	0,29	0,56
	Maus 3	0,21	1,0	0,16	0,39	0,72	0,54	0,29	0,66
	Maus 4	0,20	1,0	0,13	0,56	0,67	0,66	0,53	0,60
Transgene Mäuse	**Maus 1**	0,17	1,0	0,14	0,75	0,60	0,43	0,44	0,52
	Maus 2	0,23	1,0	0,16	0,53	0,55	0,44	0,41	0,70
	Maus 3	0,28	1,0	0,17	0,80	0,91	0,31	0,29	0,67
	Maus 4	0,18	1,0	0,13	0,65	0,70	0,42	0,32	0,64
	Maus 5	0,24	1,0	0,17	0,52	0,61	0,29	0,29	0,66
	Maus 6	0,14	1,0	0,20	0,68	0,66	0,42	0,25	0,73
	Maus 7	0,20	1,0	0,20	0,73	0,86	0,46	0,23	0,66
	Maus 8	0,20	1,0	0,22	0,41	0,68	0,27	0,40	0,56
	Maus 9	0,25	1,0	0,14	0,66	0,92	0,40	0,36	0,75

Tabelle 8-23: Metabolitenkonzentrationen im Verhältnis zu Kreatin im Cerebellum von Wildtyp-Mäusen und transgenen Mäusen. Die Metabolite sind folgendermaßen abgekürzt: Cholin (Cho), Kreatin (Cr), γ-Aminobuttersäure (GABA), Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), Inositol (Ins), Laktat (Lac), N-Acetylaspartat (NAA).

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, 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 für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die große wissenschaftliche Freiheit, die er mir bei der Durchführung der Arbeit gelassen hat.
Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Günter Ehret für die Übernahme der Funktion als Erstgutachter. Er war mir eine sehr große Hilfe bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.
Prof. Dr. Harald Wolf danke ich für die Erstellung des zweiten Gutachtens.
Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Bernd Sommer für die Möglichkeit, einen Großteil meiner Experimente im *In-vivo*-Imaging Labor bei Boehringer Ingelheim durchführen zu können, bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei den Mitgliedern des *In-vivo*-Imaging Labors Dr. Detlef Stiller, Dr. Heiko G. Nießen und Dr. Thomas Kaulisch für ihre Unterstützung insbesondere in der Endphase meiner Doktorarbeit. Michael Neumaier danke ich für den Bau der Oberflächenspule und für seine Unterstützung während den Messungen.
Helga Mogel und Dr. Hans-Jürgen Gdynia aus dem Muskellabor der Neurologie möchte ich für die Hilfe bei der Zungenhistologie und deren Auswertung danken.
Prof. Dr. Tobias Böckers aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie danke ich für die Diskussionsbereitschaft.
Darüber hinaus bedanke ich mich bei allen Kollegen aus der Experminentellen Neurologie für die schöne Zeit am Eselsberg.
Ein herzliches Dankeschön geht an Karin Dotzauer für ihr Korrekturlesen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Kiarie und meiner Mutter. Danke für eure Unterstützung.

Lebenslauf

Name:		Selina Bucher
Adresse:		Köllestr. 7 89077 Ulm
Geburtstag:		05.01.1980
Geburtsort:		Kempten/Allgäu
Staatsangehörigkeit:		deutsch
Familienstand:		ledig
Ausbildung:	1986-1990	Grundschule Obergünzburg
	1990-1999	Hildegardis-Gymnasium, Kempten, Abschluss: Abitur
	1999-2004	Studium der Biologie, Universität Ulm, Abschluss: Diplom
	12/2003-08/2004	Diplomarbeit, Institut für Neurobiologie, Universität Ulm
	seit 10/2004	Promotion, Klinik für Neurologie, Universität Ulm

Erklärung

Hiermit erkläre ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfsmittel als den genannten angefertigt zu haben. Zitate und Stellen, die aus anderen Arbeiten und Quellen entnommen oder verändert wurden, sind durch Quellenangaben als Entlehnung kenntlich gemacht.

Ulm, den 28.04.2008