

Aus dem Institut für Tierpathologie
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. W. Schmahl

und dem Institut für allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Abteilung für Neuropathologie
der Technischen Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. J. Schlegel

**Einfluss der Dynein-Mutation auf zelluläre Mediatoren der
neuronalen Signaltransduktion im *Cra1*-Mausmodell der
Motoneurondegeneration**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Jennifer Bähr
aus Köln

München 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Referent: Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. Fischer

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
I EINLEITUNG	1
1. Motoneuronerkrankungen.....	2
1.1 MND beim Menschen	2
1.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	3
1.1.2 Spinale Muskelatrophie.....	5
1.2 MND beim Tier.....	6
1.3 Experimentelle Mausmodelle	9
1.3.1 SOD1-Mausmodell.....	9
1.3.2 Mnd-Mausmodell	11
1.3.3 Mausmodelle für SMA.....	12
2. Das <i>Cra1</i>-Mausmodell	14
2.1 Untersuchungen am <i>Cra1</i> - und <i>Loa</i> -Mausmodell	16
3. Axonaler Transport und seine Motorproteine	18
3.1 Das zelluläre Zytoskelett.....	18
3.2 Motorproteine.....	20
3.2.1 Kinesin	20
3.2.1.1 Kinesin basierte Mausmodelle	20
3.3 Der zytoplasmatische Dyneinkomplex	21
3.3.1 Aufbau und Funktion.....	21
3.3.1.1 Dynein <i>Heavy Chain</i>	23
3.3.1.2 Dynactin	24
3.3.1.3 Dynein und Motoneurondegeneration.....	24
4. Neuronale Signaltransduktion	26
4.1 Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen	26
4.1.1 MAP-Kinasen und die Rolle der Signaltransduktion durch target-derived Neurotrophine	28
4.2 Protein Kinase B (PKB/Akt).....	29
4.3 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF).....	30

II	ZIELSETZUNG	32
III	MATERIAL UND METHODEN	33
1.	Mäusekollektiv	33
1.1	Herkunft und Haltung der Tiere.....	33
2.	Präparation	34
2.1	Eingriffe am Tier.....	34
2.1.1	Perfusionsfixation.....	34
2.2	Präparation der zu untersuchenden Gewebe	34
2.2.1	Präparation des Nervus ischiadicus.....	35
2.2.2	Präparation der Wirbelsäule.....	37
3.	Immunhistologie	38
3.1	Allgemeine Vorbehandlung	38
3.2	NeuN.....	38
3.3	MAPK, Erk5, Akt, BDNF und Calbindin.....	38
3.4	Allgemeine Nachbehandlung	39
4.	Lichtmikroskopische Untersuchung des Rückenmarks	40
4.1	Motoneuron-Zählung.....	40
4.2	Ermittlung der Immunoreaktivitätsscores	41
5.	Morphologische Untersuchungen am N. ischiadicus.....	42
5.1	Lichtmikroskopische Betrachtung des N. ischiadicus.....	42
5.2	Morphometrie.....	43
5.3	Numerische Erfassung pathomorphologischer Fasercharakteristika.....	44
5.4	Elektronenmikroskopische Untersuchung	44
6.	Statistische Evaluation.....	45
IV	ERGEBNISSE	46
1.	Untersuchungen am Rückenmark.....	46
1.1	α -Motoneuron-Anzahl und -Dichte	46
1.1.1	Segmentübergreifende Betrachtung	48
1.1.2	Betrachtung der einzelnen Abschnitte	49
1.1.2.1	Zervikalmark	49

1.1.2.2	Thorakalmark.....	50
1.1.2.3	Lumbalmark.....	51
1.2	Expression der Transduktions- und Wachstumsfaktoren.....	52
1.2.1	pMAPK.....	52
1.2.1.1	Extensität.....	52
1.2.1.2	Färbeintensität.....	52
1.2.1.3	pMAPK-Expression im Remmele Score.....	54
1.2.1.4	pMAPK-Expression im einfachen Score.....	54
1.2.2	Erk5.....	55
1.2.2.1	Extensität.....	55
1.2.2.2	Färbeintensität.....	55
1.2.2.3	Erk5-Expression im Remmele-Score.....	56
1.2.2.4	Erk5-Expression im einfachen Score.....	56
1.2.3	pAkt.....	58
1.2.3.1	Extensität.....	58
1.2.3.2	Färbeintensität.....	58
1.2.3.3	pAkt-Expression im Remmele-Score.....	59
1.2.4	BDNF.....	59
1.2.4.1	Extensität.....	59
1.2.4.2	Färbeintensität.....	60
1.2.4.3	BDNF-Expression im Remmele-Score.....	60
2.	Untersuchungen am Nervus ischiadicus.....	61
2.1	Lichtmikroskopische Befunde.....	61
2.2	Pathomorphologische Fasercharakteristika.....	62
2.2.1	Doppelungen der Myelinscheide.....	62
2.2.2	Intratubäre Myelindebris.....	62
2.2.3	Wallersche Degenerationen.....	63
2.2.4	Outfolded Myelin Loops.....	63
2.2.5	Infolded (Inner) Myelin Loops.....	64
2.2.6	Hypomyelinisierte Fasern (HF).....	65
2.2.7	Axonale Atrophien/Schrumpfung.....	66
2.3	Weitere Elektronenmikroskopische Befunde.....	67
2.4	Morphometrische Betrachtung des N. ischiadicus.....	71

2.4.1	Faszikel- und Endoneuralfäche, Faseranzahl und -dichte	71
2.4.2	Flächenverteilung der myelinisierten Einzelfasern	74
2.4.3	Axonflächen	75
2.4.4	G-Ratio	76
V	DISKUSSION.....	77
1.	Die <i>Cra1</i>-Maus - ein MND-Modell?.....	77
2.	Einfluss der Dynein-Mutation auf die neuronale Signaltransduktion	81
3.	Durch die <i>Cra1</i>-Mutation hervorgerufene Veränderungen in Morphologie und Morphometrie des N. ischiadicus.....	88
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	92
VII	SUMMARY	94
VIII	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
IX	ANHANG	119
1.	Tabellen	119
1.1	Anzahl der Motoneurone.....	119
1.2	Expressionsarten	121
1.3	Pathomorphologische Fasercharakteristika	131
1.4	Morphometrische Daten des N. ischiadicus.....	132
2.	Histogramme.....	133
2.1	Faserflächenverteilungshistogramme der Wildtypen	133
2.1.1	Faserflächenverteilungshistogramme der <i>Cra1</i> -Mäuse	135
2.2	Axonflächenverteilungshistogramme Wildtypen.....	140
2.3	Axonflächenverteilungshistogramme <i>Cra1</i> -Mäuse.....	142

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

al.	altera
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMK	Big Map Kinase
cAMP	zyklisches Adenosin-monophosphat
ChAT	Cholin-Azetyltransferase
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
<i>Cra</i>	Cramping
CREB	cAMP response-element binding protein
Cu	Kupfer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMND	Equine Motor Neuron Disease
DHC	Dynein <i>Heavy Chain</i>
DM	Degenerative Myelopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>Dnchc1</i>	Dynein <i>Heavy Chain 1</i>
DRG	Dorsalwurzel Ganglion
ENU	N-Ethyl-N-Nitrosourea
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Erk	Extrazellulär signalregulierte Kinase
FALS	Familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
HCSMA	Hereditäre Canine SMA
HE	Hämatoxylin & Eosin
HSP	Hereditäre Spastische Paraplegie
IGF	Insulin-like Growth Factor
IHC	Immunhistochemie
IML	Infolded/Inner Myelin Loop

IPC	Insoluble Protein Complex
IRS	Immunoreaktivitäts-Score
<i>Loa</i>	Legs at odd angles
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK	MAPK-Kinase
MND	Motor Neuron Disease (Motoneuronerkrankung)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
PK	Proteinkinase
NeuN	Neuron-spezifisches nukleäres Antigen
NGF	Nerve Growth Factor
OML	Outfolded Myelin Loop
PI3-K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMA	Progressive Muskelatrophie
PP	Prozentzahl positiver Zellen
PPD	Paraphenylendiamin
RT	Raumtemperatur
SALS	Sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SLK	Schmidt-Lantermansche Kerbe
SI	Staining Intensity
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	Survival Motor Neuron
SOD1	Cu/Zn Superoxid-Dismutase 1
STABW	Standardabweichung
<i>Swl</i>	Sprawling
TrkR	Tyrosinkinase Rezeptor
WD	Wallersche Degeneration
Zn	Zink

I EINLEITUNG

Motoneurondegenerative Erkrankungen, wie Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) oder Spinale Muskelatrophie (SMA) nehmen in unserer Gesellschaft einen wichtigen Stellenwert in der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen ein. So ist ALS, nach Alzheimer und Parkinson, die dritthäufigste neurodegenerative Todesursache beim Menschen ¹. SMA gilt als die häufigste genetische Todesursache bei Kindern ².

Bisher gibt es keine wirksamen Therapien für diese Erkrankungen. Ein kritischer Punkt ist die späte Diagnosestellung, welche bisher erst beim Auftreten klinischer Symptome erfolgt, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Motoneurone schon unwiederbringlich geschädigt sind.

Eine Erforschung der Ätiopathogenese dieser Erkrankungen ist deshalb dringend nötig, um neue Wege für Diagnostik und Therapie zu finden. Zum Verständnis der Ursachen und zugrunde liegenden Mechanismen der Motoneurondegeneration sind Tiermodelle unerlässlich, denn nur in ihnen kann der Krankheitsverlauf von Anfang an untersucht und verfolgt werden. Die meisten Tiermodelle für ALS stützen sich auf die Mutation der Cu/Zn Superoxid Dismutase (SOD1), welche eine bekannte genetische Ursache der ALS ist ³.

Eine weitere mögliche Ursache für die Motoneurondegeneration wird in Störungen im axonalen Transport vermutet ⁴. In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum *Cra1*-Mausmodell durchgeführt, welches einen Defekt im axonalen Transportprotein Dynein aufweist. Ziel der Studie war es, zu untersuchen, ob der gestörte retrograde Transport sich negativ auf die Expression von Signalfaktoren und Neurotrophinen, welche das zelluläre Überleben fördern, auswirkt und welche Veränderungen sich in der Physiologie des peripheren Nervens der *Cra1*-Mäuse ergeben.

1. Motoneuronerkrankungen

Die Motoneuronerkrankungen (engl. Motor Neuron Diseases, MND) bilden eine Gruppe von Erkrankungen, welche eine Schädigung der Motoneurone gemeinsam haben ⁵.

Motoneurone sind große polarisierte Zellen. Ihre Axone bilden die efferenten Nervenbahnen, welche direkt oder indirekt die Muskulatur des Körpers innervieren. Man unterscheidet zwei verschiedene Gruppen von Motoneuronen.

Das erste Motoneuron wird von den Neuronen im motorischen Kortex der Großhirnrinde gebildet, welche für die Steuerung der Willkürmotorik zuständig sind. Diese Neurone sind besonders große Zellen im Motorkortex. Ihre Axone bilden die Pyramidenbahn und projizieren zum einen in das Vorderhorn des Rückenmarks und zum anderen in die motorischen Kerne des Stammhirns.

Die Zellkörper des zweiten Motoneurons befinden sich im Vorderhorn der grauen Substanz. Seine Axone verlassen den Wirbelkanal über den Spinalnerv und ziehen dann zu den von ihnen innervierten Muskeln. Die Zellkörper für die Muskulatur des Kopfes liegen allerdings in den motorischen Kernen der Hirnnerven im Hirnstamm.

1.1 MND beim Menschen

In Abhängigkeit der betroffenen Motoneuron-Gruppe entwickeln sich verschiedene Krankheitsbilder, welche erworben oder hereditär sein können.

Zu den spontan auftretenden Erkrankungen gehören unter anderem die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), welche zu 90% spontan auftritt, und die Progressive Muskelatrophie (PMA). Die ALS wirkt sich auf das obere und untere motorische Neuron aus (s. 1.1), die PMA hingegen entsteht durch eine progrediente Degeneration des zweiten Motoneurons und führt zu fortschreitenden Paresen der Extremitäten und einem Hypoventilationssyndrom ⁶.

Die restlichen 10% der ALS-Fälle sind auf hereditäre Ursachen zurückzuführen (s. 1.1).

Zu den hereditären Motoneuronerkrankungen gehört außerdem die spinale Muskelatrophie (SMA), welche dominant-rezessiv vererbt wird und das zweite Motoneuron betrifft (s.1.2).

Die hereditäre spastische Paraplegie (HSP) stellt eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe dar, die durch spastische Schwäche der unteren Gliedmaßen charakterisiert wird. Genetisch konnten alle Vererbungsgänge für HSP beschrieben werden ^{7, 8}. Sie entsteht durch Schädigung des ersten Motoneurons. Ihr gängiges pathologisches Merkmal ist eine retrograde Degeneration der langen Nervenfasern in den kortikospinalen Bahnen ^{9, 10}.

Die hereditäre spastische Spinalparalyse entsteht ebenfalls durch Schädigung des ersten motorischen Neurons. Sie wird meist autosomal-dominant, manchmal autosomal-rezessiv vererbt und ist durch eine in der ersten Lebenshälfte einsetzende, allmählich progrediente Spastizität der Beine charakterisiert ¹¹.

1.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist eine spät auftretende, progressive, neurodegenerative Erkrankung des oberen und unteren Motoneurons. Die typischen klinischen Symptome sind fortschreitende Muskelschwäche bis hin zu Muskelatrophien, Spastiken und Paralysen, die durch die frühzeitige Degeneration und den Tod der Motoneurone hervorgerufen werden ¹². Betroffen sind das obere und das untere Motoneuron, aber auch etwa 30% der kleinen Interneurone im Motorkortex und Rückenmark unterliegen einer Degeneration ¹³.

In der heutigen Zeit gilt ALS als die häufigste Motoneuronerkrankung. Die Inzidenz beträgt 1 bis 2 Neuerkrankungen bei 100.000 Menschen pro Jahr, die Prävalenz liegt bei 4 bis 6. Klinisch beginnt die Krankheit im mittleren Alter zwischen 45 und 60 Jahren und führt durch ihren progredienten Verlauf meist nach ein bis fünf Jahren zum Tod, hervorgerufen durch die Denervation der Respirationsmuskulatur ¹². Oft entwickelt sich in Folge der Schluckmuskelatrophie zusätzlich eine Aspirationspneumonie ¹².

Der Anteil der sporadischen Inzidenzen (sporadische ALS/SALS) ohne genetischen Hintergrund ist mit 90% sehr groß. Nur 10% der Neuerkrankungen sind dominant vererbt (familiäre ALS/FALS). Klinisch unterscheiden sich die beiden Formen nicht voneinander¹⁴.

Histopathologisch weisen die Motoneurone von Hirnstamm und Rückenmark eine simple Atrophie, Schrumpfung und intrazytoplasmatische Lipofuszin Akkumulierungen auf, welche zum Zellverlust mit astrozytärer Gliose führen¹⁵. Die für ALS typischen Einschlusskörperchen (Bunina Bodies) sind häufig aufzufinden, Vakuolisierung der Motoneurone, zentrale Chromatolyse und Neuronophagie dagegen ein seltener Befund¹⁵. Diverse andere Arten von neuronalen Einschlüssen, manche in Abhängigkeit vom Alter¹⁶, konnten ebenfalls festgestellt werden, sowohl in den Vorderhornzellen, als auch in den Dorsalwurzelganglien und im motorischen Kern des zehnten Kopfnervs¹⁷.

Quantitative Studien zeigen einen signifikanten Verlust der großen Motoneurone im zervikalen¹⁸ und lumbalen¹⁹ Rückenmark mit einer parallelen Abnahme der entsprechenden Populationen an großen myelinisierten Fasern in der Ventralwurzel. Die Zahl der übrig bleibenden Motoneurone korreliert dann mit der Muskelkraft und –atrophie in den Gliedmaßen sowie mit der Dauer der Symptome²⁰. Der Verlust kleiner Motoneurone im zervikalen Rückenmark einiger ALS-Patienten suggeriert außerdem die Involvierung von γ -Motoneuronen – obwohl diese Meinung umstritten ist^{19, 21, 22}.

Im peripheren Nervensystem kommt es bei ALS zu einer merklichen Reduzierung in der Anzahl der großen myelinisierten Fasern in den Ventralwurzeln und im peripheren Nerven^{18, 23-25} und zu einer kräftigen Abnahme in der Gesamtanzahl myelinisierter Fasern^{19, 23-25}. Des Weiteren ist die G-Ratio im Vergleich zu Kontrollen im distalen Nervenbereich bis zu 34% größer²⁶, was das Vorhandensein von abnorm dünnen Myelinscheiden widerspiegelt. Diese Veränderungen verifizieren, zusammen mit der Abnahme an α -Motoneuronen im zervikalen und lumbalen Rückenmark, die selektive Verletzlichkeit der α -Motoneurone in ALS^{19, 27}.

Viele Versuche der Behandlung von ALS wurden in den letzten Jahren in Doppelblind- und Placebo-kontrollierten Studien gemacht. Die meisten stützten

sich in Anlehnung an vorangehende Tiermodelle auf den Einsatz von Wachstums- und trophischen Faktoren wie BDNF, IGF und CNTF, im humanen Versuch war allerdings keine von Erfolg gekrönt ²⁸⁻³¹. Derzeit gibt es nur ein Medikament, welches bei ALS Patienten eingesetzt wird. Riluzol (Rilutek®), ein Glutamatantagonist, dessen neuroprotektive Wirkung in Zellkultur und Tiermodellen bewiesen wurde, scheint die Überlebenszeit von ALS Patienten geringfügig zu verlängern ³²⁻³⁴. Allerdings wird von den behandelten Patienten keine offensichtliche Verbesserung der klinischen Symptomatik bemerkt. Weitere Therapieansätze liegen im Ersatz der degenerierten Motoneurone durch Stammzellen und in der weiteren Erforschung der Glutamat- und Neurofilamentproblematik.

1.1.2 Spinale Muskelatrophie

Proximale SMA ist nach der zystischen Fibrose die häufigste autosomal rezessiv vererbte Erkrankung beim Menschen, mit einer Inzidenz von 1:6000 (Häufigkeit der Träger 1 von 35). Außerdem ist sie die am weitesten verbreitete genetische Ursache für infantile Mortalität ³⁵. Die klinischen Hauptcharakteristiken der SMA - Atrophie der proximalen Muskeln von Stamm und Gliedmaßen und generalisierte Schwäche - werden durch die Degeneration der α -Motoneurone im Rückenmark ausgelöst ³⁵.

Es gibt zahlreiche andere SMA-Formen, welche einige Charakteristiken mit der proximalen SMA gemeinsam haben, sich jedoch genetisch und klinisch von ihr unterscheiden ³⁶⁻⁴¹.

Bei der proximalen SMA unterscheidet man vier Formen: Die akute infantile SMA (Typ I, Werdnig Hoffmann), welche 50% der SMA Fälle ausmacht, bereits in den ersten 6 Lebensmonaten beginnt und die schwerste Form darstellt; die chronisch infantile/intermediäre SMA (Typ II) mit einem milderem Verlauf und späteren Beginn (7.-18. Lebensmonat); die Juvenile SMA (Typ III, Kugelberg-Welander) mit vielfältigen Symptomen, mildem Verlauf und normaler Lebenserwartung und die Adulte SMA (Typ IV), welche erst in einem Alter von über 30 Jahren diagnostiziert wird und Muskelschwäche bei normaler Lebenserwartung aufweist ².

1995 wurde eine Mutation im Survival of Motor Neuron Gen (SMN1-Gen) als Ursache für SMA identifiziert. Es codiert für die Informationen zur Herstellung des SMN-Proteins, welches essentiell für das Überleben der Motoneurone im Rückenmark und im Hirnstamm ist. Bei 95% der SMA-Patienten ist es deletiert, bei den verbleibenden 5% durch Mutationen beeinträchtigt⁴². Diese Fehler im Genom werden autosomal rezessiv vererbt. SMN ist beim Menschen mit SMN1 in einer telomerischen Kopie und mit SMN2 in einer zentromerischen Kopie vorhanden. SMN2 ist bei allen SMA-Patienten intakt. Allerdings weist es durch einen Basenaustausch Defizite auf. Deshalb ist SMN2 nicht in der Lage, den SMN-Proteinspiegel hoch genug zu halten, um die Degeneration der Motoneurone zu verhindern³⁵.

Die histopathologischen Veränderungen der SMA umfassen einen markanten Verlust der großen Motoneurone im Rückenmark^{43, 44}, welcher sich besonders prominent im anteromedialen Bereich darstellt⁴⁵. In den verbliebenen Motoneuronen zeigen sich diverse Veränderungen in unterschiedlich starkem Ausmaß, so kommt es zu Schwellung und Chromatolyse von manchen Zellen, andere wiederum sind geschrumpft, kondensiert und extrem dunkel gefärbt^{43, 44, 46}.

Als Resultat des Vorderhornzell-Verlustes im Rückenmark gehen auch motorische Fasern im peripheren Nerv verloren, es kommt zur axonalen Degeneration von großen und kleinen myelinisierten Fasern^{43, 44, 46, 47}, und man sieht myelinisierte Fasern mit disproportional dünner Myelinscheide^{26, 43}.

1.2 MND beim Tier

Auch beim Tier gibt es verschiedene neurodegenerative Erkrankungen, welche interessanterweise klinisch und morphologisch große Ähnlichkeit mit ihren humanen Gegenstücken aufweisen.

Die Kanine Degenerative Myelopathie (DM) ist seit langer Zeit als spontan auftretende Rückenmarkserkrankung bei Hunden bekannt⁴⁸. Die Krankheit beginnt im Alter von 8 Jahren mit einer spastischen und generellen propriozeptiven Ataxie in den Beckengliedmaßen⁴⁸⁻⁵⁵. Im Anfangsstadium deuten die erhaltenen spinalen Reflexe auf ein Geschehen im oberen

motorischen Neuron hin⁴⁸. Im weiteren Verlauf entwickelt sich die anfangs oft beobachtete asymmetrische Schwäche zu einer Paraplegie, in späteren Stadien kommt es zur spinalen Hyporeflexie^{48, 49, 51, 53, 55}.

Die klinische Phase kann bis zu 3 Jahre andauern, meistens wird aber nach einem halben bis einem Jahr, wenn die Hunde paraplegisch werden, von den Besitzern eine vorzeitige Euthanasie gewünscht. Lässt man die Krankheit weiter fortschreiten, so werden auch die Vordergliedmaße involviert, und es kommt zu einer schlaffen Tetraparese^{48, 51, 53}.

Da es durch Kompressions-Syndrome im Rückenmark zu ähnlichen Symptomen kommt, kann eine definitive Diagnose erst postmortem durch die histopathologische Feststellung von Axon- und Myelin-Degeneration im Rückenmark gestellt werden⁵³⁻⁵⁵. Außerdem findet man durchgehend SOD1-positive zytoplasmatische Einschlüsse im Rückenmark⁵⁶.

Zu den am häufigsten betroffenen Rassen zählt der Deutsche Schäferhund, der Boxer, der Rhodesian Ridgeback und der Pembroke Welsh Corgi⁵⁶. Bei diesen Rassen konnte kürzlich eine spontane autosomal-rezessive SOD1-Mutation als Ursache für die DM ausgemacht werden⁵⁶. Somit ist die Kanine DM das erste spontan auftretende Tiermodell für ALS.

Die equine Motor Neuron Disease (EMND) ist eine Motoneuronerkrankung bei Pferden, die sich in einer rapiden Muskelatrophie und Kachexie trotz normalem bis gesteigertem Appetit und progressiver Schwäche äußert⁵⁷. Die EMND tritt sporadisch bei Pferden jeden Alters und aller Rassen auf⁵⁸. Die Ätiologie ist noch nicht geklärt, es werden aber Zusammenhänge mit oxidativer Schädigung und Vitamin E-Defiziten vermutet^{59, 60}.

Eine spontane neurologische Erkrankung wurde in Yorkshire Schweinen gesehen. Charakteristische klinische Merkmale waren eine initiale bilaterale Ataxie der Hintergliedmaße und Schwäche, welche sich rapide zu einer Tetraplegie entwickelten. Histopathologisch konnten neuronale Chromatolyse und Degeneration in den motorischen Kernen der Ventralhörner beobachtet

werden⁶¹.

Ein fast identischer Krankheitsverlauf wurde in einer spontanen Erkrankung des unteren motorischen Neurons bei Kaninchen beobachtet. Betroffen waren 6 bis 8 Wochen alte Tiere beider Geschlechter, die initial eine Schwäche der Hintergliedmaßen aufwiesen, welche sich innerhalb weniger Wochen zu einer Tetraplegie ausbildete. Es konnten ebenfalls eine neuronale Degeneration und ein Zellverlust in den Ventralhörnern des Rückenmarks und des Hirnstamms ausgemacht werden. Die Tatsache, dass alle betroffenen Tiere vom selben Vätertier abstammten, macht einen genetischen Hintergrund wahrscheinlich⁶².

Die hereditäre kanine SMA (HCSMA) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung bei Brittany Hunden (Bretagne Spaniel). Der Schweregrad der Erkrankung variiert von einer milden Arbeitsintoleranz bis hin zur Tetraplegie⁶³. Eine Atrophie von Zungen-, Kau- und Gesichtsmuskulatur wird ebenfalls mit HCSMA in Verbindung gebracht⁶⁰. Die Erkrankung wird, ähnlich wie die humane SMA, in verschiedene Schweregrade unterteilt und ihre pathologischen Läsionen liegen hauptsächlich in den Motoneuronen von Hirnstamm und Rückenmark⁶³.

Auch bei domestizierten Katzen wurde eine autosomal-rezessive Form der spinalen Muskelatrophie beobachtet. Sie geht mit einem Verlust der Motoneurone im Rückenmark sowie einer neurogenen Muskelatrophie und Muskelschwäche einher. Die Krankheit beginnt im 3. bis 4. Lebensmonat, der Verlauf wird als langsam progressiv beschrieben und gleicht phänotypisch einer milden Form der humanen SMA⁶⁴. Die genetischen Ursachen liegen allerdings – anders als beim Menschen - nicht in einer Mutation des SMN-Gens, sondern in einer Deletion im LIXI-Lokus^{65, 66}.

Eine weitere hereditäre Motoneuronenerkrankung ist die bovine SMA. Sie wird durch eine schwere, SMA-ähnliche Erkrankung bei Kälbern charakterisiert,

welche innerhalb weniger Wochen nach der Geburt sterben und neuropathologische Hinweise auf einen spinalen Motoneuronverlust aufweisen⁶⁷. Auch hier liegt die Ursache der dominant-rezessiv vererbten Erkrankung nicht im SMN-Gen, sondern im bovinen Chromosom 24. Eine Mutation im Bcl-2 Gen, welches dort beherbergt ist, wurde deshalb als Krankheitsursache vermutet⁶⁸, aber auch eine missense Mutation im Gen der 3-Ketodihydrosphingosin-Reduktase (FVTI) wird diskutiert⁶⁶.

1.3 Experimentelle Mausmodelle

Von MND-Mausmodellen erhofft man sich wichtige Informationen, die zur besseren Diagnostik und zu möglichen Therapieansätzen dieser Erkrankungen beitragen können.

1.3.1 SOD1-Mausmodell

20% der FALS-Fälle, also 2% aller ALS Erkrankungen, sind auf eine Mutation im SOD1-Gen, welches für das Enzym Cu/Zn Superoxid-Dismutase codiert, zurückzuführen. SOD1 zerstört Superoxide durch Konvertierung in Wasserstoff und Sauerstoff. Es gibt zahlreiche Tiermodelle, in denen die SOD1 mutiert oder gar deletiert ist^{69, 70}.

Das erste SOD1-Modell, die SOD1^{G93A}-Mäuse, besitzt eine mutierte Version von SOD1 und entwickelt innerhalb weniger Monate nach der Geburt eine Paralyse der Hintergliedmaße mit Muskelatrophie. Die Krankheitsprogression schreitet schnell fort und führt nach kurzer Zeit zum Tod der Tiere. Histopathologisch zeigen sie eine neurogene Muskelatrophie und einen Verlust der großen Vorderhornzellen⁷¹.

Auf welche Weise die Schädigung der Motoneurone in SOD1-Modellen geschieht, wird noch diskutiert. Erstaunlicherweise zeigte sich, dass der vollständige Verlust der Dismutaseaktivität allein nicht zur Motoneurondegeneration führte und die Tiere ein normales Lebensalter entwickelten⁷². Außerdem korrelierte weder das Alter bei Krankheitsbeginn noch die Schwere der Erkrankung mit der Dismutaseaktivität^{73, 74}. Daraus kann man schließen, dass die Mutanten, unabhängig von der jeweiligen SOD1-Aktivität, toxische

Eigenschaften entwickelt haben.

Erklärungsmodelle für die Toxizität von mutierter SOD1 sind zahlreich vorhanden. Dazu zählt die ineffiziente Kooperation von SOD1 und Kupfer als möglicher Grund von Schädigung durch oxidative Vorgänge⁷⁵⁻⁷⁸.

Ein weiterer Überlegungsansatz ist die schädigende Aggregatbildung durch missgefaltetes SOD1. Aggregate sind bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen ein pathologisches Kennzeichen und konnten sowohl in SALS und FALS-Fällen als auch bei transgenen Mäusen mit mutierter SOD1 gefunden werden^{14, 69, 71, 79-82}.

Auch Störungen in den Funktionen von Golgi Apparat, endoplasmatischem Retikulum und besonders Mitochondrien werden als möglicher Schädigungsmechanismus der SOD1 in Betracht gezogen⁸³⁻⁸⁸.

Außerdem ist seit einiger Zeit bekannt, dass die neuronale Degeneration auch durch Glutamat-medierte toxische Erregung verursacht werden kann, was einen Hinweis auf eine Störung im glialen Glutamat Transporter EAAT2 gibt, welcher eine besondere Rolle in Motoneuronen spielt⁸⁹⁻⁹⁷. Es zeigte sich, dass das EAAT2-Protein in SOD1^{G93A}-Mäusen im Ventralhorn des lumbalen Rückenmarks progressiv zurückgeht⁹⁸.

Vieles deutet daraufhin, dass die neuronale Degeneration bei ALS und Erkrankungen mit mutierter SOD1 auch auf programmierten Zelltod zurückgeführt werden kann⁹⁹.

Transfektionsstudien mit neuronalen Zellkulturen zeigen den proapoptotischen Effekt von mutierter SOD1⁷⁹. Desweiteren wurden Kennzeichen für Apoptose wie DNA-Fragmentierung, Caspase-Aktivierung und veränderte Expression von Mitgliedern der Bcl-2-Familie im Rückenmark von SOD1-Mauslinien gefunden¹⁰⁰. Im Speziellen konnte in symptomatischen SOD1^{G93A}-Mäusen eine reduzierte Expression von Bcl-2 und Bcl-xL festgestellt werden, während die Expression der proapoptotischen Faktoren Bad und Bax erhöht war. Ein weiteres Zeichen für die Rolle von Bcl-2 in ALS zeigt eine Studie, in welcher die Überexpression von Bcl-2 den Krankheitsbeginn in SOD1^{G93A}-Mäusen um über einen Monat verlängert¹⁰¹.

Eine spezielle Rolle in SOD1-Mutanten wurde außerdem den Caspasen zugeschrieben¹⁰²⁻¹⁰⁵. In SOD1^{G93A}, SOD1^{G37R} und SOD1^{G85R}-Mäusen konnte Caspase-1 und -3 Aktion in Motoneuronen und Astrozyten dokumentiert werden¹⁰²⁻¹⁰⁴. Intraventrikuläre Gabe eines Caspase-Inhibitors¹⁰² und die Expression einer dominanten inhibitorischen Caspase-1¹⁰⁵ führten zur Verlangsamung der Krankheitsprogression.

Ein, besonders im Hinblick auf die vorliegende Studie, wichtiger Aspekt ist der gestörte axonale Transport. Motoneurone mit ihrer besonderen Größe und speziellen metabolischen Aktivität, sowie ihrer Abhängigkeit von trophischen Faktoren aus der Peripherie, scheinen auf Defekte im axonalen Transport besonders verletzlich zu reagieren.

Veränderungen in der axonalen Struktur sind sowohl beim ALS Patient als auch bei mutanten SOD1-Mäusen dokumentiert^{69, 82, 85, 106, 107}. Besonders auffällig ist die ungewöhnliche Ansammlung von Neurofilamenten. Transgene Mäuse mit einer Punktmutation in NF-L entwickeln eine MND¹⁰⁸. Außerdem zeigte sich, dass Neurofilament-Ansammlungen auch im frühen Krankheitsstadium von SOD1-Mäusen auftreten⁸⁵. Es ist bewiesen, dass die Geschwindigkeit des langsamen axonalen Transports durch Neurofilamente verringert wird¹⁰⁹. Diese Verlangsamung im axonalen Transport ist abhängig vom Phosphorylierungszustand der Neurofilament-Seitendomänen¹¹⁰. Die Seitendomänen unterstützen die intraaxonalen Querverlinkungen von benachbarten Filamenten. Ersetzt man das Gen, welches für die phosphorylierten Seitendomänen von NF-H und NF-M codiert, wird der durch mutierte SOD1 hervorgerufene Krankheitsverlauf deutlich verlangsamt¹¹¹. Dazu passend wurde ein präsymptomatisches Defizit im langsamen axonalen Transport bei SOD1-Mäusen entdeckt^{109, 110, 112}. Auch eine Hemmung des axonalen Dynein-Transports durch Überexpression von Dynamitin führte zur MND¹¹³.

1.3.2 Mnd-Mausmodell

Das *Motor Neuron Degeneration* (Mnd) Mausmodell ist das Resultat einer spontanen Mutation in einem C57BL/6-Bestand und wird durch eine spät

einsetzende, progressive Degeneration des oberen und unteren Motoneurons gekennzeichnet. Die Mutation liegt im proximalen Chromosom 8 und wurde ursprünglich als spontane, im Erwachsenenalter beginnende neurologische Erkrankung mit ersten Symptomen im Alter von ca. 6 Monaten charakterisiert¹¹⁴. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelte sich eine totale spastische Paralyse und die Tiere verstarben frühzeitig¹¹⁵.

Histopathologisch zeigen sich beträchtliche Veränderungen in den Motoneuronen des Rückenmarks (erst lumbal und dann zervikal), in den motorischen Kopfnerven (besonders in X und XII) und in manchen oberen Motoneuronen¹¹⁶. Auffallend ist die enorme Ähnlichkeit zur humanen ALS-Pathologie. Die degenerierten Motoneurone zeigen charakteristischerweise zahlreiche Einschlusskörperchen im Soma¹¹⁶, welche zum Teil Ubiquitin enthalten¹¹⁷. In diesen Zellen kann man außerdem ein vermehrtes Auftreten von phosphorylierten Neurofilamenten beobachten, sowie eine Umverteilung aller Arten von Neurofilamentproteinen zu den Zellrändern¹¹⁸.

Seit in weiteren Studien die perfekte Eignung von Mnd-Mäusen als Modell für neuronale Ceroid-Lipofuszinose postuliert wurde, hat es an Bedeutung als MND-Modell verloren^{119, 120}.

1.3.3 Mausmodelle für SMA

Mäuse haben ein einziges SMN-Gen, welches dem SMN1-Gen des Menschen sehr ähnelt. Schrank et al. kreierten ein Smn Knockout Mausmodell, in welchem sich zeigte, dass homozygot befruchtete Eier ($Smn^{-/-}$) schon vor der Einnistung in den Uterus absterben¹²¹. Dies zeigt die absolute Notwendigkeit von Smn für alle Zelltypen.

Zur präziseren Nachempfindung der genetischen Situation von SMA-Patienten und der Rolle von SMN2 als mögliches Ziel für neue Therapien, wurden transgene Mäuse generiert, die den kompletten humanen SMN2-Lokus enthalten^{122, 123}. Diese grundlegenden Beobachtungen zeigten, dass SMN2 fähig ist, die embryonale Letalität von $Smn^{-/-}$ Mäusen zu komplementieren und dass die Anzahl der SMN2-Kopien invers mit der Schwere des

Krankheitsverlaufs korreliert.

Beide Modelle entsprechen der Typ-I Erkrankung bei Kleinkindern. Eine Zählung der Motoneurone im Rückenmark ergab keinen Verlust am ersten Lebenstag, zeigte aber nach 5 Tagen einen Verlust von 35% der Zellen¹²³. Ein signifikanter Verlust von Motoneuronen im lumbalen Rückenmarkssegment zeigt sich auch bei $Smn^{+/-}$ Mäusen, die nur 50% des SMN-Protein produzieren. Sie verlieren bis zum Alter von 6 Monaten 40% der Motoneuronen und 50% mit einem Jahr¹²⁴.

Durch Einfügen von zusätzlichen Transgenen, die Wildtyp-Isoformen oder schwächere mutante Formen von SMA expressieren, wurden Tiere mit der intermediären oder milden Form von SMA erzeugt^{125, 126}. Bei der intermediären Form ($SMN\Delta7^{+/+}$; $SMN2^{+/+}$; $Smn^{-/-}$) wurde die Lebensspanne durch ein Transgen, welches die $SMN\Delta7$ Komplementär DNA exprimiert, um ca. 8 Tage verlängert. Das klinische Bild der Mäuse im Alter von 5 Tagen zeigte im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern kleine Tiere, welche Probleme beim Laufen und in der Körperhaltung hatten. Sie zeigten einen abnormen Gang und zitternde Hinterbeine. Die Zahl der Motoneurone im Rückenmark war am Tag 3 noch normal, am Tag 9 aber signifikant reduziert¹²⁵.

Monani et al. kreierten ein Modell der milden SMA. Eine milde Typ III SMA Mutation (A2G) wurde als hemizygoten Transgen im Hintergrund der Modellmaus der SMA Typ I exprimiert ($SMNA2G^{+/-}$, $SMN2^{+/-}$, $Smn^{-/-}$). War $SMN2$ präsent, verzögerte das A2G-Transgen den Beginn des Motoneuronverlustes und erzeugte Mäuse, die zwar elektromyographische Abnormalitäten zeigten, welche aber klinisch nur einen milden Phänotyp aufwiesen und ein Alter von ca. 8 Monaten erreichten¹²⁶.

2. Das *Cra1*-Mausmodell

Dem *Cramping1* (*Cra1*)-Mausmodell, an Tieren mit dem genetischen Hintergrund C3H, liegt eine Mutation in dem Dynein-Gen *Dnchc1* (*Dynein cytoplasmic heavy chain 1*) zugrunde. Dieses experimentelle Modell wurde im Rahmen des ENU Mutagenese Screens entdeckt ^{127, 128}.

Es basiert auf einem Ethylnitrosoharnstoff (ENU) induzierten Basenaustausch an Position 1055 des zytoplasmatischen Dyneins der Maus. Bei diesem Defekt in der *Dynein Heavy Chain* (DHC) handelt es sich um eine autosomal-dominant vererbte Punktmutation in der Cargo Bindungs Domäne der *Heavy Chain*, die die Homodimerisierung der DHC beeinträchtigt, aber keinen Einfluss auf die Anzahl der Heavy und Intermediate Chains hat ¹²⁹.

Ein phänotypisch ähnliches Modell, das durch die abnorme Beinhaltung beim Anheben am Schwanz charakterisiert ist und deshalb den Namen *Legs at odd angles* (*Loa*) trägt, weist ebenfalls einen DHC-Defekt auf, lediglich an einer anderen Stelle des Genoms ¹²⁹.

Sowohl *Cra1* als auch *Loa* sind, bei heterozygotem Genotyp, durch eine milde Form der Motoneuronenerkrankung gekennzeichnet, welche Ähnlichkeiten zur humanen ALS-Pathologie, wie zum Beispiel altersabhängigen Muskelschwund und Einschränkung der motorischen Fähigkeiten aufweist ^{129, 130}.

Hafezparast et. al und Ahmad-Annuar et al. präsentierten 2003 erstmals das *Cra1*- und *Loa*-Modell und postulierten den Gedanken von mutantem Dynein und dem dadurch gestörten axonalen Transport als Ursache einer selektiven Motoneurondegeneration ^{129, 131}.

Der Dynein Defekt der *Cra1* Mäuse führt zu einer Motoneurondegeneration, die einen progressiven Verlust im Muskeltonus, Paresen und neurogene Atrophie, sowie eine gestörte Lokomotion bei heterozygoten Tieren hervorruft. Die Lebenserwartung dieser Tiere ist aber normal. Klinische Folgen der Mutation zeigen sich bereits am 10. Tag nach der Geburt. Wenn die Mäuse am Schwanz hoch gehoben werden, zeigen sie ein krampfartiges Anziehen der Hinterbeine an den Körper ¹³⁰.



Abb. 1: *Cra1*-Maus mit atypischer Haltung der Hintergliedmaßen bei TailSuspension

Homozygote *Cra1*-Mäuse sind dagegen bewegungsunfähig und können nicht saugen. Sie sterben deshalb innerhalb von 24 Stunden nach der Geburt ¹²⁹.

Bei der histologischen Untersuchung von homozygoten *Cra1* (*Cra1^{+/+}*) Embryonen (Tag 18,5) entdeckten Hafezparast et al. einen bis zu 80 prozentigen Motoneuronverlust im Vorderhorn des Rückenmarks. Die TUNEL-Färbung enthüllte eine erhöhte Apoptoserate in den Vorderhörnern. In den überlebenden Neuronen des Spinalganglions der *Cra1^{+/+}*-Mäuse und in den Vorderhornzellen der *Loa*-Tiere wurden zudem Lewy-ähnliche intrazelluläre Einschlußkörperchen mit Ubiquitin, SOD1 CDK5 und Neurofilament Einlagerungen entdeckt, welche in ähnlicher Form auch bei humaner ALS gefunden werden (Bunina Bodies) ¹²⁹.

Als Ursache für die Motoneurondegeneration diskutierten die Autoren eine durch den gestörten axonalen Transport permanent reduzierte Versorgung mit trophischen Faktoren, wie z.B. NGF ¹²⁹. Dieses Konzept bleibt bislang aber unbewiesen.

2.1 Untersuchungen am *Cra1*- und *Loa*-Mausmodell

2005 kreuzten Kieran et al. SOD1^{G93A}-Mäuse mit *Loa*-Mäusen und untersuchten den Effekt auf die Lebenserwartung und den Krankheitsverlauf¹³². SOD1^{G93A} haben eine verkürzte Lebensspanne von ca. 125 Tagen, die Lebenserwartung von *Loa*-Mäusen ist dagegen normal. Die Ergebnisse zeigten einen verzögerten Krankheitsbeginn mit einem signifikanten Aufschub im Körpergewichtsverlust und eine verlängerte Lebensdauer von rund 28% auf 160 Tage bei *Loa*/SOD1^{G93A}-Tieren. Außerdem ging eine vorher aufgetretene Muskelschwäche im M. extensor digitorum longus der SOD1^{G93A}-Mäuse bei den *Loa*/SOD1^{G93A}-Tieren verloren. Des Weiteren wurde der Motoneuronverlust im Rückenmark von gekreuzten Tieren signifikant abgeschwächt¹³².

Eine spezielle Untersuchung des axonalen Transports wurde mit einem retrograden in vitro Transport-Assay, basierend auf dem Carboxy-End-Fragment des Tetanus-Neurotoxins, welches speziell an Motoneurone bindet, durchgeführt. Es zeigte sich, dass in SOD1^{G93A}-Motoneuronen ein Defizit in der Transportfrequenz und -geschwindigkeit vorliegt. Auf der anderen Seite ergab sich ein normales Transportprofil in *Loa*-Motoneuronen. Erstaunlicherweise wurde in *Loa*/SOD1^{G93A}-Zellen das Defizit der SOD1^{G93A}-Mäuse komplett behoben¹³².

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der Beginn und die Progression der Erkrankung von SOD1^{G93A}-Mäusen durch die Störung im retrograden axonalen Transport verzögert werden¹³².

Eine nachfolgende Studie von Teuchert et al. ergab ähnliche Befunde¹³³. Sie kreuzten *Cra1*/+ mit SOD1^{G93A}-Mäusen, um zu verifizieren, dass die von Kieran et al. publizierten Ergebnisse nicht auf die *Loa*-Mutation reduziert sind, sondern generell auf dem Prinzip der gestörten Dynein Funktion basieren.

Sie beobachteten bei den *Cra1*-Mäusen eine normale Lebenserwartung und ein mit gesunden Tieren vergleichbares Körpergewicht.

Versuche auf dem Rotarod ergaben allerdings eine, im Vergleich zu den Wildtypen, reduzierte motorische Aktivität der *Cra1*-Tiere. Die SOD1-Mäuse hatten von Beginn an ein reduziertes Körpergewicht, eine verringerte Motorik und ihre Lebensspanne war mit ca. 147 Tagen deutlich verkürzt.

Übereinstimmend mit den Studien von Kieran et al. zeigten die *Cra1/SOD1*-Mäuse einen milderen Phänotyp als die Tiere mit reiner SOD1-Dysfunktion. Sie lebten im Durchschnitt 20 Tage länger und zeigten eine verzögerte Krankheitsprogression. Das Körpergewicht war während der gesamten Untersuchungsperiode signifikant höher. Die SOD1-Mäuse zeigten zwar in der präsymptomatischen Phase eine bessere Motorik, diese nahm dann aber im Vergleich zu den doppelheterozygoten Tieren schneller ab. Neuropathologische Untersuchungen des zervikalen und lumbalen Rückenmarks enthüllten eine dramatische Motoneurondegeneration in *Cra1/SOD1*- und SOD1-Mäusen.

Das Gewebe beider Gruppen zeigte qualitativ SOD1-typische Befunde wie Astrozytose und Vakuolisierung der grauen Substanz. Desweiteren wurde eine signifikante Abnahme der Motoneurone ermittelt (ca. 50% zervikal und 60% lumbal).

Die Daten demonstrieren, dass die *Cra1*-Mutation im *Dnchc1* den Phänotyp von SOD1^{G93A}-Mäusen eindeutig abschwächt. Im Vergleich zu den *Loa/SOD1*-Mäusen waren die Verbesserungen in den *Cra1/SOD1*-Mäusen allerdings geringer ausgeprägt.

Ilieva et al. führten 2008 weitere Untersuchungen am *Loa*-Modell und an einem weiteren Mausmodell mit mutierter Dynein *heavy chain*, *Sprawling (Swl)* durch. Ihre Ergebnisse widersprachen allerdings dem von Hafezparast et al. gefundenen α -Motoneuronverlust. Ihre Untersuchungen zeigten in keinem Lebensalter der Tiere eine Degeneration oder einen Verlust von α -Motoneuronen. Stattdessen demonstrierten sie einen, wahrscheinlich durch die Dynein-Mutation verursachten Verlust an sensorischen Axonen und eine verminderte Anzahl an γ -Motor Axonen, welche die Muskelspindeln innervieren. Als mögliche Ursache zogen auch sie die verminderte neurotrophische Unterstützung, speziell von Neurotrophin-3 (NT-3) in Betracht. NT-3 Knockout Mäuse zeigen einen selektiven Verlust von propriozeptiven Afferenzen und Muskelspindeln, begleitet von einem frühen postnatalen Tod¹⁰⁸, ähnlich wie im Krankheitsverlauf von homozygoten *Cra1*- und *Loa*-Mäusen.

Kurz nach Ilieva et al. führte eine weitere Gruppe fast identische Untersuchungen am *Cra1*-Modell durch ¹³⁴. Unter anderem zählten sie die Motoneurone im Ventralhorn des lumbalen Rückenmarks und führten eine retrograde Markierung der kortikospinalen Motoneurone durch.

Ihre Ergebnisse zeigten keinerlei muskuläre Anzeichen auf Zerstörung der Motoneurone, die neuromuskulären Endplatten der *Cra1*-Mäuse waren normal ausgebildet und weder die oberen noch die unteren Motoneurone waren degeneriert. Stattdessen postulierten sie, ähnlich wie schon Ilieva et al. ¹³⁵, eine propriozeptive sensorische Neuropathie. Die Dorsalwurzeln der *Cra1*-Mäuse waren im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwistern durch eine Verminderung von Anzahl und Dichte der Axone kleiner. Sie bezeichneten deshalb das Krankheitsbild der *Cra1*-Mäuse als eine (im Vergleich zu *Loa* und *Swl*) milde periphere Neuropathie.

3. Axonaler Transport und seine Motorproteine

Motoneurone sind hochspezialisierte Zellen mit weitläufigen dendritischen Ausläufern und einem Axon, das, je nach Spezies, bis zu einem Meter lang werden kann ¹¹³. Zur Überbrückung dieser weiten Distanzen ist ein aktiver Transport zwischen Zellkörper und Peripherie unerlässlich, um die metabolische Balance der Zelle zu garantieren. So werden Proteine und Organellen kontinuierlich zum Zellkörper hin und von diesem zum Axonterminal transportiert.

3.1 Das zelluläre Zytoskelett

Das Zytoskelett stellt die Leitschiene für den axonalen Transport dar. Es bildet eine strukturelle Unterstützung für das Neuron, bleibt aber trotzdem flexibel und ermöglicht der Zelle zu wachsen oder ihre Form zu ändern. Seine drei Hauptkomponenten sind Mikrotubuli, Aktin und Intermediärfilamente ¹³⁶.

Mikrotubuli werden durch die Polymerisierung von $\alpha\beta$ -Tubulin Dimeren gebildet. In nicht neuronalen Zellen und in sich entwickelnden Neuronen ist dieser Vorgang sehr dynamisch, bei älteren Neuronen kommt es zu Interaktionen mit MAPs (microtubule-associated proteins) und das Polymer wird stabiler. Die

Mikrotubuli sind im Axon in einer polaren Ausrichtung angeordnet, die + Enden der β -Tubuli zeigen nach außen, die Minusenden des α -Tubulin enden in der Zellmitte ¹³⁷.

Das Aktin-Zytoskelett bietet ebenfalls Stabilität und Dynamik. Aktin-Monomere formieren sich in einem flexiblen helikalen Polymer mit zwei verschiedenen Enden, eines wächst schnell, eines langsam. In der Zelle sind Aktinfilamente oft zu Netzwerken gebündelt. In sich entwickelnden Organismen sind sie zu enormen Wachstumsschüben fähig. Interagierende Proteine tragen zur Stabilisierung der Aktinfilamente bei ¹³⁷.

Die dritte Komponente stellen die intermediären Filamente, in adulten Neuronen hauptsächlich Neurofilamente, dar. Sie bilden sich aus drei Untereinheiten an Polypeptiden: NF-L, NF-M und NF-H. Sind sie einmal verbunden, durchlaufen sie keine Strukturänderungen mehr. Ihre Hauptfunktion ist die strukturelle Stabilisierung der Zelle und die Unterstützung des radiären Wachstums der Axone ¹³⁷. Die Aggregation von Neurofilamenten ist ein häufiger Befund in neurodegenerativen Erkrankungen, auch bei ALS ^{106, 138-140}.

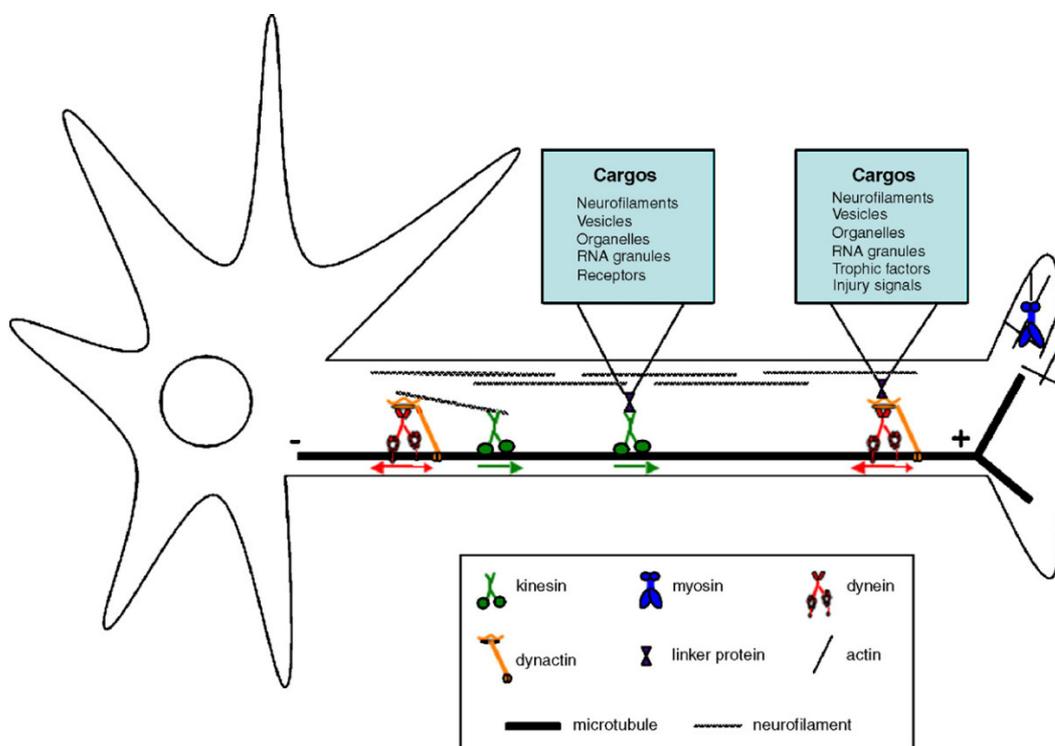


Abb. 2: Motorproteine und Transportgüter im Axon ¹³⁷

3.2 Motorproteine

Zusätzlich zu ihren strukturellen Aufgaben stellen sowohl Mikrotubuli als auch Aktin-Filamente aktive Leitschienen für gerichtete Bewegung zur Verfügung. Das polarisierte Mikrotubuli-Zytoskelett bietet weitläufige „Autobahnen“ für eine effiziente und gerichtete Bewegung von Transportgütern. Anterograder Transport bringt neu synthetisiertes Material aus dem Zellkörper am Axon entlang, retrograder Transport steuert die Bewegung von Organellen, Vesikeln und Signalkomplexen von der Zellperipherie und vom distalen Axon zurück zum Zellzentrum.

Die wichtigsten Motoren für diesen Transport sind Kinesin und zytoplasmatisches Dynein. Die Kinesin-Superfamilie sind anterograde Motoren, welche für den Transport vom Zellkörper Richtung Axonterminal zuständig sind, zytoplasmatisches Dynein mit seinem Aktivator Dynaktin ist hingegen für die retrograde Bewegung in Richtung Perikaryon verantwortlich. Im Gegensatz dazu bewegen Myosine ihr Transportgut entlang der Aktin-Filamente über kürzere Distanzen hinweg¹⁴¹.

3.2.1 Kinesin

Kinesin ist ein unidirektionaler Motor, welcher sich in Richtung des positiven Pols anterograd an den Mikrotubuli entlang bewegt. Es besteht aus zwei *Heavy Chains* und zwei *Light Chains*. Die *Heavy Chains* enthalten beide eine N-Terminal Motordomäne und formen einen kugelförmigen Kopf. Diese zwei Köpfe bewegen sich mit einer hohen Prozessivität in einem abwechselnd überkreuzenden Mechanismus am Mikrotubulus entlang.

3.2.1.1 Kinesin basierte Mausmodelle

Zhao et al. entdeckten, dass Mäuse, die nur eine einzelne Kopie des KIF1B β -Gens besitzen, eine chronische Neuropathie entwickeln¹⁴².

Eine weitere Gruppe fand heraus, dass der pränatale Verlust von KIF5A letal ist und die postnatale Inaktivierung der Genexpression in Neuronen zur Hemmung des Neurofilament Transports, Reduktion der Axongröße in sensorischen

Neuronen und zu altersabhängiger neuronaler Degeneration führt¹⁴³.

3.3 Der zytoplasmatische Dyneinkomplex

Zytoplasmatisches Dynein bewegt sich retrograd in Richtung des negativen Pols am Mikrotubulus entlang und bewegt so Transportgüter von der Zellperipherie in ihr Zentrum. Diese Tatsache suggeriert eine Schlüsselrolle für Dynein in der retrograden Signalgebung, wie zum Beispiel für die von neurotrophen Faktoren induzierten Signalwege.

3.3.1 Aufbau und Funktion

Der zytoplasmatische Dyneinkomplex ist ein makromolekularer Komplex von ca. 1,2 MDa, zusammengesetzt aus verschiedenen Untereinheiten, deren molekulare Massen von 8 bis 530 kDa reichen. Ein zytoplasmatischer Dyneinkomplex beim Säugetier enthält typischerweise zwei identische *Heavy Chains* von ungefähr 530 kDa. Die *Heavy Chains* binden das zytoplasmatische Dynein am Mikrotubulus und hydrolysieren ATP, um die Kraft zur Bewegung des Komplexes entlang des Mikrotubulus zu generieren. Es gibt zwei 74 kDa *Intermediate Chains* pro Dyneinkomplex. Sie sind an der Basis des Komplexes lokalisiert und essentiell für die Bindung des Transportgutes. Außerdem gibt es vier *Light Intermediate Chains*, mit einer Masse zwischen 53 und 59 kDa und eine unterschiedliche Zahl an *Light Chains* mit einer molekularen Masse zwischen 10 und 13 kDa¹⁴⁴.

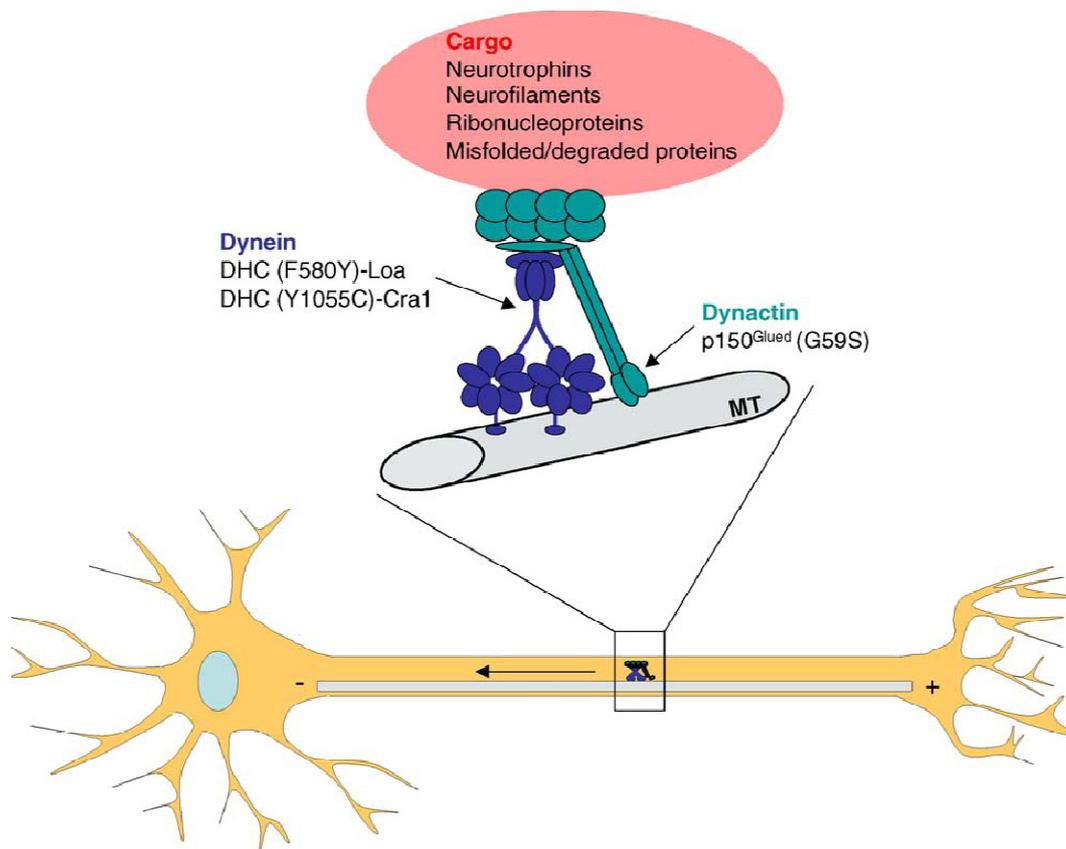


Abb. 3: Interaktion von zytosomatischem Dynein und Dynactin im Motoneuron-Axon ¹⁴⁵

Die Translokation von Dynein entlang der Mikrotubuli ist die Basis für eine Vielzahl essentieller zellulärer Bewegungen. Trotz einer normalen Domänenorganisation, die in allen zytoskeletalen Motoren vorkommt, hat Dynein strukturelle Eigenschaften, die es von den anderen Motoren unterscheiden. Diese umfassen eine Schienen-Bindungsseite (B-Link), die sich an der Spitze eines langen Vorsprungs befindet und sechs Nukleotid-Bindungs Moleküle (AAA Module), die zusammen den kugelförmigen Kopf des Dyneins formen.

Die Aufgabe von zytosomatischem Dynein umfasst neben dem retrograden axonalen Transport auch das Trafficking vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi Apparat, die Motilität von Endosomen und Lysosomen und die Spindelformierung. Eine der wichtigsten Aufgaben aber ist der Transport von trophischen Faktoren und Signalmolekülen in Neuronen.

Neuronale Differenzierung und Überleben sind abhängig vom retrograden Transport trophischer Faktoren wie NGF, NT-3 und -4 und BDNF, welche – oft in limitierter Menge - in den Zielgeweben synthetisiert werden. Diese *target-*

derived Neurotrophine binden an membrangebundene Rezeptoren. Diese sind entweder Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkA, B und C) oder der unspezifische p75-Rezeptor. Die Neurotrophin-Rezeptorkomplexe werden dann in Endosomen internalisiert und aktiv am Axon entlang zum Zellkörper transportiert¹⁴⁶. Zu diesem Zweck kolokalisieren Trks mit Dynein^{147, 148}. Ob die Neurotrophin-Rezeptorkomplexe ausschließlich dyneinabhängig am Axon transportiert werden können, ist noch nicht geklärt.

Alternative Modelle gehen zum Beispiel davon aus, dass die Neurotrophin Bindung an Trk-Rezeptoren eine Welle von Liganden-unabhängiger Phosphorylierung bis hin zum Zellkörper auslöst¹⁴⁹, wobei man berücksichtigen muss, dass die Geschwindigkeit dieser „Welle“ in einem Bereich liegt, welcher sich mit der Geschwindigkeit von Dynein deckt¹⁴⁶. Eine Beteiligung von Dynein bleibt also sehr wahrscheinlich.

3.3.1.1 Dynein *Heavy Chain*

Die Dynein *Heavy Chain* (DHC) besitzt mit einer Länge von etwa 4600 Aminosäuren eine enorme Größe. Sie wird in verschiedene funktionelle Domänen unterteilt. Der am meisten divergierende Anteil ist das N-Terminal mit ca. 1300 Aminosäure Resten, welches die relativ kurze Seitendomäne formt. Interaktionen innerhalb dieser Region spielen eine wichtige Rolle in der *Heavy Chain* Dimerisierung, und durch die Bindung von Zusatzproteinen an diese Domäne kann die intrazelluläre Lokalisierung des Dyneins spezifiziert werden¹⁵⁰.

Die übrigen 3300 Aminosäurereste bilden den kugelförmigen Kopf als Motordomäne. Die Dynein Motordomäne ist in sechs AAA Module und den intramolekularen coiled-coil-B-link unterteilt. Die vier zentral lokalisierten AAA Moleküle enthalten P-Loop Motive, die in allen Dynein Sequenzen gut erhalten sind. Die Sequenz der ersten P-Loop (P1) ist die Seite der ATP Hydrolyse, die für die Bewegung zuständig ist und absolut konserviert ist¹⁵¹. Die nächsten drei AAA Moleküle (P2-P4) binden mit niedrigerer Affinität an Nukleotide und regulieren so die Funktion des Dyneins¹⁵². Die verbleibenden zwei AAA Moleküle liegen in der Nähe des C-Terminus.

Die Bindung von Dynein an die Mikrotubulioberfläche wird durch einen dünnen Stengel, den „B-Link“ am Kopf des Dyneins vermittelt ¹⁵³. Der B-Link liegt zwischen dem vierten und fünften AAA-Modul und enthält zwei α -Helices, welche durch Prolinreste gebunden werden und einen intramolekularen coiled-coil Stengel formen, der am kugelförmigen Kopf herausragt ^{154, 155}. Die Region zwischen den Helices formt eine Kugel an der Spitze des Stengels, der den Kontakt mit dem Mikrotubulus herstellt.

3.3.1.2 Dynactin

Dynactin ist ein Multiproteinkomplex, der als Aktivator-Komplex für Dynein bezeichnet wird, weil er bei der Regulierung der Dynein Aktivität mitwirkt und für die meisten Funktionen von Dynein benötigt wird ¹⁵⁶.

Es besitzt für manche motoneurondegenerative Erkrankungen hohe Relevanz ^{113, 157-159}.

Dynactin ist ein großes und komplexes Molekül, dessen Aufbau elf verschiedene Untereinheiten umfasst. Der charakteristische Teil von Dynactin ist das Aktin ähnliche Filament, welches die Basis des Komplexes formt, zusammengesetzt aus dem Aktin ähnlichen Protein Arp1 ¹⁶⁰. Aus diesem Filament ragt ein Dimer eines erweiterten coiled-coil Proteins hervor, p150Glued ¹⁶¹. Dieses bindet direkt an zytoplasmatisches Dynein und an Mikrotubuli ^{162, 163}. Dynactin ist also notwendig für den von Dynein mediierten retrograden Transport und hilft bei der Bindung von spezifischem Cargo, indem er die Verbindung zwischen ihm und Dynein herstellt. Außerdem steigert er die Prozessivität und Effizienz des molekularen Dyneinmotors ¹³⁷.

3.3.1.3 Dynein und Motoneurondegeneration

Die Hypothese des gestörten axonalen Transports als Teil der Pathogenese motoneurondegenerativer Erkrankungen wurde, im Hinblick auf Dysfunktionen im Dyneinkomplex, schon von mehreren Gruppen überprüft.

Dass Dynein ein lebenswichtiges Molekül ist, bewiesen Harada et al. 1998, in dem sie Dynein-Knockout-Mäusen generierten, welche schon embryonal

verstarben ¹⁶⁴.

LaMonte et al. ¹¹³ erzeugten 2002 ein Mausmodell, bei welchem der Dynein-mediierte axonale Transport durch eine Dynamitin Überexpression unterbrochen wird. Die Überexpression der Dynamitin p50 Untereinheit des Dynactins verursacht die Ablösung des Dynactins an der Verbindungsstelle von p150^{Glued} und dem Arp1-Filament ^{165, 166}. Dadurch wird Dynactin unfunktionell, und Dynein-mediierte Prozesse in der Zelle werden gehemmt. Die betroffenen Mäuse zeigen im fünften bis neunten Lebensmonat erste Symptome und weisen den Phänotyp einer spät einsetzenden und langsam fortschreitenden Motoneuronerkrankung auf. Das klinische Bild äußert sich in einer Schwäche der Hintergliedmaßen mit spontanem, teilweise spastischem Tremor, Gewichtsverlust, verminderter Fertilität und einem abnormen Gangbild.

Wie die *Cra1*-Mäuse konnten die Tiere ihre Hinterbeine nicht ausstrecken, wenn man sie an der Schwanzwurzel hochhält.

Das oben genannte p150^{Glued}, die größte Untereinheit von Dynactin, scheint ebenfalls eine Rolle bei Motoneurondegenerationen zu spielen. So wurde bei Familien mit einer langsam progressiven Form von Motoneurondegeneration eine Mutation in p150^{Glued} entdeckt ^{157, 158}. Durch weitere Untersuchungen von Puls et al. an dieser Familie wurde deutlich, dass die Dynactin-Mutation eine Art der Motoneurondegeneration verursacht, welche mit der Akkumulation von Dynein und Dynactin in neuronalen Einschlüssen einhergeht und welche in ihren klinischen Symptomen Ähnlichkeiten mit distaler spinaler und bulbärer Muskelatrophie aufweist ¹⁵⁹.

Ahmad-Annur et al. führten 2003, angestoßen durch die Veröffentlichung des *Cra1/Loa* Papers von Hafezparast et al. ¹²⁹, Untersuchungen des Dynein-Gens bei Patienten mit familiären Formen von ALS, SMA und hereditärer spastischer Paraplegie (HSP) durch ¹³¹.

Sie konzentrierten sich dabei auf Exon 8, 13 und 14 des DHC Gens (*Dnchc1*),

die Exons, welche auch in *Cra1* und *Loa* mutiert sind. Ihre Untersuchungen ergaben seltene Polymorphismen, welche aber sowohl in den Genen der Patienten, als auch in den Kontrollen gefunden wurden. Eine Assoziation zwischen DNCHC1 und ALS, SMA oder HSP konnte also nicht bewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde 2006 durch eine weitere Studie untermauert, in der eine Verbindung zwischen *Dnchc1* und sporadischer ALS nicht bestätigt wurde¹⁶⁷.

4. Neuronale Signaltransduktion

Zu den wichtigsten Gütern, die von Dynein in Neuronen transportiert werden, zählen die trophischen Faktoren und Signalmoleküle. Die Differenzierung und das Überleben von Neuronen ist abhängig vom Transport dieser Faktoren aus der Zellperipherie zurück zum Zellkörper. Aus diesem Grund könnte eine Unterbrechung dieses Transports – zum Beispiel durch die *Cra1*-Mutation - eine Degeneration der Motoneurone nach sich ziehen. Deshalb haben wir die Expression einiger Signalmoleküle und eines Neurotrophins in den α -Motoneuronen des Ventralhorns im Rückenmark der *Cra1*-Mäuse untersucht.

4.1 Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinasen

MAP-Kinasen sind evolutionär konservierte Enzyme, die Rezeptoren an Zelloberflächen mit wichtigen regulatorischen Zielen in den Zellen verbinden. Sie reagieren auf chemischen und körperlichen Stress und kontrollieren Zellüberleben und –adaption¹⁶⁸. MAPKs sind von der Genexpression bis zum Zelltod in fast alle zellulären Prozesse involviert. Ihre Rolle als wichtige Regulatoren der neuronalen Funktion wird immer deutlicher und gleichzeitig die Tatsache, dass ihre Aktivität mit vielen Second Messenger-Systemen zusammenhängt. Auf diese Weise kontrollieren die zyklische Adenosin Monophosphatase (cAMP), Proteinkinase A (PKA) und Kalzium die MAPK-Signalgebung (speziell der extrazellulär regulierten Kinasen) über die kleinen G-Proteine Ras und Rap1¹⁶⁹. So regeln sie diverse neuronale Prozesse wie Zelltod, Differenzierung und synaptische Plastizität.

Die MAP-Kinase-Aktivität wird durch eine dreistufige Kaskade aus einer MAP-Kinase, einer MAPK-Kinase (MEK/MAPKK/MKK) und einer MAPKK-Kinase (MEK-Kinase/MAPKKK/MEKK) reguliert. Die Inaktivierung geschieht durch MAPK-Phosphatasen. Viele MAP-Kinasen aktivieren spezielle Effektorinasen (MAPK aktivierte Protein-Kinasen) ¹⁷⁰.

Säugetiere exprimieren vier verschieden regulierte Gruppen von MAPKs: extrazelluläre signalbezogene Kinasen (Erk 1/2), Jun-Amino-Terminal Kinasen (JNKs), p38 Proteine und Erk5 (big MAP Kinase, BMK1). In unserer Arbeit haben wir speziell Erk1/2 und Erk5 untersucht. Die aktivierenden MAPKKs sind in diesem Fall MEK 1/2 und 5 ¹⁷¹. Jede MAPKK (MEK) kann durch mehr als eine MAPKKK aktiviert werden, um die Komplexität und Verschiedenheit von MAPK Signalwegen zu steigern ¹⁶⁸. Die Aktivierung der MAPK Kinase Kinase wird durch extrazelluläre Stimuli wie umweltbedingten Stress und Wachstumsfaktoren induziert ¹⁷².

Aktiviertes Erk1/2 phosphoryliert viele Substrate, darunter auch Transkriptionsfaktoren wie Elk1 und c-Myc und Proteinkinasen wie RSK (Ribosomale S6 Kinase). Im Anschluss daran werden *immediate early* Gene wie c-Fos und c-Jun induziert. Erk1/2 spielt deshalb eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation ¹⁷³.

Erk5 hat die doppelte Größe von anderen MAPK (deshalb wird es auch big MAPK genannt). Aktiviertes Erk5 phosphoryliert Substrate wie MEF2 (myocyte enhancer factor), kann aber ebenfalls c-Fos und c-Jun induzieren ¹⁷⁴.

Zwischen Erk1/2 und Erk5 gibt es einige Gemeinsamkeiten. Beide haben das TEY (Thr-Glu-Tyr) Aktivierungsmotiv und die Kinasedomain im Aminoterminal und beide werden durch die spezifischen MEK1/2-Inhibitoren PD98059 und U0126 gehemmt. Das Carboxyterminal hingegen weist Unterschiede auf. Das C-Terminal von Erk5 enthält eine einzigartige Sequenz und ermöglicht ihm, die Transkriptionsaktivität von Zielmolekülen zu steigern ¹⁷⁵⁻¹⁷⁷.

In Studien mit Knockout-Mäusen wurde verdeutlicht, dass Erk2 und MEK1 essentiell für die embryonale Entwicklung sind, Erk2^{-/-} und MEK1^{-/-}-Mäuse zeigen Störungen in der Entwicklung der Plazenta. Erk1^{-/-} oder MEK2^{-/-}-Tiere hingegen sind lebensfähig, fertil und von normaler Größe ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. Yao et al.

zeigten 2003, dass MEK2-defizienten Mäusen die Differenzierung des Mesoderms fehlt, ein Hinweis darauf, dass Erk2 eine Schlüsselrolle in der Mesoderm Formation einnimmt ¹⁸¹. Ein Mausmodell, in dem Erk1 und Erk2 ausgeschaltet sind, existiert bisher nicht.

In Erk5-defizienten Mäusen konnte seine Bedeutung in der Entwicklung des kardiovaskulären Systems verdeutlicht werden. Die Tiere starben schon im embryonalen Stadium wegen kardiovaskulären Defekten und Versagen der Angiogenese ¹⁸²⁻¹⁸⁴.

Die Rolle von Erk5 in der neuronalen Differenzierung wurde von Nishimoto et al. an Krallenfröschen (*Xenopus laevis*) demonstriert. Der Erk5-Knockdown resultierte in einer Reduktion der Kopfstrukturen und Hemmung der neuronalen Differenzierung ¹⁸⁵.

4.1.1 MAP-Kinasen und die Rolle der Signaltransduktion durch target-derived Neurotrophine

Die Axone sich entwickelnder Neurone wachsen vom Zellkörper weg, um postsynaptische Zielzellen zu innervieren. Diese Zielzellen setzen Neurotrophine frei, welche an Zelloberflächen-Rezeptoren der Axon Terminale (Tyrosinkinaserzeptoren, TrkR) binden. Die Neurotrophin gebundenen Rezeptoren werden durch Endozytose internalisiert und in Endosomen zum Zellkörper zurücktransportiert ¹⁸⁶.

Campenot et al. und Watson et al. machten in einer in-vitro Studie mit Zwei-Kammer-Kulturen die Entdeckung, dass für die Wahl des aktivierten MAPK-Signalweges im Zellkörper entscheidend ist, ob die Neurotrophine am Axonende oder am Zellsoma appliziert werden ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹. Direkte Neurotrophinwirkung am Zellkörper führt zur Phosphorylierung und nukleären Translokation von Erk1/2 und Erk5. Im Falle von Erk1/2 ist der Ablauf folgendermaßen: durch Neurotrophine aktivierte Trk Rezeptoren induzieren die Aktivierung des G-Proteins Ras. Ras stößt daraufhin eine dreistufige Signalkaskade an, in welcher Raf MEK1/2 phosphoryliert, welche dann ihrerseits Erk1/2 phosphorylieren. Das aktivierte Erk1/2 bewegt sich vom Zytoplasma zum Kern und aktiviert dort Rsk,

welches dann CREB (cAMP response element-binding protein) phosphoryliert. Die Aktivierung von CREB führt zu Änderungen in der Genexpression, welche sich positiv auf das neuronale Überleben auswirken. Außerdem katalysieren Rsk1/2 die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Proteins Bad und verhindern so die Bad-mediierte Apoptose in Neuronen¹⁹⁰.

Bei Neurotrophin Applikation am distalen Axonende wird ebenfalls der Ras/MAPK (Erk1/2) Signalweg aktiviert. Diese Aktivierung breitet sich allerdings nicht bis zum Zellkörper hin aus und bietet somit keine transkriptionelle Antwort auf target-derived Faktoren. Die lokale Aktivierung von Erk1/2 trägt hauptsächlich zur Elongation der Axone bei. Neurotrophine, die das distale Axon stimulieren, nutzen die Erk5-Kinase-Kaskade zur retrograden Signalgebung¹⁸⁹. Nachfolgend auf die Neurotrophin-Stimulation am distalen Axon werden phosphorylierte Trk-Rezeptoren endozytiert und dann zusammen mit ihrem Liganden (NT) in Signalendosomen, vermutlich mit Hilfe von Dynein, entlang der Mikrotubuli zum Zellkörper transportiert¹⁴⁶. Im Zellkörper phosphoryliert MEK5 Erk5, was zur nukleären Translokation von Erk5 und der nachfolgenden Phosphorylierung von CREB führt¹⁸⁹.

4.2 Protein Kinase B (PKB/Akt)

PKB/Akt ist ein nachgeordneter Effektor der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI 3-K), welche in vielen Gruppen als einer der wichtigsten Faktoren für das Überleben von Neuronen identifiziert wurde¹⁹¹. PI-3 Kinase aktiviert Akt auf indirektem Weg. Fast alle identifizierten Ziele von pAkt sind Proteine, die das Zellüberleben in vielen Zellsystemen regulieren. Dazu gehören BAD, ein Hemmer des Bcl-2 anti-apoptotischen Proteins; Pro-Caspase-9, welche in die pro-apoptotische Caspase 9 mündet und Forkhead, ein Transkriptionsfaktor, der die Fas-Liganden Level erhöht und dadurch Apoptose induziert. Diese drei pro-apoptotischen Faktoren werden durch Akt-induzierte Phosphorylierung gehemmt. Akt kann also als anti-apoptotischer Faktor bezeichnet werden und spielt eine wichtige Rolle im neuronalen Überleben^{191, 192}.

Seine Rolle in der Degeneration der Motoneurone bei ALS Patienten und im SOD1-Mausmodell enthüllten Dewil et al. 2007. Sie fanden heraus, dass

Patienten mit sporadischer und familiärer ALS einen Mangel an aktivierter Akt haben und dass die Motoneurone von mutierten SOD1-Mäusen schon vor Beginn der ersten klinischen Symptome nicht genug aktiviertes Akt besitzen ¹⁹³. Außerdem zeigten sie, dass eine Überexpression von Akt bei SOD1 mutierten Mäusen in vitro dem SOD1 abhängigen Zelltod vorbeugt. Ähnliche Ergebnisse erhielt eine andere Gruppe, die die Expression von PI3-K und Akt in 25 Wochen alten SOD1^{G93A}-Mäusen untersuchte und herausfand, dass sie in den großen Neuronen des Vorderhorns merklich vermindert war ¹⁹⁴.

Gegensätzliche Ergebnisse wurden in einer Studie von Peviani et al. präsentiert. Sie untersuchten pAkt im Ventralhorn von SOD1^{G93A}-Mäusen und fanden keinen Unterschied in seiner Expression zwischen gesunden und degenerierenden Motoneuronen. Ihre These war deshalb, dass SOD1^{G93A}-Mäuse keinen Mangel an Akt aufweisen und es auch nicht überexprimieren, um dem Zelltod vorzubeugen ¹⁹⁵. Eine Studie an postmortal entnommenem Rückenmarksgewebe von ALS Patienten ergab eine erhöhte Aktivität von PI3-K und Akt ¹⁹⁶.

Dolcet et al. zeigten, dass BDNF über den PI 3-Kinase-Weg Akt aktiviert und dadurch das Überleben embryonaler Motoneurone im Rückenmark fördert. Des weiteren bewiesen sie, dass der Erk-MAPK-Signalweg in diesem Zusammenhang keine Rolle spielt ¹⁹⁷.

4.3 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)

BDNF gehört wie NGF (Nerve Growth Factor) und Neurotrophin-3 und -4 (NT-3; NT-4) zu der Gruppe der Neurotrophine, welche eine Untergruppe der neuronalen Wachstumsfaktoren bilden. Es bindet spezifisch und mit hoher Affinität an den TrkB-Rezeptor und, wie alle Neurotrophine, an den niedrig affinen p75-Neurotrophin Rezeptor. BDNF wird hauptsächlich im ZNS synthetisiert, unter anderem in adulten sensorischen Primärneuronen ¹⁹⁸. Im reifen zentralen Nervensystem ist es das aktivste Mitglied der Neurotrophin-Familie mit hohen Expressionsleveln im Hippocampus, Neokortex und Zerebellum ^{199, 200}.

BDNF unterstützt die neuronale Proliferation, Differenzierung, Reifung und das neuronale Überleben während der Entwicklung^{201, 202}, hat aber auch spezifischere Aufgaben, wie die langfristige Potenzierung von reifen Neuronen und synaptische Übertragung^{203, 204}. Außerdem besitzt es im Dorsalhorn des Rückenmarks schmerzmodulatorische Wirkung^{205, 206}.

Schwartz et al. machten die Bedeutung von BDNF im vestibulocerebellären System deutlich, indem sie BDNF-Knockout-Mäuse kreierten, welche schwerwiegende Defizite in der motorischen Koordination aufwiesen²⁰¹.

Bei neugeborenen Tieren reduziert eine Supplementierung mit BDNF allerdings das Absterben von Motoneuronen nach Axotomie²⁰⁷ und bei adulten Tieren nach Ventralwurzelavulsion^{208, 209}. Die Gabe von BDNF nach Durchtrennung des N. ischiadicus führt außerdem zur Verbesserung der Myelindicke in regenerierenden Axonen, besonders bei Kombination mit CNTF (ciliary neurotrophic factor)²¹⁰.

Eine andere Studie ergab, dass die TrkB-Rezeptoren, an die BDNF bindet, im Rückenmark von ALS-Patienten einen geringeren Phosphorylierungsgrad aufwiesen, als die Kontrollpräparate²¹¹.

BDNF-Supplimierung in Wobbler-Mäusen erwirkte eine signifikante Verzögerung der Motoneurondegeneration und des Axon-Verlusts²¹².

Außerdem ergaben immunhistochemische Untersuchungen von Kawamoto et al. zur BDNF-Expression im Rückenmark von ALS-Patienten, dass die Immunoreaktivität der Motoneurone der ALS-Fälle die gleiche Intensität hatte wie die Zellen der Kontrollen und sich außerdem viele nicht motorische Neurone im Rückenmark gleich stark anfärbten. Sie vermuteten aufgrund dieses Ergebnisses, dass Motoneurone von ALS-Patienten eine BDNF-Unterstützung von nicht-motorischen Neuronen, welche nicht von ALS betroffen sind, oder von prädegenerierten Motoneuronen, erhalten²¹³. Sie sahen in ihren Ergebnissen auch die Erklärung dafür, warum die BDNF-Substitution in ALS-Patienten erfolglos ist²¹⁴.

II ZIELSETZUNG

Die Erforschung von Motoneurerkrankungen, wie ALS, besitzt hohe Priorität, da ihre molekularen Ursachen unzureichend bekannt sind und deshalb wenige adäquate diagnostische und therapeutische Mittel zur Verfügung stehen.

Mit der *Cra1*-Mutante wurde ein Modell eingeführt, dessen vorläufige Untersuchungen widersprüchliche Aussagen bezüglich seiner Eignung als Motoneurondegenerations-Modell hervorbrachten.

Die Mutation im Motorprotein Dynein suggeriert eine Störung des retrograden axonalen Transports. Welche Faktoren im Folgenden die Verbindung zur Degeneration der Nervenzellen herstellen, ist noch nicht endgültig geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, wichtige Funktionsträger der zellulären Signaltransduktion, welche eine Rolle im neuronalen Überleben spielen, auf Veränderungen ihrer Expression in den spinalen α -Motoneuronen hin zu untersuchen.

Als Kandidaten wurden das Neurotrophin BDNF und die Transduktionsfaktoren MAPK, Erk5 und Akt analysiert.

Außerdem haben wir morphologische und stereologische Verfahren angewandt, um die Auswirkungen der *Cra1*-Mutation auf die Physiologie peripherer Axone zu verifizieren.

III MATERIAL UND METHODEN

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, durch die Auswirkungen des Dyneindefekts in *Cra1*-Mäusen auf die spinalen α -Motoneurone zu erfassen. Hierzu wurden mögliche Abweichungen in der Expression von Transduktionsfaktoren und Neurotrophinen untersucht. Darüber hinaus wurde der periphere Nerv auf axonale Veränderungen hin überprüft.

1. Mäusekollektiv

Es wurden insgesamt 14 Mäuse aus dem Stamm C3H untersucht.

Tab. 1: Mäusekollektiv

Tier-Nr.	Genotyp	Alter	Geschlecht
1	<i>Cra/+</i>	12 M	m
2	<i>Cra/+</i>	12 M	m
3	<i>Cra/+</i>	12 M	m
4	<i>Cra/+</i>	12 M	m
5	<i>Cra/+</i>	12 M	m
6	<i>Cra/+</i>	12 M	w
7	<i>Cra/+</i>	12 M	m
8	<i>Cra/+</i>	9 M	w
9	<i>Cra/+</i>	9 M	m
10	<i>Cra/+</i>	9 M	m
11	Wildtyp	9 M	w
12	Wildtyp	9 M	w
13	Wildtyp	9 M	w
14	Wildtyp	12 M	m

Cra/+ = heterozygote *Cra1*-Maus, M = Monate

m = männlich, w = weiblich

1.1 Herkunft und Haltung der Tiere

Alle Mäuse stammen von der Firma Ingenium Pharmaceuticals, München und wurden der neuropathologischen Abteilung des Instituts rechts der Isar zur weitergehenden Untersuchung am Tage der Euthanasie zugestellt.

Die Tiere wurden bis zur Euthanasie in Makrolon Typ III Käfigen in Gruppen von bis zu vier Tieren untergebracht und erhielten freien Zugang zu Futter und

Wasser. Eine Raumtemperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$ und ein Licht-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden wurde strikt eingehalten.

Der tierschutzgerechte Umgang wurde von den verantwortlichen Tierschutzbeauftragten der Fakultät überprüft.

2. Präparation

2.1 Eingriffe am Tier

2.1.1 Perfusionsfixation

Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion (Nembutal® 60 mg/kg) narkotisiert. Nach Eintritt der Narkosewirkung wurden Abdomen und Thorax eröffnet, das Herz frei präpariert und, nach Eröffnung der Vena cava caudalis durch transkardiale Perfusion mit Heparin versetztem NaCl, das Blut aus dem Organismus gespült.

Zur Beurteilung des Entblutungsgrades wurde die Blutfülle der Leber (makroskopische Beurteilung der Organfarbe) herangezogen.

War die Entblutung vollzogen, wurde mit der Einleitung von 4%igem Paraformaldehyd über die linke Kammer begonnen. Die Dauer der Perfusion wurde von der Muskelrigidität abhängig gemacht. War diese über das ganze Tier hin ausgeprägt, wurde die Perfusion beendet. Die Mindestdauer betrug allerdings 5 Minuten.

Herstellung des Paraformaldehyds: Für 250 ml werden 10 g Paraformaldehyd in 125 ml Aqua dest. bei 60°C gelöst und mit 125 ml 0,4 M Phosphatpuffer auf pH 7,4 eingestellt.

2.2 Präparation der zu untersuchenden Gewebe

Zur Untersuchung des zentralen und des peripheren Nervensystems wurde das Rückenmark in drei Segmenten (zervikal, thorakal und lumbal) und der Nervus ischiadicus präpariert.

2.2.1 Präparation des Nervus ischiadicus

Zur Präparation des N. ischiadicus wurden die Tiere in Seitenlage verbracht und die Haut der Hintergliedmaße von lateral parallel zum Femur eröffnet. Um den N. ischiadicus aufzufinden, wurde der M. biceps femoris an seinem Ursprung vom lateralen Vastus des M. quadriceps getrennt, in seiner distalen Insertion an der Tibia abgelöst und nach kaudal umgeklappt. Der N. ischiadicus wurde in seinem Verlauf nach distal frei präpariert und dann hochproximal und soweit distal wie möglich abgetrennt und entnommen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde er in einem mit NaCl durchfeuchteten Gazetupfer gelagert. Im nächsten Schritt wurden am Nerven verbliebene Muskelreste und Gefäße entfernt und das Epineurium zur Freilegung der Faszikel abgezogen. Zur Vermeidung elastischer Kontraktion wurden sie auf Papierstücke aufgezogen und anderthalb Stunden in 2,5%iges Glutaraldehyd eingelegt.

Nach der Fixierung wurden das proximale und das distale Ende der Faszikel verworfen. Der Rest wurde mit einer Skalpellklinge in 4 Stücke von 1-2 mm Länge geschnitten. Von den Einzelstücken wurden 3 quer und 1 längs mit Osmiumtetroxid für 2 Stunden nachfixiert, dreimal mit Sörensen-Phosphatpuffer gespült und anschließend in einer aufsteigenden Acetonreihe dehydriert. Danach folgte eine einstündige Infiltration des Gewebes mit einer Glycidäther 100-Mischung (Epon) und Aceton sowie zwei weitere Infiltrationen mit der Glycidäther 100-Mischung für je eine halbe Stunde bei Raumtemperatur. Die Proben wurden - je drei quer und eine längs - in Flacheinbettungsformen verbracht, mit Glycidäther aufgefüllt und für 48 Stunden bei 60°C im Brutschrank polymerisiert. Nach der Aushärtung wurden sie mit Hilfe einer Fräse getrimmt (Fa. Cambridge Instruments GmbH, Nussloch; Reichert Jung, Ultratrim®), und es wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut®, Reichert Jung) Semidünnschnitte von 1µm Dicke im rechten Winkel zum Nervenfaserverlauf angefertigt, welche auf Objektträger aufgezogen und hitzefixiert wurden.

Die Färbung erfolgte schließlich mit Azurblau II-Safranin und Paraphenylendiamin. Für die Elektronenmikroskopie wurden die geeigneten Blöcke nach Sichtung der Semidünnschnitte getrimmt. Dann wurden Ultradünnschnitte von etwa 70 nm Dicke angefertigt und auf Kupferringe und -netze (Stork, Veco, NL) aufgebracht. Die Kontrastierung erfolgte mit

Uranylacetat und Bleicitrat.

Tabelle 2: Protokoll zur Epoxidharzeinbettung

Lösung	Konzentration	Dauer	Inkubationsbedingungen
Osmium	1%	2 Stunden	Kühlschrank
Waschlösung	nach Protokoll	3 x spülen	
Aceton	50%	3 x spülen	
Aceton	70%	10 Min	Kühlschrank
Aceton	70%	10 Min	Kühlschrank
Aceton	90%	10 Min	Kühlschrank
Aceton	90%	10 Min	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min	Kühlschrank
Aceton	100%	20 Min	Zimmertemperatur
Aceton 100%/ Glycidether- Mischung	01:01	1 Std.	Zimmertemperatur
Glycidether- Mischung	pur	30 Min.	Zimmertemperatur
Glycidether- Mischung	pur	30 Min.	Zimmertemperatur

Tab. 3: Protokoll zur Azurblau II-Safranin Färbung

Arbeitsvorgang	Lösung	Dauer	Inkubationsbedingungen
Färben	Azurblau II	20-25 Sekunden	Raumtemperatur
Spülen	Aqua dest.		
Färben	Safranin	15 Sekunden	Raumtemperatur
Spülen	Aqua dest.		

Die Azurblau II-Safranin Färbung wurde auf der Wärmeplatte bei ca. 80°C durchgeführt.

Tab. 4: Protokoll zur Paraphenyldiamin Färbung

Arbeitsvorgang	Lösung	Dauer	Inkubationsbedingungen
Färben	1%iges p-Phenyldiamin	30 Minuten	Raumtemperatur
Spülen	Alkoholische Spülflüssigkeit		
Eindeckeln			

Vor der Paraphenyldiamin (PPD) Färbung wurden die Semidünnschnitte auf mit Gelatine bzw. 3-Amino-propyl-3-ethoxysilan (TES) beschichtete Objektträger verbracht und auf der Wärmeplatte getrocknet.

2.2.2 Präparation der Wirbelsäule

Die Wirbelsäule wurde mit den umliegenden Muskeln und Geweben entnommen und 48 Stunden bei Raumtemperatur in EDTA-Puffer entkalkt.

Hiernach wurden die Präparate zur Erhaltung des Spinalganglions im Ganzen geschnitten. Nach Identifizierung der entsprechenden Wirbel als anatomische Orientierungspunkte wurde im zervikalen Segment C4, thorakal Th9 und lumbal L5 die Wirbelsäule durchtrennt und das Rückenmark entnommen.

Die entnommenen, etwa 2 mm dicken Scheiben des Rückenmarks wurden in Paraffin (Paraplast Plus®, Fa. Sherwood Medical Co., USA) mit einem Schmelzpunkt von 56-58°C eingebettet. Aus den entstandenen Paraffinblöcken wurden dann mit einem Rotationsmikrotom (Fa. Leica) 2 µm dicke Schnitte des Rückenmarks angefertigt, die anschließend in einem 37°C warmen Wasserbad gestreckt und danach auf 0,1% poly-L-lysinierter Objektträger aufgezogen und für 12-18 Stunden im Brutschrank bei 58°C getrocknet wurden.

Herstellung des EDTA-Puffers: 100g Titriplex III R (Merk, Darmstadt) wurden mit 33 g Tris 7-9 R (Fa. Sigma Corp., USA) in 1000 ml Aqua dest. gelöst.

3. Immunhistologie

Um spezifische Signalwege genauer untersuchen zu können, wurden immunhistochemische Verfahren an Rückenmarksschnitten durchgeführt. Die Schnitte wurden wie in 2.2.2 beschrieben aus dem in Paraffin eingebetteten Rückenmark in 2 µm Dicke angefertigt.

3.1 Allgemeine Vorbehandlung

Zur Entparaffinierung wurden alle Schnitte 3 mal 10 Minuten in Xylol belassen, dann jeweils 5 Minuten in einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 100%, 96%, 70%) rehydratisiert und abschließend 5 Minuten in Aqua dest. gespült.

Zur Antigen-Demaskierung wurde danach eine Vorbehandlung mit Zitratpuffer im Dampfdrucktopf durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 7 Minuten im Puffer gekocht und durchliefen dann eine 20-30 minütige Abkühlphase.

3.2 NeuN

Danach wurde erst 5 Minuten und dann 3 mal 2 Minuten in Tris-Puffer gespült. Anschließend wurde der Antikörper (Mouse Anti NeuN; Firma Chemicon, USA) in einer Verdünnung von 1:100 aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurden die Präparate wieder 3 mal 2 Minuten in Tris-Puffer gewaschen. Die Detektion erfolgte daraufhin mit Hilfe des ChemMate DAB + Chromogen Red 3 Kits und ChemMate Levamisole (Dako cytomation, Dänemark). Der Sekundäantikörper wurde 30 Minuten bei RT inkubiert, danach wurde 3 mal 2 Minuten in Tris Puffer gewaschen und der APAAP Immunkomplex zur 30minütigen Inkubation bei RT aufgetragen. Nach erneutem Waschen in Tris Puffer wurde das APAAP Chromogen aufgetragen und 4 Minuten auf den Schnitten belassen. Daraufhin folgte 10minütiges Waschen in Tris-Puffer und die abschließende Behandlung (s. 3.4).

3.3 MAPK, Erk5, Akt, BDNF und Calbindin

Nach dem Abkühlen wurden die Präparate 5 Minuten in Tris Puffer gewaschen, 15 min in 30% H₂O₂ eingelegt und erneut gewaschen (3 mal 2 Minuten in Tris

Puffer). Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, erfolgte die Blockierung mit 5% Normal Ziegennormalserum 30 Minuten bei RT. Im nächsten Schritt wurde der Antikörper aufgetragen.

Tab. 5: Antikörper

Primärantikörper für IHC	Firma	Verdünnung
Kaninchen Anti phospho Akt (736E11)	CST, USA	1:50
Kaninchen Anti phospho MAPK (20G11)	CST, USA	1:100
Kaninchen Anti Erk5/BMK [pTpY ^{218/220}]	Biosource, USA	1:100
Huhn Anti BDNF (ab27932)	Abcam, UK	1:100
Kaninchen Anti Calbindin-D-28-K (EG-20)	Sigma, USA	1:100

Als Antikörperverdünnungslösung wurde ChemMate Antibody Diluent (Fa. Dako, Dänemark) verwendet.

Die Inkubation erfolgte bei 4 °C über Nacht.

Nachfolgend wurden die Präparate wieder 3 mal 2 Minuten in Tris Puffer gewaschen.

Die Detektion wurde mit Hilfe des DCS-Detection Line Peroxidase Kits (DCS) durchgeführt. Zunächst wurde der biotinylierte Polylink Sekundär Antikörper 30 Minuten bei RT inkubiert, mit anschließendem Waschen in Tris Puffer (3 mal 2 Minuten). Daraufhin wurde der Streptavidin-Peroxidase-markierte Antikörper aufgetragen und ebenfalls 30 Minuten bei RT inkubiert. Im Anschluss an erneutes Waschen in Tris Puffer wurde das Diaminobenzidin Chromogen Substratkit aufgetragen. Die Einwirkzeit betrug 2 Minuten und wurde mit Waschen in Tris Puffer für 10 Minuten beendet.

3.4 Allgemeine Nachbehandlung

Alle Präparate wurden 3 Minuten mit Hämalaun gegengefärbt und 10 Minuten in fließendem Wasser, sowie 2 Minuten in Aqua dest. gespült. Nach der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 2 x 100%, jeweils 2 Minuten) und 2 x 2 Minuten Xylol wurden die Präparate mit Eukitt® eingedeckelt und 10 Minuten bei 56 °C im Trockenschrank getrocknet.

Herstellung des Zitratpuffers (pH: 6,1): In 700 ml Aqua dest. 2,1 g Zitronensäure-Monohydrat lösen, mit 5N NaOH auf pH 6,0 einstellen und mit Aqua dest auf 1 l auffüllen.

Herstellung des Tris-Puffers (pH-Wert: 7,6): 60,5 g TRIS-Base 90 g NaCl in 700 ml Aqua dest. lösen, mit 2 N HCl auf pH 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen. Zur Gebrauchslösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

4. Lichtmikroskopische Untersuchung des Rückenmarks

Das Rückenmark und die dazugehörigen Spinalganglien wurden mit einem Lichtmikroskop der Firma Olympus (Japan) bei 40- bis 1000facher Vergrößerung von außen nach innen untersucht.

Zu Anfang wurde der Aufbau der Spinalganglien überprüft und auf Anzeichen von Zellverlust (Nageotte-Körperchen) geachtet, danach wurden Aufbau und Erhaltung von weißer und grauer Substanz inspiziert. In der grauen Substanz wurden die Neurone, Axone und Gliazellen auf pathologische Veränderungen hin betrachtet. Besonderes Augenmerk wurde auf die Zellen im Ventralhorn gelegt. In ihnen wurde speziell nach pathologischen Merkmalen, wie Schrumpfung oder Schwellung, Vakuolisierung, Chromatolyse, Hyperchromatose, Karyopyknose und Einschlusskörperchen Ausschau gehalten.

4.1 Motoneuron-Zählung

Die Zählung der Motoneurone wurde an den Rückenmarksschnitten in allen drei Segmenten der Wirbelsäule im Bereich des Ventralhorn-Laminae VII-IX durchgeführt. Es wurden dabei sowohl Präparate aus der HE-Färbung als auch NeuN Immunhistochemie verwendet¹²⁹. NeuN (neuron specific nuclear protein) ist ein neuronaler Marker, der in allen adulten Neuronen nukleär exprimiert wird²¹⁵ und deshalb für die Darstellung und Zählung der Motoneurone geeignet ist. Als Kriterien für die gezählten Zellen galten eine Zellmindestgröße von 17,5 µm, ein sichtbarer Nukleus mit Nukleolus und deutliche charakteristische

morphologische Eigenschaften von Motoneuronen ¹²⁹.

Um inhibitorische Interneurone von der Zählung auszuschließen, wurden die Zellen, welche die oben genannten Kriterien erfüllten, aber in der Calbindin Immunhistochemie eine positive Expression zeigten, von der Gesamtzellzahl subtrahiert.

Die Zelldichte wurde im Ventralhorn der Rückenmäcker ermittelt und in Excel®-Tabellen analysiert (siehe Anhang).

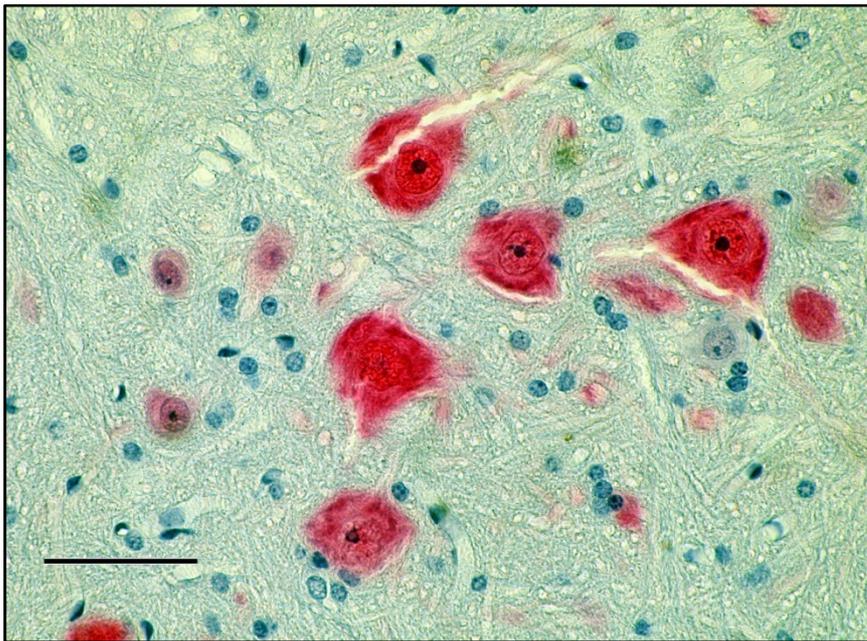


Abb. 4:
Charakteristische
Motoneurone im
Ventralhorn
NeuN-Färbung
Maßstab: 50 µm

4.2 Ermittlung der Immunoreaktivitätsscores

Die Färbungen für die Transduktionsfaktoren pAkt, pMAPK und Erk5 sowie das Neurotrophin BDNF wurden mit einem Lichtmikroskop der Firma Olympus bei einer 10- bis 100fachen Vergrößerung von einem geblindeten Untersucher auf Expressionsstärke und Verteilungsmuster hin untersucht.

Zur semiquantitativen Erfassung der Expressionsstärke wurde der sogenannte Remmele-Score verwendet ²¹⁶. Dieser Immunoreaktivitätsscore (IRS) berücksichtigt in einem Punktesystem die Verteilung (PP, Prozentzahl positiver Zellen) und die Stärke der Expression (SI, staining intensity)

Tab. 6: Punktesystem des Remmele-Summationsscores

Punktzahl	PP	SI
0	0%	
1	1-25%	+
2	26-50%	++
3	51-75%	+++
4	76-100%	

PP = Prozentzahl positiver Zellen

SI = staining intensity

Der IRS eines jeden Präparats wurde durch Multiplikation der beiden Faktoren ermittelt, welches von Remmele et al. selbst als das der Addition vorzuziehende Verfahren beschrieben wurde ²¹⁶. Es ist bewiesen, dass diese Methode, immunhistochemische Expression zu evaluieren, mit quantitativen Methoden korreliert ^{216 217}.

Zur genaueren Differenzierung der Expressionsstärken konnten auch verschiedene Intensitäten innerhalb der Zellpopulation eines Präparates berücksichtigt werden.

Für pMAPK und Erk5 wurde zusätzlich ein einfacher Score entwickelt, um die Unterschiede zwischen nukleärer und zytoplasmatischer Expression in den Motoneuronen zu erfassen. Es wurde demnach beurteilt, ob eine Anfärbung vorhanden ist (nein = 0, ja = 1) und wie viele Zellen eine positive Expression zeigen (keine = 0, einige = 1, alle = 2).

5. Morphologische Untersuchungen am N. ischiadicus

5.1 Lichtmikroskopische Betrachtung des N. ischiadicus

Die Semidünnschnitte des Faszikelquerschnittes vom N. ischiadicus wurden an einem Olympus Mikroskop mit 40- bis 1000facher Vergrößerung von außen nach innen untersucht. Es wurde auf Aufbau und Erhaltung von Perineurium, Endoneurium und der einzelnen myelinisierten und nichtmyelinisierten Fasern geachtet.

5.2 Morphometrie

Für die stereologischen Untersuchungen des N. ischiadicus wurden PPD gefärbte transversale Semidünnschnitte herangezogen.

Die Analyse erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ®. Hierfür wurden zunächst an einem Zeiss Axioskop Lichtmikroskop durch ein 40x Objektiv Plan Neofluar (Zeiss, Jena) mit Hilfe einer Canon Digitalkamera die faszikulären Querschnitte in Teilausschnitten eingelesen und mittels Autostitch®-Software zu einem Kachelbild zusammengesetzt.

Nach der Bilderfassung erfolgte die interaktive Bearbeitung des Gesamtbildes am Computer. Im ersten Schritt wurde mit Hilfe des Adobe Photoshop® Bildbearbeitungsprogramms (Adobe, USA) ein Weißabgleich durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass auch die Myelinscheide kleinkalibriger Nervenfasern noch gut ringförmig dargestellt wurde. Die bearbeiteten Fotos wurden als Bilddatei (.jpg) abgespeichert und mit ImageJ® geöffnet, um mittels eines Zeichenwerkzeuges die Faszikelfläche durch Umfahren des Perineuriums zu begrenzen. Über eine Bildbereinigungsfunktion wurden sämtliche Partikel, die keine Nervenfasern darstellten, entfernt. Um dicht aneinander liegende Fasern zu separieren, wurden mit einem Schneidewerkzeug die zusammenhängenden Myelinscheiden voneinander getrennt. Im Anschluss an die manuelle Bearbeitung wurde die Vermessung gestartet. Hierzu wurde ein speziell entwickeltes Plugin (Rodenacker, GSF) implementiert, welches Anzahl und Größe von myelinisierten Faserquerschnitten und ihrer Axone ermittelte.

Zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse wurden Faserflächen $\leq 6,28 \mu\text{m}^2$ und reine „Myelinsignale“ von der Bewertung ausgeschlossen.

Die Daten wurden in Excel® Dateien übertragen, in welchen die G-Ratio und die Faserdichte/ mm^2 kalkuliert werden konnte. Die G-Ratio ist ein Maß für die Dicke der Myelinscheide in Relation zum Axondurchmesser und wird über das Verhältnis von Axondurchmesser (IntDen) zum Gesamtfaserdurchmesser ermittelt (Area). Zur Erfassung der durchschnittlichen Endoneuralfäche der Fasern wurde die Faszikelfläche durch die Gesamtanzahl der Fasern geteilt.

Unter Berücksichtigung des jeweiligen Vergrößerungsfaktors wurden die pixelbasierten Daten in Excel® zu metrischen Angaben umgeformt. Dann

wurden die Einzelwerte in PAST® Statistik-Freeware importiert und ausgewertet. Das Schema der statistischen Auswertung war angelehnt, an das der Motoneuronauszählung (2.3.1.1). Demnach wurden die Abweichungen von einer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test erfasst. Da bei allen Parametern Normalverteilung vorlag, wurde anschließend ein T-Test durchgeführt.

5.3 Numerische Erfassung pathomorphologischer Fasercharakteristika

Auf Basis der Kachelbilder wurden die im Folgenden angegebenen Einzelveränderungen mit Hilfe eines digitalen Punktzählmoduls in ImageJ® erfasst:

- * Outfolded und Infolded Myelin Loops und Myelinscheiden Doppelungen
- * Hypomyelinisierte Faserprofile
- * Reduzierte Durchmesser myelinisierter Axone
- * Myelindebris
- * Myelinovoide (Wallersche Degenerationen)

Ziel der Untersuchung war es, Myelindegenerationen, -proliferationen und – instabilitäten, welche als erste Zeichen von axonalen Atrophien auftreten, aber auch die drei Formen der axonalen Degeneration, sprich axonale Atrophie, axonale Dystrophie und Wallersche Degeneration zu erfassen und zu quantifizieren.

5.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Um die Feinstrukturen der peripheren Nerven zu beurteilen, wurden die Ultradünnschnitte des N. ischiadicus unter einem Zeiss EM10® Elektronenmikroskop bei 2500- bis 80.000facher Vergrößerung betrachtet.

Der Faszikel wurde von außen nach innen untersucht. Beginnend mit dem Perineurium und der Beurteilung seiner Struktur und Erhaltung wurde nachfolgend der subperineurale Spalt auf Größe und pathologische Einlagerungen studiert. Das Endoneurium wurde in Bezug auf Aufbau, Kollagen- und Zellgehalt überprüft, außerdem wurden die Gefäße im Endoneurium im Hinblick

auf pathologische Veränderungen betrachtet.

Anschließend erfolgte die Begutachtung der myelinisierten und unmyelinisierten Fasern. Es wurde auf den Kompaktheitsgrad des Myelins, die Struktur der Schwannzellen (Zytoplasma, Kern, Organellen) und die Axone (Skelettaufbau, Vesikel, Mitochondrien) geachtet. Um die durchschnittliche Anzahl von Mitochondrien in den Axonen der myelinisierten Fasern zu erfassen, wurden pro Faszikel in 20 großen Fasern die Mitochondrien gezählt und der Durchschnittswert ermittelt²¹⁸.

6. Statistische Evaluation

Alle untersuchten kontinuierlichen Parameter wurden mittels Shapiro-Wilk Test auf Abweichungen von der Normalverteilung untersucht. Für normalverteilte Werte wurde im Folgenden der T-Test verwendet. Nicht normalverteilte, oder kategoriale Parameter wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Für alle Untersuchungen wurde ein p-Wert $\leq 0,05$ als signifikant erachtet. Alle Werte wurden im Tabellenteil mit Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

IV ERGEBNISSE

1. Untersuchungen am Rückenmark

Von allen Tieren konnten auswertbare Rückenmarks-Querschnitte hergestellt werden.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung sind keine gravierenden Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Histopathologische Hinweise auf eine Myelopathie sind nicht feststellbar. Im Besonderen sind die α -Motoneurone zytopathologisch unauffällig und zeigen keine Veränderungen der Chromatinsubstanz, Vakuolisierung, Kernveränderungen oder Schwellungen. Außerdem sind Lewy- oder Bunina-ähnliche Einschlusskörperchen, wie sie bei ALS auftreten, in den α -Motoneuronen nicht aufzufinden.

Bei näherer Begutachtung kann ein Motoneuronverlust in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse vermutet werden, der allerdings nicht von Mikrogliaknötchen begleitet wird. Zudem fallen in den Präparaten der *Cra*-Mäuse häufiger als bei den Wildtypen *Dark neurons* auf. Ein in anderer Hinsicht abnormes Färbeverhalten ist nicht feststellbar.

Die Spinalganglien im Wirbelkanal zeigen einen normalen Aufbau mit üblicher Ganglienzeldichte und physiologischer Zusammensetzung von Satelliten- und Stützzellen. Erkennbare pathologische Veränderungen, wie Nageotte-Körperchen, welche auf einen Zellverlust hindeuten würden, liegen in beiden Gruppen nicht vor.

1.1 α -Motoneuron-Anzahl und -Dichte

Zur Erfassung der Motoneuronzahlen der Laminae VII bis IX des Ventralhorns wurden über 175 komplette, nichtüberlappende Rückenmarksquerschnitte ausgezählt. Es wurden hierzu die Schnitte der HE-Färbung und der NeuN-Immunhistochemie verwendet. Die Anfärbung der Präparate ist durchwegs kräftig. Die Neuronen färben sich vor einem blau-grauen Hintergrund spezifisch in einem leuchtenden Magentarot, wobei der Nukleus stärker positiv ist als das

Zytoplasma. Der Nukleolus ist blau. Graue und weiße Substanz unterscheiden sich nicht spezifisch voneinander, sie sind blaugrau gefärbt.

Die α -Motoneurone stellen sich als große, multipolare Zellen mit deutlichem Nukleus dar. Ihre multipolare Form stellt sich gut dar und sie befinden sich bei beiden Gruppen zu einem großen Teil im appendikulären Bereich des Ventralhorns in Rexed-Laminae VIII und IX. Weniger häufig sind sie in den axialen Zonen (Rexed-Lamina VII) anzutreffen.

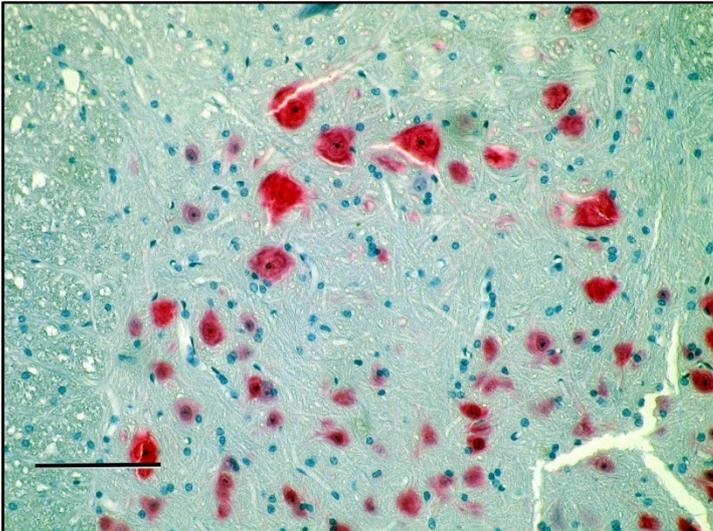


Abb. 5
Ventralhorn Lumbalmark
Wildtyp, NeuN-Färbung
Maßstab 100 μ m

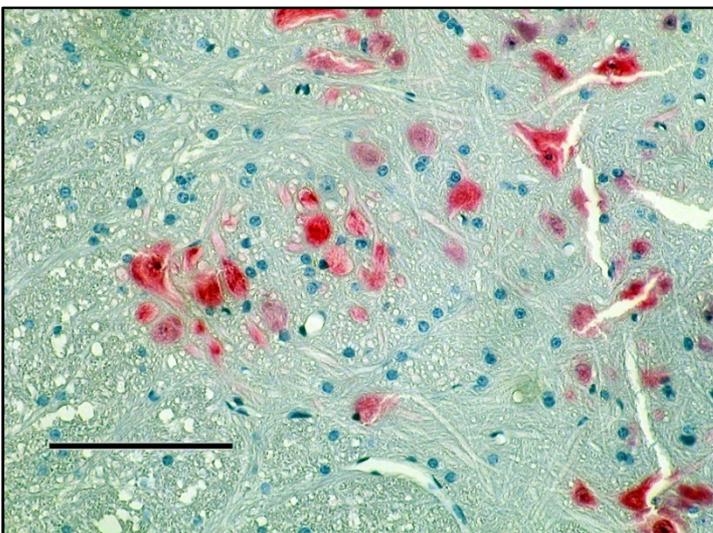


Abb. 6
Ventralhorn Lumbalmark
***Cra1*-Maus, NeuN Färbung**
Maßstab 100 μ m

Die Ergebnistabellen befinden sich im Anhang IX, 1.1 ab Seite 119.

1.1.1 Segmentübergreifende Betrachtung

Bei der Zählung der Motoneurone über alle 3 Rückenmarks-Abschnitte hinweg, besitzt die Gruppe der Wildtypen $4,3 \pm 0,48$ α -Motoneurone im Durchschnitt mit einer Verteilung zwischen 1,5 und 7,25. Die *Cra1*-Mäuse weisen durchschnittlich $2,94 \pm 0,61$ α -Motoneurone in einem Intervall von 0 bis 5,67 im Ventralhorn auf.

Bei der Betrachtung fällt auf, dass im zervikalen Segment die meisten, im thorakalen Rückenmarksabschnitt hingegen die wenigsten α -Motoneurone vorhanden sind.

Der Mittelwert-Vergleich der Gesamtzahl an α -Motoneuronen zeigt, dass die Gruppe der Wildtypen hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr Zellen besitzen als die *Cra*-Mäuse und zwar durchschnittlich 1,4 Vorderhornzellen mehr.

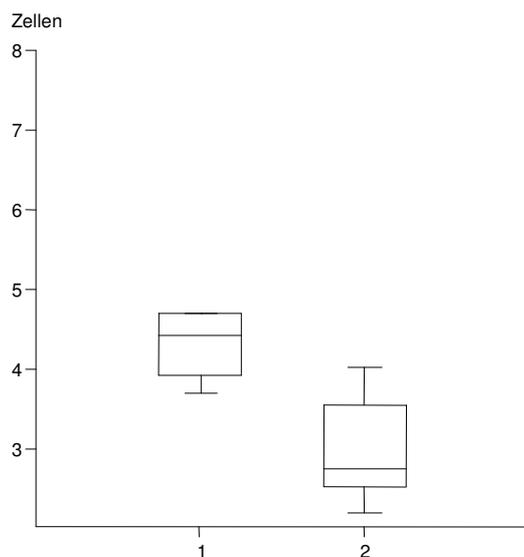


Abb. 7: Gesamtdurchschnitt der α -Motoneurone pro Rückenmarksquerschnitt

1 = Wildtypen

2 = *Cra1*-Mäuse

1.1.2 Betrachtung der einzelnen Abschnitte

1.1.2.1 Zervikalmark

Die erste Tendenz in der segmentübergreifenden Betrachtung setzt sich auch nach Untergliederung in einzelne Segmente fort. Im Vergleich der drei Segmente werden in beiden Gruppen im Ventralhorn der Zervikalintumeszenz die meisten Motoneurone gesehen. Bei den Wildtypen sind es durchschnittlich $6,7 \pm 1,02$ α -Motoneurone, mit einer Verteilung zwischen 5,2 und 7,25. Bei den *Cra1*-Mäusen können durchschnittlich $3,9 \pm 1,36$ Motoneurone gezählt werden, das Intervall liegt zwischen 2 und 5,67. Die Wildtypen besitzen mit durchschnittlich 2,8 α -Motoneuronen hochsignifikant ($p < 0,001$) mehr Zellen im Zervikalsegment als die *Cra1*-Mäuse.

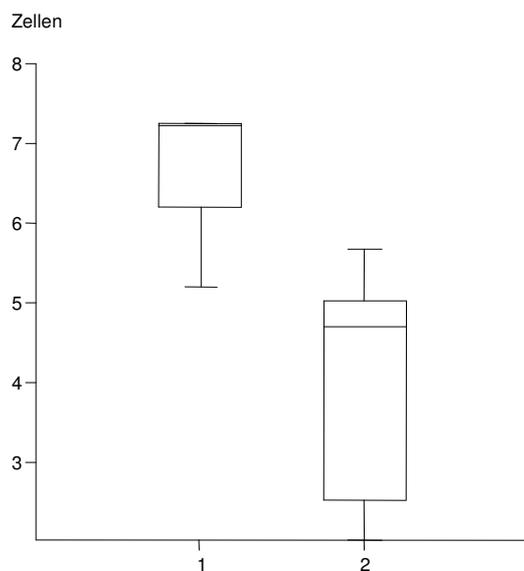


Abb. 8: α -Motoneurone in der Zervikal-Intumeszenz pro Rückenmarksquerschnitt

1= Wildtypen

2 = *Cra1*-Mäuse

1.1.2.2 Thorakalmark

Im thorakalen Abschnitt liegt der Mittelwert der α -Motoneurone bei $1,6 \pm 0,34$ innerhalb des Ventralhorns der Wildtypen. Das Intervall bewegt sich in einem kleinen Bereich von 1,5 bis 2.

In der Gruppe der *Cra1*-Mäuse können im thorakalen Bereich des Rückenmarks durchschnittlich $1,07 \pm 0,9$ α -Motoneurone gezählt werden. Bei einem Tier sind im Ventralhorn dieser Anschnitte keine Zellen vorhanden, die die von uns festgelegten Kriterien zur Bestimmung der α -Motoneurone erfüllten. Die Verteilung bewegt sich somit zwischen 0 und 2,6.

Beim Vergleich der Gruppen zeigt sich erneut eine höhere Motoneurondichte der Wildtypen. Sie besitzen im Durchschnitt 0,53 Zellen mehr als die *Cra1*-Mäuse, dieser Unterschied ist statistisch allerdings nicht signifikant ($p > 0,05$).

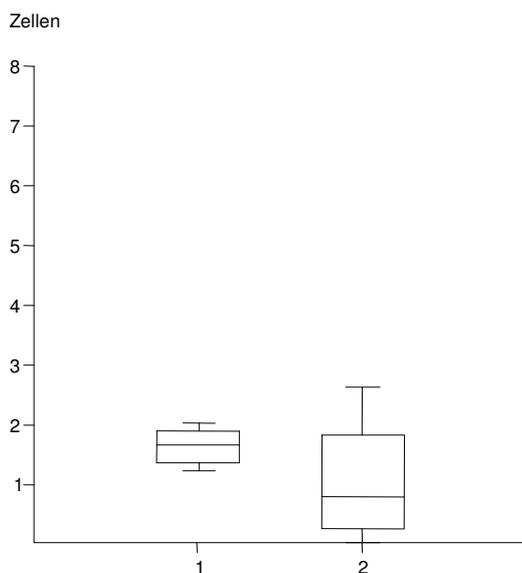


Abb. 9: α -Motoneurone im Thorakalsegment pro Rückenmarksquerschnitt

1 = Wildtypen

2 = *Cra1*-Mäuse

1.1.2.3 Lumbalmark

Die durchschnittliche Dichte an α -Motoneuronen innerhalb der Lumbalintumeszenz beträgt bei den Wildtypen $4,5 \pm 1,35$ pro Rückenmarksquerschnitt mit einer Streuung zwischen 2,6 und 5,75.

Die *Cra1*-Mäuse besitzen lumbal $3,76 \pm 0,95$ α -Motoneurone im Durchschnitt, das Intervall bewegt sich zwischen 2,2 und 4,75.

Die generelle Dichte der α -Motoneurone im Lumbosakral-Bereich ist deutlich höher als im thorakalen Abschnitt, erreicht aber nicht die Werte der zervikalen Zählung. Die Wildtypen weisen auch hier eine hochsignifikant ($p = 0,001$) höhere Zelldichte auf als die *Cra1*-Mäuse, nämlich durchschnittlich 0,74 Motoneurone pro Anschnitt mehr.

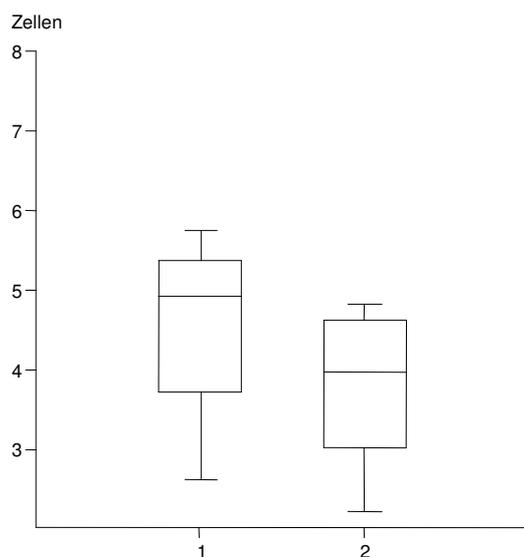


Abb. 10: α -Motoneurone in der Lumbal-Intumeszenz pro Rückenmarksquerschnitt

1 = Wildtypen

2 = *Cra1*-Mäuse

1.2 Expression der Transduktions- und Wachstumsfaktoren

Das Hauptaugenmerk bei der Beurteilung der Stärke der Expression wurde auf die α -Motoneurone im Ventralhorn des Rückenmarks gelegt. Zur semiquantitativen Erfassung wurden verschiedene Scoring-Systeme (III 2.3.2) verwendet.

Die Ergebnistabellen befinden sich im Anhang (IX, 1.2 ab Seite 121).

1.2.1 pMAPK

Allgemein ist die Anfärbung der pMAPK bei allen Präparaten stark ausgeprägt. Die graue Substanz hebt sich farblich von der weißen Substanz ab, sie ist, neben einer schwach blaugrauen Hintergrundfärbung, mittelbraun gefärbt, wohingegen die weiße Substanz lediglich die schwach blaugraue Hintergrundfärbung aufweist. Die Zellkerne der Neuronen zeigen eine kräftige Braunfärbung, die Nukleoli sind blau bis dunkelbraun, das Zytoplasma ist neben der Hintergrundfarbe sehr zart braun gefärbt. Die vereinzelt vorkommenden *Dark neurons* weisen eine starke dunkelbraune Färbung mit leuchtend blauem Nukleolus auf.

1.2.1.1 Extensität

Die Expression ist in allen Motoneuronen der Wildtypen vorhanden. Damit bildet sich ein geringfügiger, insignifikanter Unterschied zu den *Cra1*-Mäusen, bei welchen die Extensität bei einem Tier zervikal, bei zwei Tieren thorakal und bei drei Tieren lumbal nur zwischen 25 und 75% ausgeprägt ist. Die übrigen Tiere weisen eine durchgehende Expression auf.

1.2.1.2 Färbeintensität

Die Färbeintensität der MAPK-Expression in den positiven Zellen der Zervikal-Intumeszenz ist bei den *Cra1*-Mäusen mit durchschnittlich $1,64 \pm 0,33$ geringfügig und damit insignifikant stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen mit $1,56 \pm 0,31$. Die Werte der Wildtypen erstrecken sich zwischen 1,25 und 2, innerhalb der *Cra1*-Gruppe bewegen sie sich in einem Rahmen zwischen 1 und 2.

Thorakal besitzen die Wildtypen mit $1,94 \pm 0,24$ im Mittel eine stärkere, aber nicht signifikante Anfärbung als die *Cra1*-Mäuse mit $1,77 \pm 0,49$. Ihre Werte verteilen sich zwischen 1,75 und 2,25, die der *Cra1*-Mäuse zwischen 1,5 und 2,5.

Ähnlich verhält sich die pMAPK-Färbeintensität im lumbosakralen Bereich. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist allerdings deutlicher ausgeprägt mit einem Durchschnitt von $1,88 \pm 0,25$ bei den Wildtypen und einer schwächeren Expression von $1,44 \pm 0,46$ bei den *Cra1*-Mäusen. Das Werte Maximum liegt bei den Wildtypen bei 2, das Minimum bei 1,5; bei den *Cra1*-Mäusen liegen die Werte zwischen 1 und 2. Der Unterschied zwischen den Gruppen besitzt auch hier keine statistische Signifikanz.

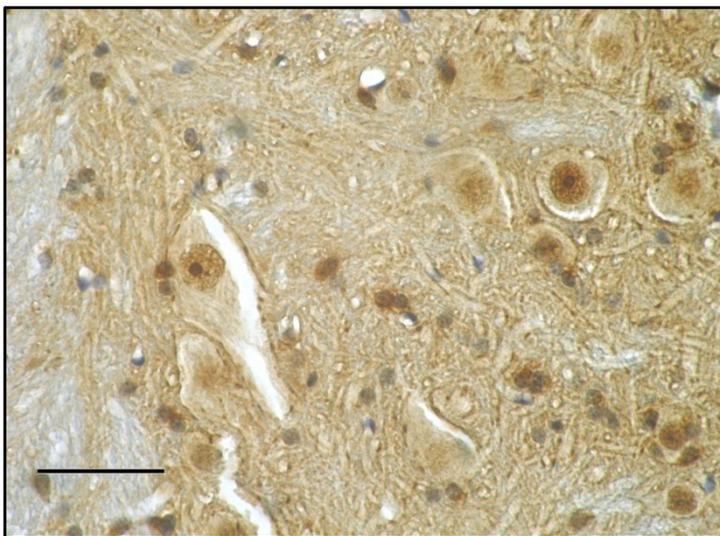


Abb. 11:

Hohe Intensität der pMAPK-Anfärbung in den Nuklei der lumbalen Motoneurone einer Wildtyp-Maus

Vergrößerung: 50 μ m

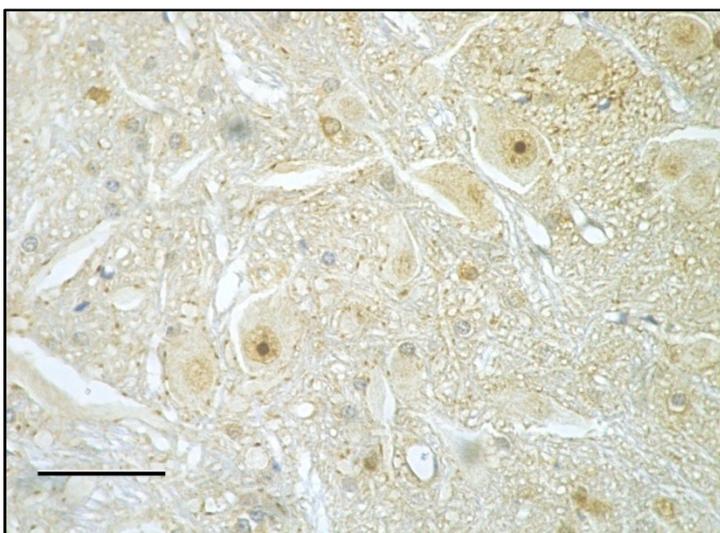


Abb. 12:

Schwache Intensität der pMAPK-Anfärbung in den Nuklei der lumbalen Motoneurone einer *Cra1*-Maus

1.2.1.3 pMAPK-Expression im Remmele Score

Die Expression der pMAPK in den α -Motoneuronen des zervikalen Segments der Wildtypen liegt im Durchschnitt bei $6,25 \pm 1,26$ (Intervall zwischen 5 und 8), bei den *Cra1*-Mäusen ist sie geringfügig und damit insignifikant stärker ausgeprägt mit einem Durchschnitt von $6,33 \pm 1,22$. Die Summationsscores streuen dabei zwischen 4 und 8.

Im thorakalen Segment beträgt die durchschnittliche Expression der Wildtypen $7,75 \pm 0,96$, bei einer Streuung zwischen 7 und 9. Bei den *Cra1*-Mäusen ist die Expression der pMAPK im thorakalen Bereich mit $6,8 \pm 2,04$ insignifikant schwächer ausgeprägt. Sie bewegt sich in einem Intervall von 4 bis 10.

In der Lumbal-Intumeszenz liegt die mittlere pMAPK-Expression der Wildtypen bei $7,5 \pm 1$ in einem Intervall von 6 bis 8. Die Expression ist damit deutlich, aber insignifikant stärker als die der *Cra1*-Mäuse, welche durchschnittlich bei $5,11 \pm 1,96$ liegt und sich in einem weiten Intervall von 3 bis 8 bewegt.

1.2.1.4 pMAPK-Expression im einfachen Score

Die Auswertung mittels einfachen Scores sollte verdeutlichen, ob pMAPK und Erk5 in den α -Motoneuronen zum Untersuchungszeitpunkt eher nukleär oder zytoplasmatisch lokalisiert wird.

Die nukleäre pMAPK Expression liegt in der zervikalen sowie der lumbalen Intumeszenz bei allen Tieren der Wildtyp-Gruppe bei 2 ± 0 . In der Gruppe der *Cra1*-Mäuse ist sie in diesen beiden Bereichen insignifikant schwächer ausgeprägt und erreicht nur einen Durchschnitt von $1,22 \pm 0,67$ zervikal bzw. $1,22 \pm 0,44$ lumbal. Im thorakalen Segment ist die Expression der Wildtypen mit einem Mittelwert von $1,5 \pm 0,58$ nicht signifikant schwächer als die der *Cra1*-Mäuse mit $1,8 \pm 0,42$.

Im Zytoplasma der α -Motoneurone der Wildtypen ist nur die blaugraue Hintergrundfärbung mit einem sehr zarten braunen Farbeinschlag zu erkennen. Deshalb wurde die zytoplasmatische Expression der pMAPK in allen drei Segmenten mit 0 bewertet. In der Gruppe der *Cra1*-Mäuse findet sich eine schwache zytoplasmatische Expression. Sie liegt im Durchschnitt zervikal bei $0,125 \pm$; im thorakalen Segment bei 0,44 und lumbosakral bei 0,25. Die

gruppenspezifischen Unterschiede weisen keine statistische Signifikanz auf.

1.2.2 Erk5

Der generelle Anfärbungsgrad der Erk5-Immunhistochemie ist eher schwach. Dabei gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz. Der Hintergrund ist schwach grau-hellbraun gefärbt. Die Neuronen und Gliazellen weisen eine spezifische Expression auf. Ihre Zellkerne sind stark hellbraun gefärbt, die Nukleoli stellen sich blau-braun dar. Das Zytoplasma der α -Motoneurone ist in manchen Zellen schwach positiv (hellbraun), in anderen weist es neben der Hintergrundfarbe vereinzelt punktuelle, randständige Erk5 Expression auf, welche sich ebenfalls hellbraun darstellt. Die wenigen *Dark neurons* sind stark hellbraun mit leuchtend blauem Nukleolus, ohne erkennbare Begrenzung zwischen Nukleus und Zytoplasma.

1.2.2.1 Extensität

In den Präparaten der Wildtypen färben sich durchweg alle Motoneurone immunopositiv. Bei den *Cra1*-Mäusen ist dies nur im zervikalen und thorakalen Rückenmark gegeben. In drei lumbalen Rückenmarkspräparaten ist nicht die gesamte Zellpopulation angefärbt.

Statistisch weist der gruppenspezifische Unterschied keine Signifikanz auf.

1.2.2.2 Färbeintensität

Zervikal ergibt sich bei den Wildtypen eine durchschnittliche Erk5-Färbeintensität von $0,94 \pm 0,13$ mit einer sehr geringen Streuung. Die Intensität der Wildtypen ist damit insignifikant schwächer ausgeprägt als bei den *Cra1*-Mäusen, die einen durchschnittlichen Score von $1,17 \pm 0,55$ erreichen. Die Streuung innerhalb der Gruppe ist größer und reicht von 0,5 bis 2,25; wobei sich der größte Anteil im Bereich von 1 einpendelt.

Thorakal ist die Färbeintensität bei den Wildtypen geringgradig und damit insignifikant stärker ausgeprägt als bei den *Cra1*-Mäusen. Sie erreichen einen Mittelwert von $1,63 \pm 0,48$ bei einer Verteilung zwischen 1 und 2. Die *Cra1*-Mäuse zeigen eine durchschnittliche Expression von $1,32 \pm 0,62$ mit einer größeren Streuung innerhalb der Gruppe bei Werten zwischen 0,5 und 2.

Auch lumbal zeigen die Wildtypen mit einem Score von $1,44 \pm 0,43$ eine insignifikant höhere Erk5-Färbeintensität bei gleicher Verteilung wie thorakal (zwischen 1 und 2). Die *Cra1*-Mäuse erreichen einen Mittelwert von $1,04 \pm 0,52$, ihre Werte erstrecken sich mit breiterer Streuung zwischen 0,5 und 1,75.

1.2.2.3 Erk5-Expression im Remmele-Score

Die Erk5-Expression im zervikalen Segment der Wildtypen ergibt einen Mittelwert von $3,75 \pm 0,5$ mit einem Maximum bei 4 und einem Minimum bei 3. In der Zervikalintumeszenz der *Cra1*-Mäuse ist die Expression insignifikant stärker ausgeprägt und es ergibt sich ein Mittelwert von $4,56 \pm 2,08$. Der maximale Wert erreicht immerhin 9; das Minimum liegt bei 2,5. Die Verteilung innerhalb der Gruppe ist also in einem viel größeren Rahmen mit einer weiten Streuung, die aber eine fokale Ballung zwischen 3 und 4 aufweist.

Thorakal befindet sich die durchschnittliche Erk5-Expression der Wildtypen bei $6,5 \pm 1,91$ innerhalb eines Intervalls von 4 bis 8. Die Streuung innerhalb der Gruppe ist insgesamt gering, die Hälfte der Tiere befindet sich am oberen Ende bei 8. Die *Cra1*-Mäuse zeigen eine insignifikant, aber deutlich schwächere Anfärbung mit einem Durchschnitt von $4,63 \pm 2,97$. Innerhalb der Gruppe ist eine deutliche Heterogenität zu beobachten, drei Präparate zeigen eine Expression von 4, die anderen sind weit verstreut zwischen einem Maximalwert von 9 und einem Minimalwert von 0.

In der Lumbosakralintumeszenz sind die Präparate der Wildtypen mit durchschnittlich $5,75 \pm 1,71$ ebenfalls deutlich, jedoch nicht signifikant stärker angefärbt als die der *Cra1*-Mäuse mit $3,67 \pm 2,54$ im Mittel. Das Streuungsverhalten ist ähnlich wie im thorakalen Bereich, die Wildtypen bewegen sich in einem Bereich von 4 bis 8. Die *Cra1*-Mäuse zeigen eine breite Streuung mit einem Minimum von 0,5 und einem Maximum von 8, bei 4 ergibt sich, wie schon thorakal, eine Ansammlung von Werten.

1.2.2.4 Erk5-Expression im einfachen Score

Die nukleäre Erk5-Expression der Wildtypen ist zervikal mit durchschnittlich $1,75 \pm 0,5$ stark ausgeprägt. Bis auf ein Tier weisen alle eine durchgehende Immunopositivität auf. Die *Cra1*-Mäuse zeigen nur in einem Teil der Motoneurone eine Expression und werden einheitlich mit 1 bewertet. Statistisch

ergibt sich keine Signifikanz im Gruppenvergleich.

Im thorakalen Bereich unterscheidet sich die nukleäre Expression innerhalb der beiden Gruppen im Durchschnitt nur gering. Bei den Wildtypen sind unerheblich und somit insignifikant mehr Zellen positiv gefärbt, sie erreichen einen Mittelwert von $1,67 \pm 0,58$. Die *Cra1*-Mäuse zeigen thorakal eine durchschnittliche nukleäre Erk5-Expression von $1,38 \pm 0,52$.

Im lumbalen Segment ist die Erk5-Expression wiederholt bei den Wildtypen stärker ausgeprägt. In ihrer Gruppe zeigen die Motoneurone eine signifikant ($p = 0,037$) stärkere nukleäre Anfärbung mit einem Mittelwert von $1,8 \pm 0,5$. Demgegenüber weisen die *Cra1*-Mäuse nur einen Score von $0,89 \pm 0,33$ auf.

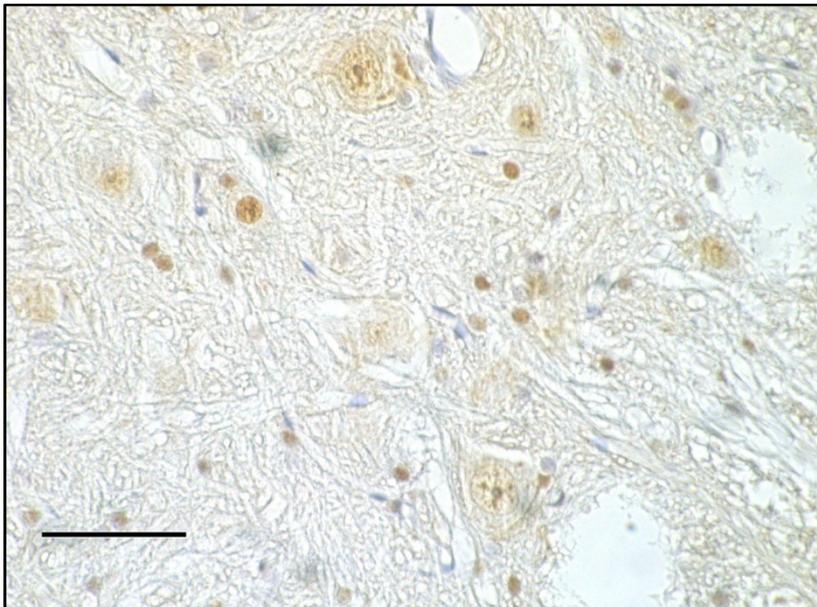


Abb. 13:
nukleäre und
zytoplasmatische
Erk5-Expression im
Lumbalmark beim
Wildtypen
Maßstab: 50 μ m

Zytoplasmatisch weisen in beiden Gruppen generell weniger Zellen eine positive Expression auf, und die gruppenspezifischen Unterschiede weisen keine statistische Signifikanz auf. Der Mittelwert in der Zervikalintumeszenz liegt in der Wildtypen-Gruppe bei $0,75 \pm 0,5$; in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse bei $0,55 \pm 0,5$.

Thorakal sind die Werte deutlich kleiner, aber mit der gleichen Verteilung: die zytoplasmatische Erk5-Expression ist bei den Wildtypen ($0,33 \pm 0,58$) stärker ausgeprägt als bei den *Cra1*-Mäusen ($0,13 \pm 0,35$).

Auch im lumbosakralen Segment setzt sich die Verteilung zu Gunsten der Wildtypen fort, sie besitzen einen Mittelwert von $1 \pm 0,82$, die *Cra1*-Mäuse

lediglich $0,44 \pm 0,53$.

1.2.3 pAkt

Die Anfärbung von pAkt ist durchgängig schwach ausgeprägt. Graue und weiße Substanz heben sich farblich nicht deutlich voneinander ab. Die Hintergrundfärbung stellt sich in einem schwachen Blau-braun dar. Die Neurone stellen sich spezifisch dar. Sie zeigen eine sehr zarte Braunfärbung des Zytoplasmas und einen blauen immunonegativen Nukleus inkl. Nukleolus. Die *Dark neurons* sind kräftig braun gefärbt mit leuchtend blauem Nukleolus, eine Begrenzung zwischen Nukleus und Zytoplasma ist nicht erkennbar.

1.2.3.1 Extensität

In beiden Gruppen zeigen segmentübergreifend alle Zellen eine Immunpositivität.

1.2.3.2 Färbeintensität

Die Färbeintensität von pAkt ist zervikal in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse insignifikant stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen. Die Wildtypen liegen durchschnittlich bei $1 \pm 0,35$, ihre Werte sind zwischen 0,5 und 1,25 gestreut. Die *Cra1*-Mäuse erreichen hingegen einen Mittelwert von $1,36 \pm 0,33$ mit einer Streuung zwischen 1,25 und 2; wobei sich vier Präparate bei 1,5 befinden.

Im thorakalen Segment besitzen die Wildtypen mit $1,63 \pm 0,32$ die insignifikant kräftigere Färbung. Ihr Score verteilt sich zwischen 1 und 2. Der Mittelwert der Intensität in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse liegt bei $1,2 \pm 0,31$. Sie bewegen sich in einem kleineren Intervall zwischen 1 und 1,75, der Großteil der Tiere ist bei 1 zu finden.

Die Färbeintensität im lumbosakralen Bereich zeigt keinen gravierenden Unterschied zwischen den Gruppen. Bei den Wildtypen ist sie mit $1,31 \pm 0,24$ geringfügig und damit insignifikant stärker ausgeprägt als bei den *Cra1*-Mäusen. Diese weisen eine durchschnittliche Anfärbung von $1,24 \pm 0,22$ auf. Bei beiden Gruppen liegen die Werte zwischen 1 und 1,5 gestreut, die Wildtypen zeigen eine Tendenz zur 1,5; die *Cra1*-Mäuse bewegen sich hauptsächlich bei 1.

1.2.3.3 pAkt-Expression im Remmele-Score

Die Expressions-Bewertung mit Hilfe des Remmele-Scores zeigt zervikal eine insignifikant stärkere Anfärbung bei den *Cra1*-Mäusen. Sie erreichen im Mittel $5,44 \pm 1,33$ in einem Intervall zwischen 4 und 8, wobei sich die meisten im Bereich von 6 aufhalten, während die Wildtypen durchschnittlich nur $4,25 \pm 1,71$ bei einer weiten Streuung zwischen 2 und 6 zeigen.

Im thorakalen Segment wiederum ist die durchschnittliche pAkt-Expression mit $6,5 \pm 1,3$ bei den Wildtypen stärker ausgeprägt, wobei die Werte der Tiere zwischen 5 und 8 variieren. Die *Cra1*-Mäuse haben im Durchschnitt mit $4,8 \pm 1,23$ eine insignifikant schwächere Expression, ihre Streuung bewegt sich zwischen 4 und 7, wobei sich die meisten Werte am unteren Ende befinden.

In der Lumbal-Intumeszenz zeigen erneut die Wildtypen eine, wenn auch nicht signifikant, kräftigere Anfärbung, sie haben eine durchschnittliche pAkt-Expression von $5,25 \pm 0,96$ mit einem Maximum bei 6 und einem Minimum bei 4. Der Mittelwert der Expression in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse beträgt $3,89 \pm 1,62$, die Werte bewegen sich zwischen 0 und 6, wobei sich auch in diesem Segment der Großteil bei 4 aufhält.

1.2.4 BDNF

Generell stellt sich die immunhistochemische Färbung von BDNF bei allen Tieren beider Gruppen schwach dar. Der Hintergrund ist blau-grau gefärbt, die weiße Substanz hebt sich von der grauen durch eine leichte gelb-braune Tönung ab. Die Neurone verschmelzen farblich fast mit dem Hintergrund, zeigen aber eine schwache gelb-braune Anfärbung des Zytoplasmas, der Nukleus mit Nukleolus ist immunonegativ.

Die *Dark neurons* sind, wie schon in den vorangehenden Färbungen kräftig braun gefärbt mit leuchtend blauem Nukleolus und lassen keine Begrenzung zwischen Nukleus und Zytoplasma erkennen.

1.2.4.1 Extensität

Bei beiden Gruppen ist nicht in allen Präparaten eine durchgehende Zellfärbung vorhanden. Bei den Wildtypen ist ein zervikales Präparat, bei den *Cra1*-Mäusen

das zervikale und lumbale Präparat eines Tieres betroffen. Der gruppenspezifische Unterschied in der Extensität weist keine statistische Signifikanz auf.

1.2.4.2 Färbeintensität

Die Anfärbung im zervikalen Rückenmarksabschnitt ist bei den *Cra1*-Mäusen insignifikant stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen. Diese zeigen eine durchschnittliche Färbeintensität von $1,38 \pm 0,48$. Die Werte streuen asymmetrisch zwischen 1 und 2 mit der Tendenz sich zur 1 hin zu bewegen. Die *Cra1*-Mäuse weisen im Mittel einen Score von $1,64 \pm 0,56$ auf, der sich, auf die Einzeltiere bezogen, in einem Bereich zwischen 1 und 3 bewegt und dabei gleichmäßig streut.

Thorakal weisen die *Cra1*-Mäuse mit einem Durchschnitt von $1,4 \pm 0,36$ ebenfalls die stärkere Färbung auf, wohingegen die Wildtypen insignifikant schwächere Werte von $1,06 \pm 0,43$ erreichen. Ihre Streuung verteilt sich zwischen 0,5 und 1,5. Dagegen bewegt sich die Streuung innerhalb der *Cra1*-Gruppe zwischen 1 und 2 mit kleinen Peaks bei 1,25 und 1,75.

Lumbal weisen die Motoneurone der Wildtypen eine insignifikante, aber deutlich stärkere Expression auf. Sie liegt bei $1,81 \pm 0,38$, wobei die Werte zwischen 1,5 und 2,25 pendeln. Die mittlere Färbeintensität der *Cra1*-Mäuse beträgt $1,15 \pm 0,69$. Es liegt ein innerhalb der Gruppe weit gestreutes Intervall zwischen 0 und 2,25 vor. Kleine Peaks bilden sich nur bei 1 und 1,75.

1.2.4.3 BDNF-Expression im Remmele-Score

Die in der Färbeintensität erkennbare Tendenz bestätigt sich auch im Remmele-Score. In der Gruppe der Wildtypen liegt der Summationsscore für die BDNF-Expression zervikal bei $4,5 \pm 1,9$ mit einem Minimum bei 2 und Maximum bei 6. Die Werte streuen asymmetrisch, so dass die Mehrzahl der Tiere am oberen Ende zu liegen kommt. Die Expression bei den *Cra1*-Mäusen ist zervikal mit durchschnittlich $5,67 \pm 1,41$ deutlich, aber nicht signifikant stärker ausgeprägt. Ihr Score-Intervall liegt zwischen 3 und 7, das Streuverhalten ist ähnlich wie für die Wildtypen, so dass im Bereich zwischen 6 und 7 die meisten Werte zu finden sind.

Auch thorakal zeigen die Wildtypen mit $4,75 \pm 2,22$ eine geringgradig und insignifikant schwächere Expression gegenüber den *Cra1*-Mäusen mit $5,5 \pm 1,78$. Die Wildtypen bewegen sich weit gestreut in einem Bereich von 2 bis 7. Das Intervall der *Cra1*-Mäuse ist ähnlich mit Werten zwischen 2 und 8, die Streuung ist ebenfalls breit, wobei die meisten Werte zwischen 6 und 7 zu liegen kommen.

Lumbosakral ist die BDNF-Expression der Wildtypen insignifikant aber deutlich stärker mit durchschnittlich $7 \pm 1,41$. Die Scores liegen zwischen 6 und 9 mit deutlicher Tendenz zum unteren Ende. Die *Cra1*-Mäuse weisen dagegen nur eine mittlere Expression von $4,6 \pm 2,76$ auf. Ihre Streubreite ist sehr groß, zwischen 0 und 9 mit einer äußerst heterogenen Verteilung.

2. Untersuchungen am Nervus ischiadicus

Es konnten von jedem Tier beider Gruppen geeignete Semi- und Ultradünnschnitte des N. ischiadicus angefertigt werden. In beiden Gruppen war jeweils ein Präparat aufgrund des inadäquaten Erhaltungszustandes nicht auswertbar.

2.1 Lichtmikroskopische Befunde

Die lichtmikroskopische Betrachtung der Semidünnschnitte ergab keine nennenswerten qualitativen Unterschiede zwischen den Gruppen.

Das Perineurium mancher Faszikel ist artifiziell gebrochen, der subperineurale Spalt an manchen Stellen verbreitert. Das Endoneurium ist bei manchen Präparaten rissig. Die myelinisierten Fasern stellen sich zirkulär dar, das Myelin scheint kompakt. Pathohistologische Hinweise auf andere Nervenerkrankungen waren nicht gegeben.

Eine elektronenmikroskopische Untersuchung wurde angeschlossen (2.2).

2.2 Pathomorphologische Fasercharakteristika

2.2.1 Doppelungen der Myelinscheide

Myelin Doppelungen (MD) sind bei beiden Gruppen nur in 4 Präparaten vorhanden und entziehen sich damit auch einer statistischen Relevanz. Dabei kommen sie bei den Wildtypen allerdings geringgradig häufiger vor als bei den *Cra1*-Mäusen. Die Streubreite innerhalb der Wildtyp-Gruppe bewegt sich zwischen 1 und 3 mit einem Durchschnitt von $1 \pm 1,15$; die *Cra1*-Mäuse zeigen ein bis zwei MD mit einem Durchschnitt von $0,26 \pm 0,56$ pro Faszikelquerschnitt.

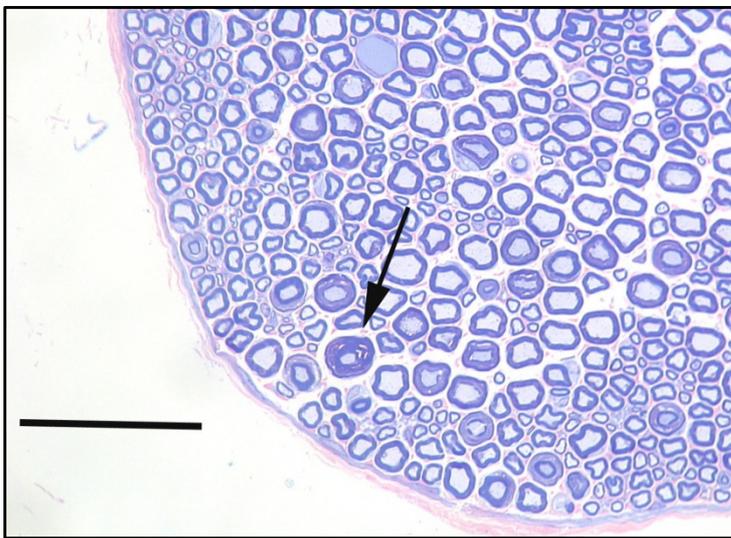


Abb. 14:

Myelinscheiden-Doppelung
(Pfeil)

2.2.2 Intratubäre Myelindebris

Ein geringes Ausmaß an Myelinzerfallsprodukten ist bei beiden Gruppen in jedem Präparat aufzufinden. Bei den Wildtypen sind sie geringgradig häufiger als bei den *Cra1*-Mäusen. Ihr Mittelwert liegt bei $2,57 \pm 0,98$ pro Faszikelquerschnitt, die Werte erstrecken sich in einem Bereich von 1 bis 4. Die meisten Werte befinden sich zwischen 3 und 4. Die *Cra1*-Mäuse zeigen ebenfalls ein bis vier Fasern mit Myelinsplittern pro Faszikel und liegen damit im Durchschnitt bei $2,63 \pm 1,12$. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist statistisch nicht signifikant.

2.2.3 Wallersche Degenerationen

Wallersche Degenerationen (WD) sind ein seltener Befund. Der Unterschied zwischen den Gruppen ist sehr gering. Bei den Wildtypen ist lediglich in einem Faszikelquerschnitt eine WD vorhanden. Sie weisen deshalb mit $0,14 \pm 0,38$ einen geringgradig und deshalb insignifikant kleineren Mittelwert auf als die *Cra1*-Mäuse, bei denen in drei Präparaten jeweils eine Wallersche Degeneration vorkommt (Mittelwert: $0,16 \pm 0,37$).

2.2.4 Outfolded Myelin Loops

Outfolded Myelin Loops (OMLs) sind nicht in jedem Faszikel aufzufinden. In der Wildtyp-Gruppe sind drei von sieben Präparaten betroffen, bei allen Tieren jeweils nur einseitig. Durchschnittlich kommen $1 \pm 1,53$ OML pro Faszikelquerschnitt vor, bei einer weiten Streuung in einem Rahmen von 1 bis 4 OML pro Präparat. Die *Cra1*-Mäuse weisen mit durchschnittlich $2,11 \pm 2,94$ eine insignifikant höhere Dichte an OML pro Faszikelquerschnitt auf. In ihrer Gruppe sind OML in 11 von 20 Faszikeln aufzufinden, in einem weiten Intervall zwischen 1 und 10, wobei die Streuung innerhalb der Gruppe gering ist, die meisten Werte befinden sich zwischen 2 und 3.

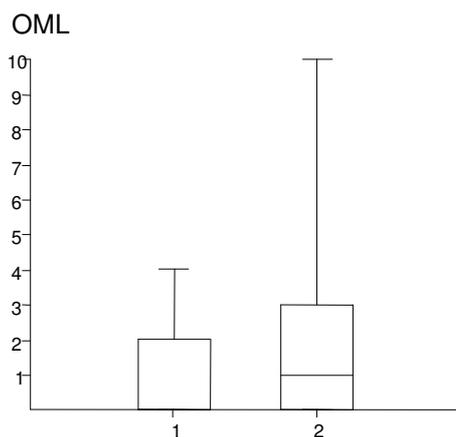


Abb. 15:
Outfolded Myelin Loops (OML)
1 = WT; 2 = *Cra1*-Mäuse

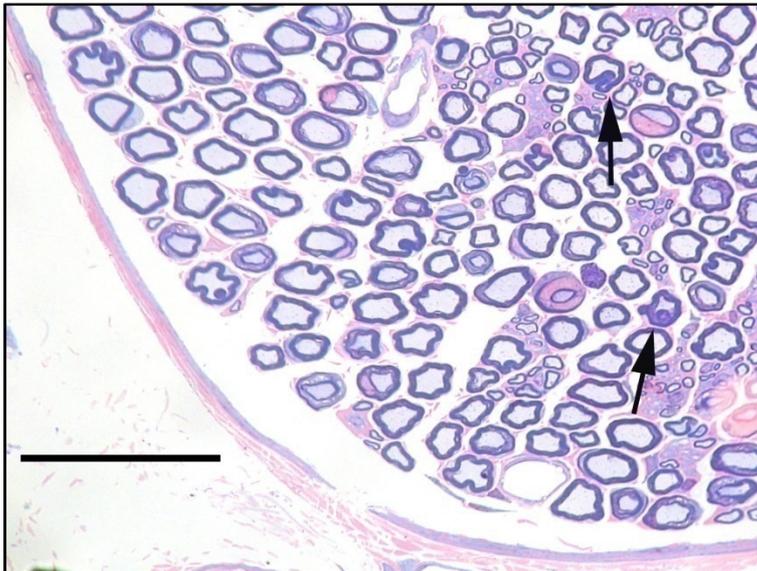


Abb. 16:

Outfolded Myelinloops
(Pfeile)

Maßstab: 50µm

2.2.5 Infolded (Inner) Myelin Loops

Infolded Myelin Loops (IMLs) kommen numerisch häufiger vor als OMLs. Es zeigen sich deutliche Variationen zwischen den Nerven innerhalb der einzelnen Tiergruppen. Bei beiden Tiergruppen sind sie in jedem Faszikelquerschnitt aufzufinden, in der Gruppe der Wildtypen mit einer etwas und damit insignifikant geringeren Dichte als in der *Cra1*-Gruppe. Im Durchschnitt weisen die Wildtypen $9,57 \pm 3,95$ IML pro Querschnitt auf, die *Cra1*-Mäuse zeigen im Mittel $11,47 \pm 7,44$ IML pro Faszikelquerschnitt. Ihr Intervall bewegt sich weit gestreut zwischen 1 und 34, wobei sich die meisten Werte zwischen 9 und 14 bewegen. Die Werte der Wildtypen bewegen sich mit breiter Streuung in einem Rahmen zwischen 2 und 14.

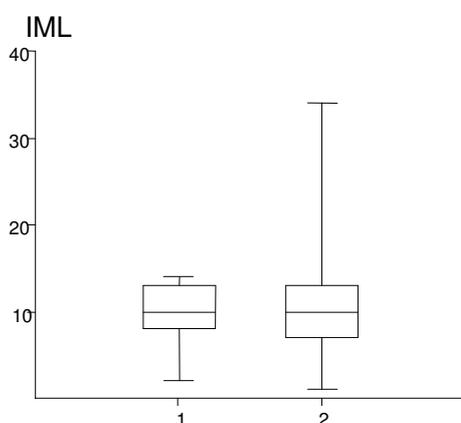


Abb. 17:

Infolded Myelin Loops (IML)

1 = WT; 2 = *Cra1*-Mäuse

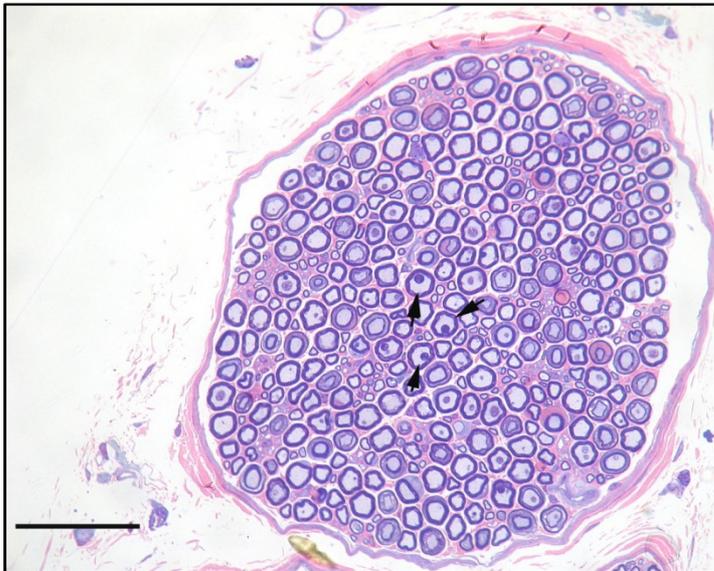


Abb.: 18

Infolded Myelin Loops (Pfeile)

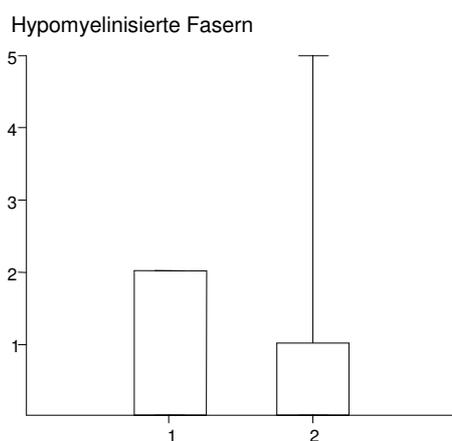
Maßstab: 50 μ m

2.2.6 Hypomyelinisierte Fasern (HF)

Visuell detektierbare hypomyelinisierte Faserprofile sind ein seltener Befund und zeigen zwischen den Gruppen nur einen sehr kleinen und deshalb insignifikanten Unterschied. Der Befund tritt bei den *Cra1*-Mäusen mit $0,79 \pm 1,44$ im Mittel etwas häufiger auf. Ihr Maximum liegt bei 5, das Minimum bei 1, mit einer geringen Streuung. Die Mehrheit liegt zwischen 1 und 3. In der Gruppe der Wildtypen liegt der Mittelwert bei $0,71 \pm 0,95$, hypomyelinisierte Fasern können in 3 Faszikelquerschnitten ein- bis zweimal nachgewiesen werden, bei den *Cra1*-Mäusen sind sie in den Faszikeln von sechs Tieren anzutreffen.

Abb. 19:

Hypomyelinisierte Fasern

1 = WT; 2 = *Cra1*-Mäuse

2.2.7 Axonale Atrophien/Schrumpfung

Reduzierte Durchmesser myelinisierter Axone finden sich zahlreich in jedem Faszikelquerschnitt. Die Gruppe der Wildtypen zeigt mit durchschnittlich $7,43 \pm 3,69$ reduzierten Durchmessern pro Faszikelquerschnitt eine signifikant ($p = 0,003$) größere Anzahl als die *Cra1*-Mäuse mit einem Durchschnitt von $3,63 \pm 1,46$. Die Werte der Wildtypen streuen zwischen 2 und 13. Das Maximum der *Cra1*-Mäuse liegt bei 6, das Minimum bei 1, der Hauptteil der Werte befindet sich im Bereich zwischen 3 und 4.

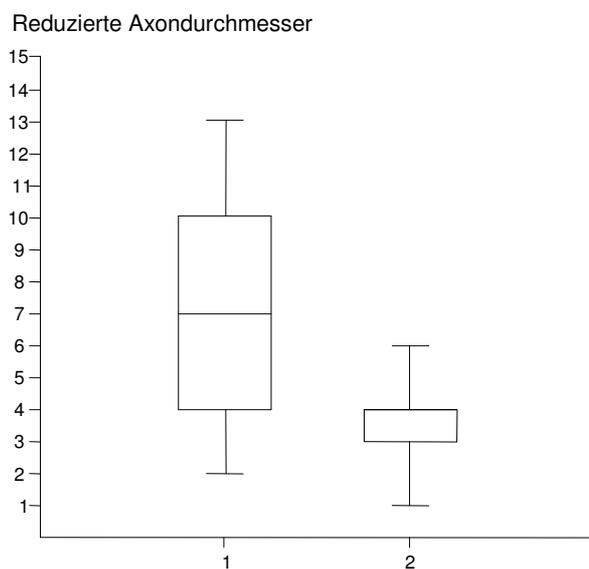


Abb. 20: Reduzierte Axondurchmesser

1 = WT; 2 = *Cra1*-Mäuse

Die Ergebnistabellen befinden sich im Anhang IX 1.3 Seite 131.

2.3 Weitere Elektronenmikroskopische Befunde

Die Ultradünnschnitte des rechten und linken N. ischiadicus aller Tiere konnten mit einer Vergrößerung von 2500 bis 32000 befundet werden.

Das Perineurium ist bei allen Präparaten beider Gruppen bis auf einige artifizielle Risse intakt und weist seine physiologische Lamellenstruktur aus konzentrisch angeordneten, miteinander verbundenen Perineuralzellen auf, welche beidseits von Basalmembranen umgeben sind.

Zwischen den Lamellen sind Kollagenfibrillen erkennbar. Bei einem Präparat der Wildtyp-Gruppe findet sich zwischen den Zelllagen zudem eine myelinisierte Nervenfasern mit normaler Schnürringformation und intakten Paranodien.

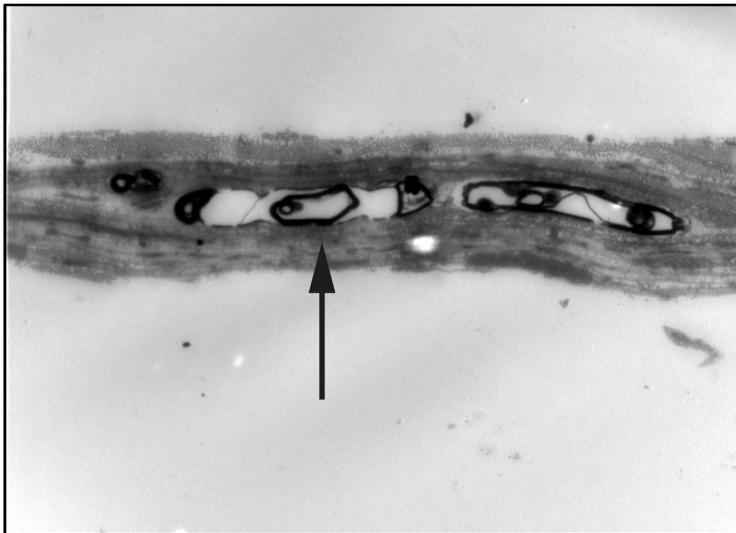


Abb. 21:

Myelinisierte Faser (Pfeil) im Perineurium einer Wildtyp-Maus (x 8000)

Der subperineurale Spalt ist innerhalb beider Gruppen oftmals artifiziell erweitert. Bei einem Präparat der Wildtypen und *Cra1*-Mäuse findet sich vermehrt myxoide Grundsubstanz im Spalt. Bei einem weiteren zeigen sich Mastzellzahlen im oberen Grenzbereich. Alle anderen Tiere weisen einen leeren subperineuralen Raum auf.

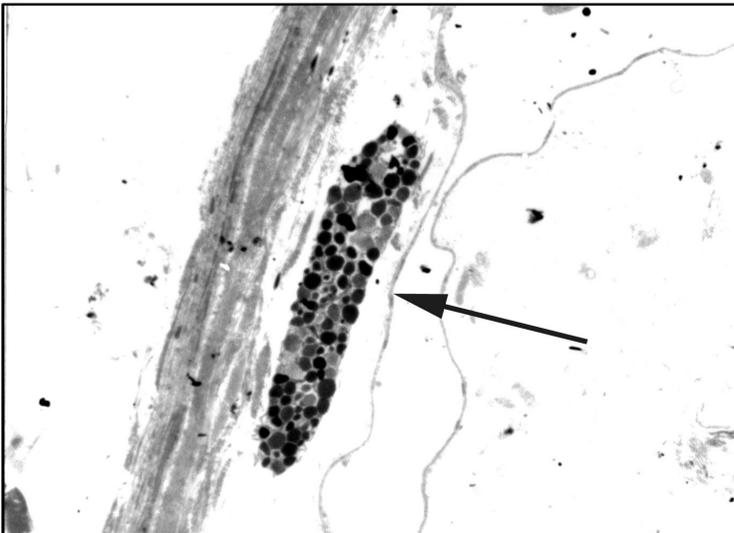


Abb 22: Mastzelle (Pfeil) im subperineuralen Spalt einer Wildtyp-Maus (x 2500)

Das endoneurale Interstitium ist bei einigen Tieren beider Gruppen sehr rissig, aber ansonsten unauffällig. Es besteht aus längs verlaufenden, parallel zu den Nervenfasern orientierten Kollagenfasern vom Typ I, elastischen Elementen, Fibroblasten und optisch leeren Zwischenräumen, welche vermutlich zum großen Teil aus Wasser bestehen.

Die endoneuralen Gefäße sind gruppenübergreifend bei allen Tieren ohne pathologischen Befund und abgesehen von Ausläufern weißer Blutzellen perfusionsbedingt leer. In ihrer Nähe sind oftmals Mastzellen zu beobachten. Die Untersuchung der Endothelzellverbindungen suggerierte in allen Präparaten eine intakte Blut-Nerven-Schranke.

Die myelinisierten Fasern weisen gruppenübergreifend kompaktes Myelin auf, welches die typische Myelinscheidenperiodizität aufweist, die nur vereinzelt von fixationsbedingter Leopardenmusterung durchbrochen wird. Selten sind, in Präparaten beider Gruppen, optisch erkennbare hypomyelinisierte Fasern vorhanden.

Gruppenübergreifend sind vielen Fasern die Schmidt-Lantermanschen Kerben deutlich sichtbar. Weder die Schmidt-Lantermanschen Kerben noch das unkompaktierte Myelin der Paranodien zeigen pathologische Veränderungen. Bei einem Tier der Wildtyp-Gruppe ist bei auffällig vielen Fasern das Myelin aufgetrennt. Faserquerschnitte, welche genau im Bereich der Ranvier Schnürringe verlaufen, sind nur äußerst selten aufzufinden. Dabei zeigen sich

der übliche Axondurchmesser und eine erhöhte Dichte an Neurofilamenten.

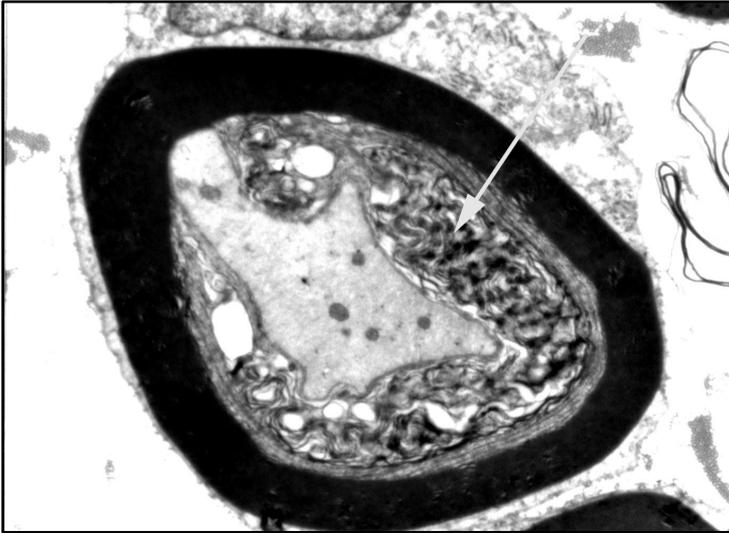


Abb 23: aufgetrennte Myelinscheide (Pfeil) bei Wildtyp-Maus (x 10000)

In den stereotypen internodalen Abschnitten zeigt das Axonskelett in beiden Gruppen eine gleichmäßige, parallel zum Axon verlaufende Anordnung von Mikrotubuli und Neurofilamenten.

In einigen Präparaten finden sich mild dilatierte Mitochondrien im Axoplasma. Bei zwei Präparaten der Wildtypen und bei vier Präparaten der *Cra1*-Mäuse ist das Axon-Schwannzell-Netzwerk außerhalb der paranodalen Region in einigen Fasern deutlich ausgeprägt.

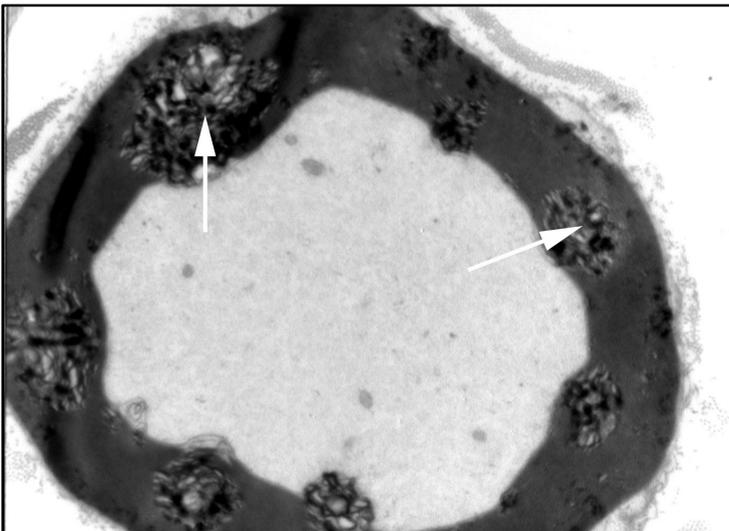


Abb 24: Leopardenmuster im kompaktierten Myelin bei *Cra1*-Maus(x 10000)

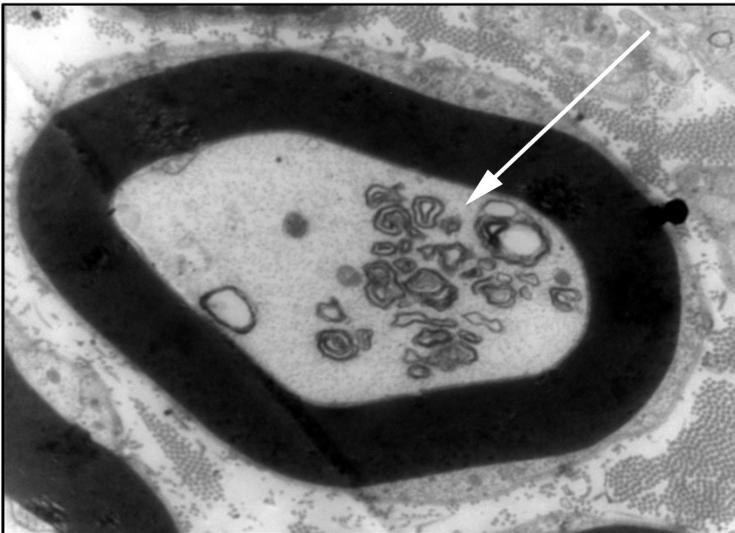


Abb. 25: hyperplastisches Axon-Schwannzellnetzwerk bei *Cra1*-Maus (x 16000)

Die Schwannzellen der myelinisierten Fasern sind bei beiden Gruppen, mit Ausnahme von vereinzelt milden Hypertrophien des Zytoplasmas, ohne besonderen Befund. Ihre Kerne und das perinukleäre Zytoplasma, die sich in der Mitte der internodalen Bereiche deutlich darstellen, zeigen durchgehend einen physiologischen Aufbau ohne pathologische Abnormitäten. In einem Präparat der *Cra1*-Gruppe finden sich Schwannzell-Einschlüsse in Form von Reichs π -Granula.



Abb 26: Reichs π -Granula (Pfeil) in Schwannzelle von myelinisierter Faser bei *Cra1*-Maus (x 12500)

Die durchschnittliche Mitochondriendichte der größten myelinisierten Fasern der Faszikelquerschnitte liegt in der Wildtypen-Gruppe bei $7,1 \pm 0,7$ und bei den *Cra1*-Mäusen bei $7,5 \pm 0,71$ pro Axonquerschnitt.

Die nicht-myelinisierten Fasern zeigen gruppenübergreifend multifokal eine artifizielle Axon-Vakuolisierung sowie vakuolisierte Mitochondrien. In der Gruppe der *Cra1*-Mäuse zeigen sich in wenigen Fasern geringgradig ausgeprägte axonale Ödeme. Diese liegen in der Wildtyp-Gruppe nicht vor.

Die Remakzellen der nicht-myelinisierten Fasern zeigen in beiden Gruppen keine pathologischen Veränderungen. Ihre Basalmembranen sind intakt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in keiner der beiden Gruppen signifikante ultrastrukturelle Veränderungen auffallen. Die artifiziell bedingten Abweichungen kommen gruppenübergreifend vor.



Abb 27: axonale Ödeme (Pfeil) in nicht-myelinisierten Fasern bei *Cra1*-Maus (x 12500)

2.4 Morphometrische Betrachtung des N. ischiadicus

In der Gruppe der Wildtypen wurde ein Nerv (12b) wegen inadäquatem Erhaltungszustand von der Bewertung ausgeschlossen. Bei den *Cra1*-Mäusen war ein Präparat (7b) aus technischen Gründen der automatisierten Analyse nicht zugänglich. Die Ergebnistabellen befinden sich im Anhang IX, 1.4, Seite 132.

2.4.1 Faszikel- und Endoneuralfläche, Faseranzahl und -dichte

Die Wildtyp-Mäuse besitzen eine durchschnittliche Faszikelgrundfläche von $102058 \mu\text{m}^2 \pm 36834$. Die maximale Fläche ist $144157 \mu\text{m}^2$ groß, die kleinste

gemessene Fläche $49782 \mu\text{m}^2$. Trotz der weit gespannten Streuung innerhalb der Gruppe bewegen sich die meisten Faszikelflächen in einem Bereich zwischen 100000 und $120000 \mu\text{m}^2$.

Die Faszikelgrundflächen der *Cra1*-Mäuse sind im Vergleich signifikant kleiner ($p = 0,041$). Ihre durchschnittliche Faszikelfläche beträgt $75606 \mu\text{m}^2 \pm 25689$ und ist deshalb nur halb so groß, wie die der Wildtypen. Die einzelnen Faszikel weisen in ihrem Querschnitt sehr unterschiedliche Grundflächen von 28598 bis $137157 \mu\text{m}^2$ mit einer breiten Streuung innerhalb der Gruppe auf, wobei sich die meisten Werte in einem Bereich zwischen 70000 und $95000 \mu\text{m}^2$ befinden.

Die Form der Faszikelquerschnitte sind in beiden Gruppen zu gleichen Anteilen rund oder oval.

Nach Abzug von Perineurium und subperineuralem Spalt beträgt die Endoneuralfäche der Wildtypen durchschnittlich $41442 \mu\text{m}^2 \pm 17870$ bei einer Verteilung zwischen 16731 und $64738 \mu\text{m}^2$. Histogramme zeigen dabei ein unregelmäßiges Profil.

Die durchschnittliche Endoneuralfäche der *Cra1*-Mäuse ist mit $32743 \pm 15189 \mu\text{m}^2$ um fast $10000 \mu\text{m}^2$ kleiner als die der Wildtypen. Die Flächen bewegen sich zwischen einem Maximum von $62864 \mu\text{m}^2$ und einem Minimum von $9428 \mu\text{m}^2$, mit einer ebenfalls breit ausgeprägten Streuung innerhalb der Gruppe, wobei sich die Werte der Hälfte der Faszikel in einem Rahmen zwischen 20000 und $40000 \mu\text{m}^2$ aufhalten.

Der Unterschied zwischen den Gruppen weist insgesamt keine statistische Signifikanz auf.

Die durchschnittliche Anzahl an myelinisierten Nervenfasern innerhalb der Wildtyp-Gruppe ist mit $1339 \pm 389,4$ Fasern hochsignifikant ($p < 0,001$) höher als bei den *Cra1*-Mäusen, welche lediglich $755 \pm 223,4$ Fasern im Mittel aufweisen.

Innerhalb der Wildtyp-Gruppe besitzt der Faszikel mit den meisten Fasern 1683 , der kleinste gezählte Faserwert liegt bei 743 Fasern pro Faszikelquerschnitt. Die Werte erfahren innerhalb dieser Gruppe keine große Streuung und bewegen sich zum großen Teil zwischen 1400 und 1700 .

Die Faseranzahl der *Cra1*-Mäuse erstreckt sich zwischen 373 und 1322 Fasern pro Faszikelquerschnitt. Die Streuung innerhalb der Gruppe ist weit, die meisten Werte bewegen sich aber in einem Rahmen zwischen 600 und 1000 Fasern pro Faszikel.

Die durchschnittliche Faserdichte pro Quadratmillimeter innerhalb der Wildtyp-Gruppe liegt bei 13575 ± 1720 Fasern pro mm^2 , mit einem Maximum von 16793 Fasern und einem Minimum von 11501 Fasern pro mm^2 . Die Fasern innerhalb der Wildtypen-Gruppe zeigen damit im Vergleich zur *Cra1*-Gruppe eine signifikant ($p = 0,001$) höhere Dichte.

Bei den *Cra1*-Mäusen beträgt die durchschnittliche Faserdichte pro Quadratmillimeter lediglich 10309 ± 1835 Fasern pro mm^2 und erstreckt sich in einem Bereich zwischen 6731 und 14079 Fasern pro mm^2 .

Die Streuung ist bei den Wildtypen gering. Die Werte bewegen sich, bis auf zwei Ausreißer, in einem Bereich zwischen 12000 und 14000. Die Werte der *Cra1*-Mäuse weisen eine deutlich breitere Streuung auf, der Großteil erstreckt sich in einem weiten Rahmen zwischen 8000 und 14000.

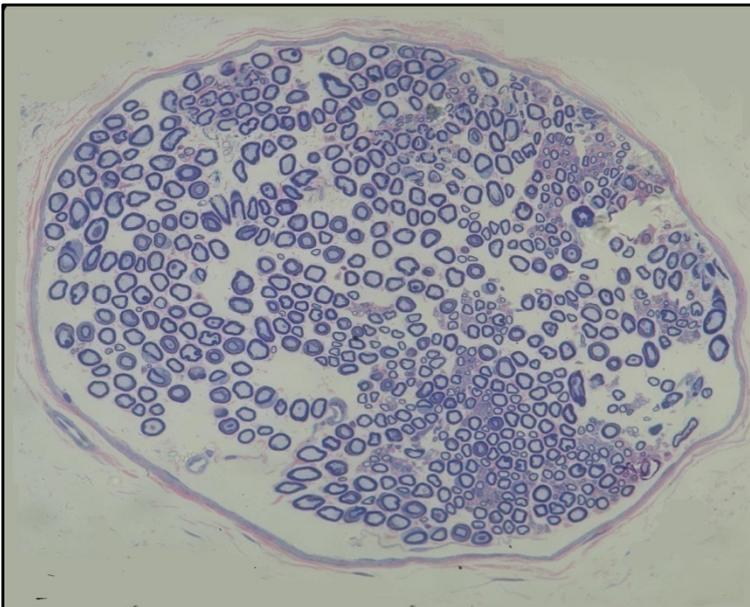


Abb 28:

**Faszikel einer *Cra1*-Maus
mit geringgradig
verminderter Faserdichte
(7647/ mm^2)**

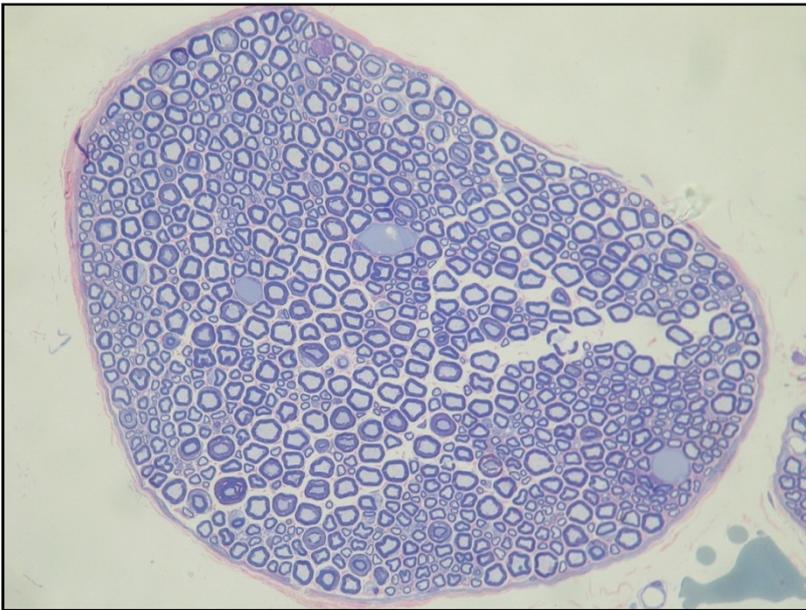


Abb 29:

**Faszikel einer Wildtyp-
Maus mit normaler
Faserdichte
(14286/mm²)**

2.4.2 Flächenverteilung der myelinisierten Einzelfasern

Um die Verteilung der Flächengrößen innerhalb der einzelnen Faszikel zu beurteilen, wurde sie anhand von Histogrammen bildlich verdeutlicht (Anhang IX, 2, ab S. 133).

Die Flächengrößenverteilung der myelinisierten Fasern innerhalb der Gruppe der Wildtypen verhält sich homogen. Der Seitenvergleich von linkem und rechtem N. ischiadicus der einzelnen Tiere zeigt keine Unterschiede. Die Mehrzahl der Fasern der gemessenen Faszikel bewegt sich innerhalb der Gruppe in einem Größenbereich zwischen 10 und 100 μm^2 , einzelne Fasern erreichen Größen bis zu 150 μm^2 .

Die Fasergrößenverteilung ist bei allen Tieren bimodal mit einer ersten großen Spitze im Bereich von 15 bis 30 μm^2 und einer zweiten, kleineren Spitze bei 50 bis 70 μm^2 . In den Histogrammen von sechs Tieren befindet sich im Bereich von 70 bis 90 μm^2 ein kleines Plateau, in zwei davon ragt aus dem Plateau eine kleine Spitze hervor.

Die Größenverteilung der myelinisierten Fasern verhält sich bei den *Cra1*-Mäusen, im Vergleich zur Gruppe der Wildtypen, weitaus heterogener. Die Mehrzahl der Fasergrößen erstreckt sich zwar, übereinstimmend mit den Befunden bei den Wildtypen, zwischen 10 und 100 μm^2 , einzelne Fasern verteilen sich aber in den Größenbereichen zwischen 100 und 200 μm^2 , also in

einem deutlich höheren Bereich als in der Wildtyp-Gruppe.

Der erste Peak der Fasergrößen liegt bei fast allen Tieren in einem Bereich von 10 bis 30 μm^2 . Danach folgen, anders als bei den Wildtypen, welche durchgehend eine bimodale Verteilung aufweisen, mehrere Peaks in Größenordnungen, die innerhalb der Gruppe stark variieren. Eine bimodale Verteilung liegt nur bei einem Tier einseitig vor, außerdem weisen die Tiere eine deutliche aber unsystematische Seitendiskrepanz auf.

Die gruppenspezifischen Unterschiede besitzen keine statistische Signifikanz.

2.4.3 Axonflächen

Der Vergleich der Flächen myelinisierter Axone innerhalb der Wildtypen-Gruppe zeigt in den Histogrammen ein homogenes Verhalten, auch der Seitenvergleich der einzelnen Tiere zeigt keine Abweichungen.

Die Axongrößen liegen durchgehend in einem Bereich von 10 bis 100 μm^2 . Mit Ausnahme von zwei Tieren befinden sich die größten Fasern im Bereich zwischen 60 und 90 μm^2 . In einem Faszikel erstreckt sich der Größenbereich bis zu 150 μm^2 . Die Größenverteilung der Axone ist bei allen Tieren bimodal mit einem ersten großen Peak im Bereich von unter 10 bis 20 μm^2 und einem zweiten kleineren Peak zwischen 30 und 45 μm^2 .

Die Größenverteilung der Axonflächen innerhalb der Gruppe der *Cra1*-Mäuse verhält sich ebenfalls weitgehend homogen. Der Seitenvergleich ergibt jedoch, entgegen den Ergebnissen in der Wildtyp-Gruppe, nur bei wenigen Tieren eine einheitliche Verteilung. Demnach bestehen beim Großteil der Gruppe Unterschiede zwischen den beiden Nerven.

Die Axonflächen bewegen sich einheitlich in einem Größenbereich von 10-100 μm^2 mit Schwankungen an der Obergrenze, die sich in einem Bereich zwischen 60 und 120 μm^2 bewegen. Bei den meisten Tieren liegt eine bimodale Verteilung vor, mit einem ersten Peak im Bereich von 10 μm^2 und einem zweiten Peak zwischen 20 und 60 μm^2 (im Mittel liegt er zwischen 35 und 55 μm^2). Einige Tiere zeigen eine trimodale Verteilung. Vergleicht man die einzelnen Axonflächen gruppenspezifisch miteinander, ergeben sich statistisch

signifikante Unterschiede ($p = 0,045$).

2.4.4 G-Ratio

In der Gruppe der Wildtypen befindet sich die G-Ratio in einem Bereich von 0,36 und dem oberen Grenzwert von 0,9. Der Gruppen-Mittelwert beträgt $0,66 \pm 0,09$. Der Großteil der Fasern (66,5%) bewegt sich in einem Bereich von 0,5 bis 0,699. Weitere 23% sind im Größenbereich von 0,7 bis 0,799 zu finden. Die restlichen 10,5% bewegen sich im Bereich unter 0,5 bzw. über 0,8.

Die G-Ratio in der Gruppe der *Cra1*-Mäuse erstreckt sich in einem deutlich weiteren Rahmen zwischen 0,074 und dem oberen Grenzwert von 0,9. Der Mittelwert liegt bei $0,63 \pm 0,12$. Die Verteilung ist fast identisch mit der Wildtyp-Gruppe. Die G-Ratio von 62,5% der Fasern hält sich im Bereich zwischen 0,5 und 0,699 auf. Weitere 19,5% befinden sich bei 0,7 bis 0,799. Die übrig bleibenden 18% liegen unterhalb von 0,5 bzw. oberhalb von 0,799.

Statistisch ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

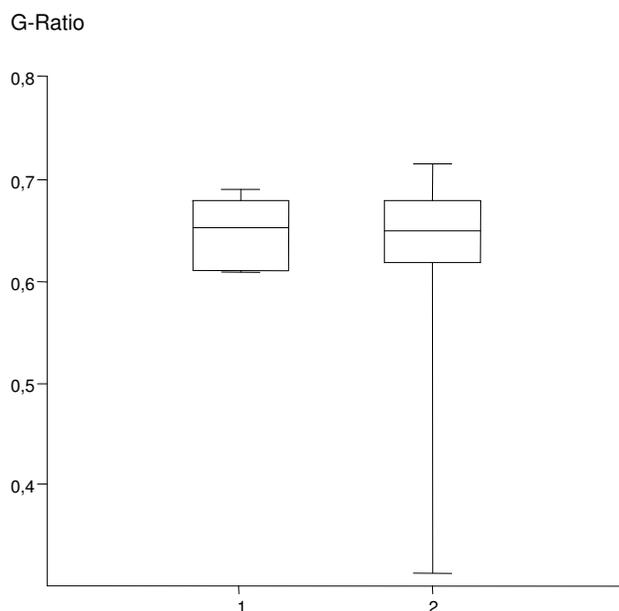


Abb. 30:

G-Ratio

1 = Wildtypen

2 = Cra1-Mäuse

V DISKUSSION

Die molekularen Ursachen der vieler Motoneuronerkrankungen, wie ALS, sind bis dato nicht ausreichend bekannt¹⁴. Auch in besser charakterisierten Mausmodellen sind die molekularen Zusammenhänge zwischen Mutation und neuronaler Degeneration nicht endgültig entschlüsselt¹²⁻¹⁴.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Stellung des *Cra1*-Mausmodells als Modell für motoneurondegenerative Erkrankungen zu überprüfen, und die Auswirkungen der Dynein-Mutation auf die motoneuronale Signaltransduktion sowie die Physiologie ihrer Axone genauer in Augenschein zu nehmen.

1. Die *Cra1*-Maus - ein MND-Modell?

Das bekannteste und meistgenutzte Mausmodell für motoneurondegenerative Erkrankungen wurde 1994 von Gurney et al. eingeführt. Dieses Modell basiert auf der Expression einer mutierten Form (G93A) des humanen Cu/Zn SOD1-Proteins. Klinisch und neuropathologisch weisen die Mäuse Charakteristika einer selektiven Vorderhorndegeneration, ähnlich der humanen ALS, auf⁷¹. Das Modell ist der SOD1-Mutation im Rahmen der familiären ALS beim Menschen sehr ähnlich und bietet deshalb eine gute Möglichkeit, die pathologischen Vorgänge der Krankheit zu untersuchen.

Vor kurzer Zeit wurde außerdem eine SOD1-Mutation beim Hund als Ursache für die kanine Degenerative Myelopathie festgemacht⁵⁶. Die kanine DM ist damit das erste spontan auftretende Tiermodell für ALS. Die betroffenen Hunde könnten zur weiteren Erforschung der Prozesse dienen, die der Motoneurondegeneration in DM und ALS unterliegen, z.B. um modifizierende Genloci zu entschlüsseln und umweltbedingte Faktoren zu identifizieren, welche den Schweregrad der Krankheit beeinflussen können⁵⁶. Da die meisten Hunde in einer relativ frühen Phase der Krankheitsprogression euthanasiert werden, könnte man theoretisch wertvolles Untersuchungsmaterial gewinnen, welches beim Menschen in dieser Phase natürlich nicht zugänglich ist. Die Eignung von DM-Hunden als Tiermodell zu Forschungszwecken ist jedoch begrenzt, da die

Krankheit erst in einem Lebensalter von ca. 8 Jahren ausbricht⁴⁸⁻⁵⁵ und Hunde wegen der, im Vergleich zur Maus, viel aufwändigeren Haltungsbedingungen, dem längeren Reproduktionszyklus und ihren sozialen Bedürfnissen als Versuchstiere eine schlechtere Eignung aufweisen.

Bedenkt man allerdings, dass die mutierte SOD1 nur für 1 - 2 % aller ALS Fälle verantwortlich ist¹², so ist die dringende Notwendigkeit gegeben, weitere Pathomechanismen zu entschlüsseln und auf dieser Basis nach neuen Mausmodellen zu suchen.

Unter den möglichen Kandidaten werden insbesondere Störungen im axonalen Transport schon lange als Ursache neurodegenerativer Erkrankungen diskutiert^{109, 113, 142, 158, 159, 219-222}. Sowohl in ALS-Patienten, als auch in Mausmodellen mit mutierter SOD1, konnten Veränderungen der axonalen Struktur dokumentiert werden^{19, 82, 85, 106, 139, 223}.

Insbesondere der retrograde Transport zeichnet sich als relevant für motoneurondegenerative Geschehen ab, wohingegen Störungen in der Gegenrichtung eher mit Neuropathien behaftet sind^{142, 221}.

Als wichtigstes Motorprotein des retrograden Transports ist Dynein als Kandidat für ein weiteres transgenes Mausmodell ins Rampenlicht gerückt. Im Rahmen des ENU Mutagenese-Screenings wurde dann das *Cra1*-Modell entdeckt¹²⁸.

Diese, auch in der vorliegenden Arbeit untersuchte Mauslinie weist eine Punktmutation in der *Heavy Chain* des Dyneins auf, welche ihre Homodimerisierung beeinträchtigt, aber keinen Einfluss auf die Anzahl der *Heavy* und *Intermediate Chains* hat¹²⁹. Im Jahre 2003 wurden sie, zusammen mit der ähnlichen *Loa*-Maus, als neues MND-Modell vorgeschlagen, da die Untersucher in heterozygoten Tieren eine signifikante Abnahme an α -Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks mit entsprechender Parese der Hintergliedmaße beobachten konnten¹²⁹.

Die Einschätzung der *Cra1*-Mutante als ALS Modell trifft allerdings auf einigen Widerspruch. Zum Teil wird *Cra1*-Mäusen eine sensorische Neuropathie unterstellt, da einzelne Untersuchungen eine Verringerung der Axone in den Dorsalwurzeln und keine Abnahme der α -Motoneurone erbrachten¹³⁴. Ähnliche

Beobachtungen wurden auch für das *Loa*-Modell publiziert ¹³⁵.

Analog zu den Arbeiten von 2003 ¹²⁹ konnten wir in den, die appendikuläre Muskulatur versorgenden, zervikalen und lumbalen Rückenmarksintumescenzen eine, im Vergleich zu den Wildtypen, signifikante Abnahme der α -Motoneurone in der *Cra1*-Gruppe bestätigen. Wie Hafezparast et al. ¹²⁹ führen wir die Paresen der Hintergliedmaßen daher mit der Abnahme an Vorderhornneuronen in Verbindung. Hingegen ergab die Überprüfung der Spinalganglien keine Hinweise auf einen aktuellen Untergang bzw. eine Schädigung sensorischer Neurone. Desgleichen waren keine Nageotte-Körperchen oder Zelldichtenabnahme festzustellen, welche als Anzeichen auf einen stattgefundenen Neuronverlust zu deuten wären ^{46, 224}. Außerdem konnten wir keine Einschlusskörperchen in den α -Motoneuronen auffinden, wie sie in Form von Bunina Bodies für ALS ¹⁵ oder auch von Hafezparast et al. für *Cra1* beschrieben werden ¹²⁹. Dieser Befund ist nicht verwunderlich, da es sich bei den Präparaten, in denen Hafezparast et al. die Einschlusskörperchen entdeckten, um homozygote Embryos handelte und er keine Einschlusskörperchen für heterozygote adulte Tiere, wie die von uns untersuchten, beschrieben hat ¹²⁹.

Die unterschiedlichen und zum Teil kontroversen Ergebnisse am *Cra1*-Modell wurden alle an den Rückenmarksabschnitten L3 bis L5 gewonnen. Außerdem untersuchten alle Arbeiten ähnliche Altersgruppen und alle Tiere wurden auf einem C3H-Hintergrund gezüchtet ^{129, 134}, so dass die Differenzen eher auf methodische denn endogene Unterschiede zurückzuführen sein dürften.

Eine Abbildung im Artikel von Dupuis et al. lässt darauf schließen, dass sie sich bei der Zählung auf den für die appendikuläre Muskulatur zuständigen Bereich des Ventralhorns konzentriert haben, also hauptsächlich auf Rexed-Lamina IX ²²⁵. Genauere Angaben, die Rückschlüsse auf methodische Algorithmen ziehen lassen, sind in der Veröffentlichung leider nicht vorhanden. In unserer Studie wurden die Motoneurone im gesamten Ventralhorn von Laminae VII bis IX berücksichtigt, das heißt, wir erfassten neben den Bereichen für die appendikuläre auch die Bereiche für die axiale Muskulatur.

Die Einschlusskriterien für Motoneurone entsprachen in unserer Arbeit den von

Hafezparast et al. postulierten. Alle positiv gewerteten Zellen wiesen einen Mindestdurchmesser von 17,5 μm , einen sichtbaren Kern mit Nukleolus und die charakteristische multipolare Zytomorphologie von Motoneuronen auf.

Dupuis et al. identifizierten ihre Zellen zunächst anhand einer Mindestfläche von 600 μm^2 und Positivität für Cholin-Acetyltransferase (ChAT) ¹³⁴. Auf dieser Basis machten sie eine Gegenprobe gemäß der Kriterien von Hafezparast et al. und fanden doppelt so viele Zellen als nach ChAT Färbung. Daraus schlossen sie, dass der von Hafezparast et al. ermittelte Zellverlust aus der Abnahme nicht-motorischer Vorderhornneurone mittlerer Größe resultiert. Sie geben dabei allerdings keine weitere Auskunft bezüglich der vermuteten Zellfunktion.

Bei einem solchen Experiment sollte man allerdings berücksichtigen, dass ChAT im Ventralhorn nicht nur in α -Motoneuronen, sondern in allen cholinergen Neuronen exprimiert wird. Dazu zählen auch γ -Motoneurone, präganglionäre viszeromotorische Neurone ²²⁶ und inhibitorische Interneurone ²²⁷. All diese Zellen bewegen sich bei der Maus in einem Größenbereich zwischen 300 bis 1000 μm^2 ²²⁸ und liegen damit zum großen Teil in dem von Dupuis et al. für ihre Zählungen festgelegten Größenbereich für α -Motoneurone. Daher könnte ein Verlust von α -Motoneuronen durch die Präsenz dieser Zellen verschleiert worden sein. Um die Verwechslung von α -Motoneuronen mit ähnlich großen Zellen auszuschließen, wurden in unserer Arbeit inhibitorische Interneurone durch Calbindin identifiziert und von den gezählten α -Motoneuronen subtrahiert.

Zusätzlich zu den Lumbalsegmenten wurden in der vorliegenden Studie auch die Zervikal- und Thorakalbereiche des Rückenmarks untersucht. Besonders in der Zervikalintumeszenz konnte ein signifikanter Zellverlust in der *Cra1*-Gruppe festgemacht werden. Der überproportionale Ausfall der α -Motoneurone in den Intumeszenzen deckt sich mit der vordergründigen Symptomatik in den appendikulären Bereichen und den kaum vorhandenen Symptomen im Bereich der paraspinalen Muskeln.

Ungeachtet der Vorgaben von Dupuis et al. belegt unsere Untersuchung die von Hafezparast et al. postulierte Motoneurondegeneration in *Cra1*-Mäusen. Die Erfassung der Zellzahlen muss deshalb neben morphologischen Charakteristiken auch die exakte Rückenmarkstopographie und Marker für

morphologisch ähnliche Zellen berücksichtigen. Unter Einbezug dieser Kriterien stellt das *Cra1*-Modell nach unserer Ansicht ein geeignetes Untersuchungsmodell für Vorderhorndegeneration dar.

2. Einfluss der Dynein-Mutation auf die neuronale Signaltransduktion

Dynein spielt, zusammen mit Dynactin, eine Schlüsselrolle im retrograden axonalen Transport neurotropher Faktoren von der Zellperipherie zum Perikaryon¹⁴⁸. Diese Faktoren werden von Zielgeweben und Hüllzellen ausgeschüttet und binden an Tyrosinkinase-Rezeptoren (TrkR), mit welchen sie in Endosomen internalisiert werden und, mit Hilfe von Dynein, zum Zellkörper transportiert werden, um dort Signalkaskaden anzustoßen, welche das Zellwachstum und –überleben regulieren²²⁹.

Eine Unterbrechung des axonalen Transports sollte im Perikaryon zu einer verminderten Verfügbarkeit von neurotrophen Faktoren führen. Auch der Verlust an Neurotrophen und überlebensfördernden Molekülen könnte zur Degeneration des betroffenen Neurons beitragen. Aus diesem Grund haben wir die Expression von einem Neurotrophin (BDNF) und mehreren Transduktionskaskaden (pAkt, pMAPK und Erk5) in den α -Motoneuronen des Ventralhorns untersucht.

Eines der wichtigsten Signalmoleküle für das Überleben von embryonalen wie auch adulten Neuronen ist BDNF. Dieses Neurotrophin wird hauptsächlich im ZNS synthetisiert. Während der Entwicklung kann es in niedrigen Spiegeln im Ventralhorn des Rückenmarks, in den peripheren Schwannzellen und im innervierten Muskel nachgewiesen werden. In der Adoleszenzphase wird die Synthese dann deutlich hochreguliert^{199, 230-232}. In der Peripherie dagegen konnte eine BDNF-Expression bisher nur in der Lunge, im Herzen und im Skelettmuskel nachgewiesen werden^{199, 200, 233}. Schwannzellkulturen zeigten, dass diese Zellen eine ergiebige Quelle für BDNF darstellen²³⁴ und in vitro Studien bewiesen, dass BDNF-mRNA von Schwannzellen des N. ischiadicus

exprimiert wird^{234, 235}. In vivo ist BDNF am gesunden peripheren Nerven kaum messbar, wird aber nach Nervendurchtrennung oder –quetschung deutlich hochreguliert²³⁴. Koliatsos et al. zeigten 1993, dass BDNF selektiv von den innervierten Muskeln zu den α -Motoneuronen im Rückenmark transportiert wird und diese vor Degeneration schützt²³¹. Eine weitere Studie besagt, dass die Supplementierung von BDNF während der embryonalen Entwicklung 40% der Motoneurone rettet, die normalerweise untergehen würden²³⁶.

Die Rolle von BDNF in neurodegenerativen Erkrankungen ist noch nicht endgültig geklärt. Immunhistochemische Untersuchungen zeigten, dass sich die Expression von BDNF im Rückenmark nicht zwischen ALS-Patienten und Gesunden unterscheidet²¹³ und therapeutische Versuche mit BDNF-Supplementierung am Menschen bisher nicht den gewünschten Erfolg brachten²⁸. Andererseits zeigte sich bei Studien am Wobbler-Mausmodell bei gleichzeitiger Gabe von CNTF durchaus ein überlebensfördernder Effekt auf die Motoneurone und eine Verzögerung der Krankheitssyptome um einen Monat²³⁷. Bei Morbus Alzheimer steigt der BDNF-Serumspiegel im frühen Stadium, vermutlich als kompensatorische Maßnahme, an und sinkt dann mit wachsender Demenz²³⁸. Für Morbus Parkinson ist die neurotrophische Wirkung von BDNF auf dopaminerge Neuronen in der Substantia nigra von besonderer Relevanz²³⁹.

Betrachtet man unsere Untersuchungsergebnisse bezüglich der BDNF-Expression in α -Motoneuronen, so zeigt sich nur bedingt ein Zusammenhang zwischen der Expression und der *Cra1*-Mutation. Zwar ist die BDNF-Anfärbung im Gesamtdurchschnitt bei den Wildtypen geringgradig kräftiger, im lumbosakralen Bereich sogar deutlich stärker ausgeprägt als bei den *Cra1*-Tieren, diese Situation ist jedoch im zervikalen und thorakalen Bereich umgekehrt. Hier wird BDNF in den Zellen der *Cra1*-Mäuse deutlich stärker exprimiert. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zeigt sich in keinem dieser Ergebnisse.

Darüberhinaus gibt es keine Korrelation zum Ausmaß des Zelluntergangs. Im stark vom Zellverlust betroffenen zervikalen Segment der *Cra1*-Mäuse ist die BDNF-Expression stärker ausgeprägt als bei den Wildtypen, im wenig vom Zellverlust betroffenen thorakalen Bereich allerdings ebenso.

Es stellt sich also die Frage, inwiefern der Transport von BDNF überhaupt durch die Dynein-Mutation beeinträchtigt wird.

Eine Studie, welche den Transport von Neurotrophinen in Neuronen untersucht hat, besagt, dass exogen an den Ischiadicus injiziertes BDNF retrograd, anscheinend rezeptor-mediert, in die Motoneurone im ventralen Rückenmark transportiert wird²⁴⁰. Der Artikel gibt allerdings keine Auskunft darüber, ob der Transport Dynein-abhängig passiert.

Der spezifische Rezeptor für BDNF ist Tyrosinkinase B (TrkB). Er wird in spinalen Motoneuronen exprimiert^{230, 231, 241-243} und durch Bindung von BDNF aktiviert. Der Rezeptor-Liganden-Komplex fungiert dann als retrograder Signalträger in Axonen des N. ischiadicus²⁴⁴. Wird BDNF am distalen Axonende appliziert, kommt es zur raschen Bindung und Aktivierung von TrkB, welches dann, zusammen mit seinem Ligand, retrograd zum Zellkörper transportiert wird, um dort überlebenswichtige Signalwege (z.B. die Aktivierung von CREB) anzustoßen²⁴⁵. Es ist nachgewiesen, dass TrkB an Dynein bindet^{148, 246}. Laut Yano et al.¹⁴⁸ sind die *Light* und *Intermediate Chains* für die Bindung zuständig. Diese sind von der *Cra1*-Mutation nicht direkt betroffen, werden aber möglicherweise durch die gestörte Homodimerisierung beeinträchtigt. Die deutlich schwächere BDNF-Expression in den Motoneuronen des Lumbalsegments deutet, trotz der gegenteiligen Situation im zervikalen und thorakalen Bereich, auf eine Transportproblematik hin. Möglicherweise wirkt sich die Dynein-Mutation auf den retrograden Transport in den Hintergliedmaßen deutlicher aus, da sie, im Vergleich zu den Vordergliedmaßen, die längeren Axone und somit längeren Transportwege besitzen. Die reduzierte BDNF-Expression im lumbalen Rückenmark ergänzt sich jedenfalls mit der betonten Parese der Hintergliedmaße der *Cra1*-Mäuse.

Da BDNF auch transportunabhängig ins Rückenmark gelangt, indem es dort direkt und von den peripheren Schwanzzellen synthetisiert wird^{234, 235}, muss man davon ausgehen, dass der dyneinabhängige retrograde Transport für diesen Faktor keine entscheidende Rolle spielt und es deshalb zu keinen signifikant messbaren Veränderungen bei den *Cra1*-Mäusen kommen musste.

Erk5 gehört in die Gruppe der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und

wird, wie Erk1/2 unter anderem in Neuronen exprimiert²⁴⁷. Da es zu den jüngsten entdeckten Faktoren der MAPKs, gehört ist seine Rolle in ALS und der Degeneration von Motoneuronen bis dato noch nicht erforscht²⁴⁸. Da Erk5 überlebensfördernde Prozesse initiiert^{176, 249} und bewiesenermaßen retrograd transportiert wird¹⁸⁹, haben wir, durch Untersuchung seiner Expression in den α -Motoneuronen des Rückenmarks, nach weiteren Zusammenhängen zwischen dem Zellverlust und der Dynein-Mutation gesucht.

Unsere Auswertung der Erk5-Expression in den α -Motoneuronen des Rückenmarks ergab eindeutige Ergebnisse mit einer fast durchgehend stärkeren Anfärbung in der Gruppe der Wildtypen. Die Ausnahme bildete lediglich, wie bei allen anderen Faktoren auch, das zervikale Segment, welches bei den *Cra1*-Mäusen eine stärkere Anfärbung aufweist, sofern man die Immunoreaktivität mit dem Remmele-Score ermittelt. Der thorakale und lumbale Rückenmarksbereich zeigten jeweils eine deutlich stärkere Expression in der Wildtyp-Gruppe. Die spezielle Betrachtung der nukleären und zytoplasmatischen Expression ergab ohne Ausnahme eine stärkere Ausprägung bei den Wildtypen. Dieser Unterschied ist nukleär im lumbalen Bereich sogar signifikant ($p = 0,037$).

Insgesamt scheint es in der Erk5-Expression durch die *Cra1*-medierte Störung im retrograden Transport zu Beeinträchtigungen zu kommen. Diverse Studien belegen, dass durch Neurotrophin-Stimulation am distalen Axon die Endozytose von aktivierten Trk-Rezeptoren induziert wird, welche dann durch schnellen, Dynein-abhängigen Transport retrograd zum Zellkörper gebracht werden, um dort Signalwege zu aktivieren, die das zelluläre Überleben fördern (z.B. die Phosphorylierung von CREB)^{148, 246}. Watson et al. zeigten, dass bei NGF und BDNF Stimulation am distalen Axon lediglich der Erk5-Signalweg im Perikaryon aktiviert wird. Eine lokale Neurotrophin Stimulation der Zellkörper führt hingegen zur Aktivierung von Erk1/2 und Erk5¹⁸⁹. Diese Erkenntnis bedeutet im Zusammenhang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die Dynein-Mutation der *Cra1*-Mäuse sich auf den Transport von Erk5 bzw. den Transport von Faktoren, welche Erk5 aktivieren, auswirkt, also wahrscheinlich auf die Beförderung aktivierter Trk-Rezeptoren. Die Abnahme an Erk5 in den α -Motoneuronen könnte dann wiederum durch den Verlust überlebensfördernder Faktoren zu einer Nervenzelldegeneration führen.

Wir müssen uns also erneut die Frage stellen, wie sich die Mutation in der Dynein Heavy Chain der *Cra1*-Mäuse auf den retrograden Transport von Trk-Rezeptoren am Axon auswirkt. Aktivierte Trk-Rezeptoren bewegen sich, gebunden an Neurotrophine, über vesikelabhängige Transportmechanismen am Axon entlang zum Perikaryon¹⁴⁷. Dabei kolokalisiert das Trk in den Vesikeln mit der 74 kDa *Intermediate Chain* des zytoplasmatischen Dynein-Komplexes¹⁴⁸. Es steht also fest, dass aktivierte Trks dyneinabhängig transportiert werden. Wie sich die *Cra1*-Mutation genau auf den Trk-Transport auswirkt, muss in weitergehenden Untersuchungen, z.B. durch eine Zweikammer-Studie mit Trks geklärt werden.

Um die These der Dynein-Abhängigkeit von Erk5 weiter zu überprüfen, haben wir weitere mitogen-aktivierte Proteinkinasen untersucht, und zwar im Besonderen Erk1 und 2. Diese leisten wichtige Beiträge zur Zellproliferation¹⁷³ und können, abhängig von den aktivierenden Stimuli, sowohl anti- als auch proapoptotische Wirkung entfalten^{248, 250-253}. Eine grundlegende Frage ist deshalb, ob MAPK Erk1/2 eine essentielle Funktion im neuronalen Überleben besitzt, da einige Studien klar dagegen zu sprechen scheinen^{197, 254-256}. Ihre Rolle in neurodegenerativen Erkrankungen ist noch nicht endgültig geklärt. In Morbus Alzheimer wirken Erk1/2 in frühen Krankheitsstadien bei der Tau-Hyperphosphorylierung mit²⁵⁷, wogegen ihnen bei Parkinson eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird²⁵⁸. In Bezug auf ALS konnte eine gesteigerte Erk1/2-Expression an SOD1^{G93A}-Mäusen hauptsächlich nach Auftreten erster klinischer Symptome in hypertrophen Astrozyten des Hirnstammes und Rückenmarks gefunden werden, was suggeriert, dass die Aktivierung von Erk1/2 in reaktiven Astrozyten eine mögliche Konsequenz der Motoneurondegeneration darstellt²⁵⁹. Wir konnten diesbezüglich in unseren MAPK-Präparaten keine Astroglia Auffälligkeiten feststellen.

Erk1/2 wird ubiquitär exprimiert und ist in unterschiedlich großer Menge in verschiedenen Geweben vorhanden¹⁷¹, es scheint also nicht zwingend auf den retrograden Transport am Axon angewiesen zu sein, um in die Perikaryen der Motoneurone im Rückenmark zu gelangen. Diese These wurde durch die, schon für Erk5 beschriebene, Neurotrophin-Stimulations-Studie von Watson et

al. untermauert^{189, 245}. Man kann den axonalen Transport für Erk1/2 jedoch nicht vollständig ausschließen, da in einer Ligationsstudie gezeigt wurde, dass Erk1 in signifikantem Maße distal und proximal der Nervenligation akkumuliert und Erk2 – wenn auch nicht in signifikantem Ausmaß – ebenfalls an beiden Ligationsenden zu finden ist²⁶⁰.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, wie schon für BDNF und Erk5, durchschnittlich eine stärkere Immunoreaktivität in der Gruppe der Wildtypen. Diese Tendenz setzt sich bei Betrachtung des Remmele-Scores der einzelnen Segmente, mit erneuter Ausnahme der Zervikalintumeszenz, fort. Dort ist die MAPK-Expression der *Cra1*-Mäuse geringfügig stärker ausgeprägt. Der gravierendste Unterschied zeigt sich erneut lumbal mit einer eindeutig kräftigeren Expression in der Gruppe der Wildtypen. Die nukleäre Expression ist ebenfalls bei den Wildtypen stärker ausgeprägt. Eine statistische Signifikanz besitzt allerdings keiner dieser Unterschiede. Die Expression von MAPK in den α -Motoneuronen des Vorderhorns scheint also durch die Dynein-Mutation beeinträchtigt zu werden – aber nur in geringem Ausmaß, da sie nicht auf den Transport vom Axonterminal zum Perikaryon angewiesen sind.

Ähnlich ist die Situation bei Akt. Hierbei handelt es sich um eine weit verbreitete zytoplasmatische Serin-Threonin-Kinase²⁶¹, welche unter pathologischen Bedingungen in einer Vielzahl von Zelltypen als Apoptoseblocker fungieren kann^{261, 262}. Einen Hinweis auf die Rolle von Akt der Motoneurondegeneration bei ALS gab eine Studie an *SOD1^{G93A}*-Mäusen die zeigte, dass die Akt-Expression schon in einer frühen präklinischen Phase in den Vorderhornneuronen zurückgeht²⁶³.

Ähnlich wie bei Erk1/2, zeigt unsere Auswertung der pAkt-Expression zwar fassbare, statistisch aber nicht signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Innerhalb der einzelnen Segmente wird pAkt bei den *Cra1*-Mäusen zervikal etwas stärker exprimiert als bei den Wildtypen, welche wiederum in den anderen beiden Bereichen eine kräftigere Expression aufweisen.

Da Akt ubiquitär exprimiert wird, können wir davon ausgehen, dass es nicht vom retrograden Transport abhängig ist. Ein Ligationsexperiment am N.

ischiadicus bei Ratten besagt sogar, dass es gar nicht axonal transportiert wird, da pAkt weder an der proximalen noch an der distalen Ligationsseite akkumulierte²⁶⁰. Diese Erkenntnis spricht dafür, dass Akt durch die Dynein-Mutation der *Cra1*-Mäuse nicht beeinträchtigt wird.

Betrachtet man unsere immunhistochemischen Untersuchungen zu den Transduktionseinheiten und BDNF zusammenfassend, so fällt auf, dass die deutlichsten Expressionsunterschiede zwischen beiden Gruppen im lumbalen Segment bestehen. Die nukleäre Expression von Erk5 ist dort bei den Wildtypen sogar signifikant stärker ausgeprägt als bei *Cra1*. Erstaunlicherweise werden alle Faktoren zervikal im Remmele-Score in der *Cra1*-Gruppe stärker exprimiert. Thorakal sind die geringsten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden. Dabei werden alle Faktoren mit Ausnahme des BDNF bei den Wildtypen stärker exprimiert.

Ein direkter Zusammenhang zwischen Expressionsstärke und dem Verlust an α -Motoneuronen kann bei keinem der Faktoren hergestellt werden.

Eine Erklärung für die durchgehend stark bewertete Expression aller Faktoren im zervikalen Segment der *Cra1*-Mäuse ergibt sich aus dem Färbeverhalten der sogenannten „*Dark neurons*“, die sich stark auf den Remmele-Score auswirken.

Diese Zellen, die vor allem zervikal gehäuft auftreten, weisen in jeder Immunhistochemie eine ungewöhnlich starke Anfärbung auf. Sie sind, laut Sugimoto et al., Neurone, welche degenerative Anzeichen wie Karyopyknose und Hyperchromatose aufweisen. Ihre prinzipiellen Charakteristiken sind ein intensiv und homogen gefärbtes Nukleoplasma und irreguläre Zellgrenzen, welche darauf hindeuten, dass sie geschrumpft sind²⁶⁴.

Da die *Dark neurons* nicht bei allen Tieren vorkommen, sondern lediglich in wenigen Präparaten, sind sie höchstwahrscheinlich als perfusionsbedingte Artefakte und nicht als pathologische Merkmale zu bewerten. Für die *Dark Neurons* als artifizielle Verzerrung der Expressionsintensität spricht, dass in der Auswertung durch den einfachen Score, in welchem sie von der Bewertung ausgeschlossen wurden, sowohl bei Erk1/2 als auch bei Erk5, in allen

Bereichen inklusive des zervikalen Segments eine stärkere Anfärbung bei den Wildtypen zu verzeichnen ist. Leider scheint das Scoring-System nach Remmele anfällig für solche Störungen durch Färbeartefakte zu sein.

Die durchgehend bei allen Faktoren schwach ausgeprägte Expression in den lumbosakralen Segmenten der *Cra1*-Mäuse scheint dagegen echt zu sein und kann bei für Erk5 und BDNF möglicherweise auf die längeren Transportwege in diesem Bereich zurückgeführt werden. Es scheint, als wäre es für das mutierte Dynein der *Cra1*-Mäuse im Bereich der Hintergliedmaße problematischer, die Vesikel zu transportieren, als im zervikalen oder thorakalen Bereich. Das klinische Bild der *Cra1*-Mäuse, welches die stärksten Ausfälle im Bereich der Hintergliedmaße zeigt, bestätigt unsere Befunde. Die Dynein-Mutation wird also vor allem in der Lumbosakralintumeszenz deutlich.

3. Durch die *Cra1*-Mutation hervorgerufene Veränderungen in Morphologie und Morphometrie des N. ischiadicus

Sowohl bei ALS als auch SMA werden in motorischen und gemischten Nerven Verluste großer myelinisierter A(α)-Fasern beobachtet^{19, 23-26, 43-46}, die im Zusammenhang mit der Motoneurondegeneration im Rückenmark stehen.

Aus diesem Grund haben wir bei den *Cra1*-Mäusen und Wildtypen den mischfunktionellen N. ischiadicus auf morphologische und morphometrische Veränderungen hin untersucht, welche auf den Zellverlust im Ventralhorn zurückgeführt werden könnten.

Die rein qualitative Untersuchung des N. ischiadicus ergab für alle Tiere eine weitgehend normale Histoarchitektur und damit keine visuell fassbaren Degenerationsfiguren. Lichtmikroskopisch bestanden somit keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

In der digitalen Bildanalyse der Nervenquerschnitte konnte der vermutete Verlust an Motoraxonen bei den *Cra1*-Mäusen dagegen durchaus verifiziert werden. Dieser signifikante Unterschied zur Wildtyp-Situation war gleichermaßen an den Faserzahlen, Faserdichten und an den absoluten

Faszikelflächen abzulesen.

Faszikelfläche und Faseranzahl stehen in enger Verbindung zueinander und können unabhängig gesehen starken individuellen Schwankungen unterliegen²⁶⁵. Die Faserdichte jedoch besitzt als Quotient von Faseranzahl und Faszikelfläche eine sichere Aussagekraft. In Abwesenheit myelinopathischer Bilder basiert die Abnahme der Axonzahlen in der *Cra1*-Gruppe mit hoher Sicherheit auf einer primären Axon-Schädigung in Folge des durch die Dynein-Mutation verursachten Motoneuronverlustes. Ohne die korrespondierenden Rückenmarkdaten könnte der Faserausfall allerdings nicht eindeutig funktionell zugeordnet werden. Die in der Gruppe der A(α)-Fasern zusammengefassten motorischen Axone und Ia/b-Afferenzen lassen sich auch morphometrisch unzureichend differenzieren und die sehr großen anulospiralen Afferenzen sind bei Mäusen bisher schwach charakterisiert. Unter Berücksichtigung der unversehrten Spinalganglien und – im Gegensatz hierzu – den depletierten Vorderhornlaminae, ist der Rückschluss auf eine Reduktion der motorischen Fasern aber durchaus zulässig. Im Übrigen decken sich die eigenen Befunde mit den Beobachtungen bei ALS- und SMA-Patienten^{19, 23-26, 43, 44, 46, 47}.

Die Auswirkungen der Dynein-Mutation auf die Flächen der Nervenfasern im Allgemeinen und Axon im Speziellen, sowie die sich daraus ergebende G-Ratio, dem wichtigsten Parameter zur Beurteilung des Myelinisierungsgrades²⁶⁶⁻²⁶⁸, wurden ebenfalls untersucht.

Eine abnormal dünne Myelinscheide würde sich in einer hohen G-Ratio ($> 0,7$) äußern, eine pathologisch verdickte Myelinscheide würde man dagegen über eine niedrige G-Ratio ($< 0,4$) erkennen. Der Vergleich der einzelnen Tiere beider Gruppen zeigt, dass sich die G-Ratio aller Präparate, mit Ausnahme einer *Cra1*-Maus, in einem Bereich zwischen 0,6 und 0,7 erstreckt. Diese Werte stimmen mit allgemein gültigen Angaben zur G-Ratio überein, die besagen, dass sie sich in einer weitgehenden Konstanz um 0,6 erstrecken sollten^{269, 270}. Es liegen also keine Hinweise auf pathologische Veränderungen im Myelinisierungsgrad der *Cra1*-Tiere vor. Vereinzelt kann es im Rahmen der axonalen Degeneration zu einer Abnahme der Myelinscheidendicke kommen, welche sich in einer höheren G-Ratio äußern würde. In diesem Sinne wurde sowohl bei ALS, als auch SMA vereinzelt ein Anstieg in der G-Ratio beobachtet

^{26, 43}. Diese Befunde sind allerdings nicht zwingend und korrelieren mit dem Stadium und der Dynamik der Erkrankung.

Der Faszikelquerschnitt eines im Rahmen der G-Ratio abweichenden *Cra1*-Tieres zeigt vom Mittelwert der Gruppe deutlich abweichende Ergebnisse. Seine Faszikelfläche ist mit $83200 \mu\text{m}^2$ im gruppeninternen Vergleich etwas größer als der Durchschnitt, die Faseranzahl ist allerdings im Vergleich zu niedrig (560), die Endoneuralfäche dementsprechend ungewöhnlich hoch. Die Faserdichte ist mit 6731 Fasern pro mm^2 die kleinste innerhalb der Gruppe. Bei Betrachtung des Faszikel-Semidünnschnittes sieht man ein zerrissenes Endoneurium. Die hohe G-Ratio lässt sich hier durch die ungewöhnlich vielen Fasern mit Schmidt-Lantermanschen Kerben (SLK) erklären. Die Anzahl der SLKs korreliert mit dem Axondurchmesser, je größer das Axon, desto mehr Spalten befinden sich im kompaktierten Myelin ²⁷¹⁻²⁷³. SLK's dienen vermutlich der Kommunikation zwischen innerem und äußerem Schwannzell-Zytoplasma ²⁷⁴ und besitzen metabolische und strukturerhaltende Bedeutung ²⁷⁵⁻²⁷⁷. Außerdem sind einige Fasern schräg angeschnitten, was ein spezielles *Correction-of-Obliqueness*-Modul zur Korrektur verlangt. Alternativ könnte man die Sampling-Prozedur verändern, was bei Whole-Trunk-Analysen nicht uneingeschränkt zulässig ist. Da nur der Nerv einer Seite derartige Werte aufweist, kann man pathologische Ursachen ausschließen und muss stattdessen von einem Artefakt ausgehen.

Die Flächenvermessung der einzelnen myelinisierten Fasern und ihrer Axone zeigt, dass sich die meisten Fasern der Wildtypen in einem Größenbereich zwischen 10 und $50 \mu\text{m}^2$ bewegen (62,3%). Die großen Fasern mit 50 bis $100 \mu\text{m}^2$ machen dagegen nur 32,2 % aus. In der Gruppe der *Cra1*-Mäuse lautet die prozentuale Verteilung 45,7% für die kleinen und 40,6% für die großen Fasern. Möglicherweise führt die partielle Beeinträchtigung des axonalen Transports bei den *Cra1*-Mäusen zu einer milden, aber weitläufigen Axonverdickung, welche sich allerdings noch innerhalb des Referenzbereichs der G-Ratio bewegt.

Axonale Schwellungen wurden schon mehrfach sowohl für ALS als auch für Mausmodelle mit mutierter SOD1 beschrieben und dort hauptsächlich auf Störungen im axonalen Transport und damit verbundene Ansammlungen von Neurofilamenten zurückgeführt ²⁷⁸⁻²⁸². Auch LaMonte et al., welche in ihrem

Mausmodell durch eine Dynamitin-Überexpression eine Störung im Dynein-Dynactin-Komplex hervorriefen, weisen in einer ihrer Abbildungen auf axonale Schwellungen hin ¹¹³. Es spricht also alles dafür, dass auch die Dynein-Mutation der *Cra1*-Mäuse zu axonalen Verdickungen führen kann. Auf welche Weise das genau passiert und welche Rolle die Neurofilamente in diesem Zusammenhang spielen, sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden.

Um den Verlauf der Nervenfaserdegeneration zu beobachten und mögliche Ursachen des Axonschwundes auszumachen, wurden außerdem pathomorphologische Fasercharakteristika im Sinne von Myelindegenerationen, -proliferationen und -instabilitäten, aber auch die drei Formen der axonalen Degeneration, sprich axonale Atrophie, axonale Dystrophie und Wallersche Degeneration erfasst und quantifiziert.

Wallersche Degenerationen, welche eine trophische Axondegeneration verkörpern ^{283, 284}, sind generell ein seltener Befund und unterscheiden sich in ihrer Anzahl kaum zwischen beiden Gruppen.

Ähnlich verhält es sich mit hypomyelinisierten Fasern als Zeichen der Myelindegeneration und Myelindebris innerhalb des Schwanzzelltubus.

In- und Outfolded Myelinloops (IML und OML) hingegen, welche erste Anzeichen auf axonale Atrophien liefern ²⁸⁵, sind bei den *Cra1*-Mäusen im Vergleich in einer höheren Dichte vorhanden als bei den Wildtypen, wenn auch ohne statistische Signifikanz.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die axonale Transportstörung der *Cra1*-Mäuse in einer motoneurondegenerativen Erkrankung äußert, welche sich auch auf die peripheren Nerven auswirkt und wahrscheinlich durch den verminderten Transport von neurotrophen Faktoren verursacht wird.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Motoneurondegenerative (MND) Erkrankungen, wie ALS und SMA sind auf Grund ihrer unverstandenen Pathogenese und fehlender therapeutischer Ansatzpunkte mit einer infausten Prognose für die betroffenen Patienten behaftet. Selbst in der kleinen Anzahl von Fällen, die genetisch geklärt sind, bleibt die molekulare Basis der Nervenzellschädigung weitgehend unklar.

Experimentelle Mausmodelle mit MND-Symptomatik sind deshalb ein unverzichtbares Hilfsmittel zur systematischen Erforschung der Krankheitsursachen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Gruppe von Mäusen mit *Cramping* (*Cra1*)-Phänotyp, denen aufgrund einer autosomal-dominanten Mutation im *Dnchc1* (Dynein cytoplasmatic heavy chain 1)-Gen ein Defekt im retrograden axonalen Transport unterstellt wird, auf ihre Eignung als MND-Modell untersucht.

Entgegen anderweitiger Behauptungen konnten wir in allen Rückenmarksabschnitten einen signifikanten Verlust von α -Motoneuronen sowie eine Reduzierung myelinisierter Axone im N. ischiadicus ausmachen und somit den klinischen Verdacht auf eine Motoneurondegeneration bestätigen.

Des Weiteren war es möglich, im Rahmen einer immunhistochemischen Studie, die motoneuronale Expression von BDNF (brain derived neurotrophic factor) und den Transduktionsfaktoren Akt, MAPK (Erk1/2) und Erk5 zu erfassen. Dabei stellte sich für die *Cra1*-Mäuse eine verminderte Expression aller von uns untersuchten Faktoren in den α -Motoneuronen der Lumbalintumeszenz heraus. Diese Befunde decken sich exakt mit dem klinischen Verteilungsmuster der Paresen. Erk5 zeigte dabei die signifikant schwächste Immunoreaktivität in den *Cra1*-Mäusen, was die Bedeutung des geschädigten axonalen Transports untermauert.

Zusammenfassend scheint die Unterbrechung dyneinabhängiger Prozesse bei *Cra1*-Mäusen zu einer progressiven Degeneration spinaler Motoneurone zu führen. Diese geht in den klinisch am stärksten betroffenen Bereichen mit einer

Herabregulierung neuronaler Transduktionskaskaden einher.

Damit stellt die Cra1-Maus ein geeignetes Modell dar, die Auswirkungen und Therapie axonaler Transportstörungen im Hinblick auf die Physiologie spinaler Motoneurone zu untersuchen und ergänzt damit sinnvoll die Gruppe der Tiermodelle für ALS und SMA.

VII SUMMARY

Motor neuron diseases (MND) such as amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and spinal muscle atrophy (SMA) are associated with a fatal disease course that proves non-responsive to available therapies. Failure of increasing life expectancy partially results from incomplete understanding of disease mechanisms, even if the genetic origin has been clarified. Thus, systematic exploration of MND requires well-characterised animal models.

In this regard, the present study is aimed to elucidate the possible MND resemblance of mice with *cramping* (*Cra1*) phenotype, which are supposed to suffer from an axonal transport defect due to autosomal dominant mutation in the *Dnchc1* (*dynein heavy chain*) gene.

In contrast to previous studies, we were able to demonstrate a significant loss of spinal motoneurons in all *Cra1*-mice and an associated drop out of myelinated axons from sciatic nerve.

Immunohistochemical expression analysis comprising BDNF (brain derived neurotrophic factor) and signaling factors Akt, MAPK (Erk1/2) and Erk5 showed a decrease of these molecules in ventral horn neurons of the lumbar cord, that provide motor innervations to the appendicular musculature most severely affected by motor deficits. Thereby, neuronal expression of target-derived Erk5 shows the weakest weakest immunoreactivity in the *Cra1*-group. This finding lends credence to the supposed impairment of the retrograde axonal transport in affected animals.

Taken together, disruption of dynein-dependent cell-functions in *Cra1*-mice leads to downregulation of neurotrophic signaling and subsequent degeneration of spinal motor neurons.

For this reason, *Cra1*-mice resemble a valuable tool to examine the consequences and therapy of axonal transport impairment with regards to the physiology of spinal motor neurons. Hence, *Cra1*-mice nicely accomplish of the panel of animal models available for ALS and SMA research.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Martin JE, Fisher EM. Mice, the motor system, and human motor neuron pathology. *Mamm Genome*. 2000; **11**: 1041-52.
- 2 Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet*. 2008; **371**: 2120-33.
- 3 Julien JP, Mushynski WE. Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1998; **61**: 1-23.
- 4 De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CC. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*. 2008; **31**: 151-73.
- 5 Tandan R, Bradley WG. Amyotrophic lateral sclerosis: Part 1. Clinical features, pathology, and ethical issues in management. *Ann Neurol*. 1985; **18**: 271-80.
- 6 Meyer T, Munch C, van Landeghem FK, Borisow N, Dullinger J, Linke P. [Progressive muscle atrophy. A rarely diagnosed variant of amyotrophic lateral sclerosis]. *Nervenarzt*. 2007; **78**: 1383-8.
- 7 Harding AE. Hereditary spastic paraplegias. *Semin Neurol*. 1993; **13**: 333-6.
- 8 Fink JK. Advances in the hereditary spastic paraplegias. *Exp Neurol*. 2003; **184 Suppl 1**: S106-10.
- 9 Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT. Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol*. 2008; **7**: 1127-38.
- 10 Contino G, Novelli G. Hereditary spastic paraplegia: clinical genomics and pharmacogenetic perspectives. *Expert Opin Pharmacother*. 2006; **7**: 1849-56.
- 11 Klemm E, Tackmann W. [Familial spastic spinal paralysis--clinical spectrum and differential diagnostic considerations]. *Fortschr Neurol Psychiatr*. 1991; **59**: 176-82.
- 12 Boillee S, Vande Velde C, Cleveland DW. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*. 2006; **52**: 39-59.
- 13 Cleveland DW, Rothstein JD. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat Rev Neurosci*. 2001; **2**: 806-19.
- 14 Julien JP. Amyotrophic lateral sclerosis. unfolding the toxicity of the misfolded. *Cell*. 2001; **104**: 581-91.

- 15 Hirano A, Iwata, M. Pathology of motor neurons with special reference to amyotrophic lateral sclerosis and related diseases. In: Tsubaki T, Toyokura, Y. (ed.). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Baltimore, 1979; 107-33.
- 16 Hirano A. Aspects of the ultrastructure of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol*. 1982; **36**: 75-88.
- 17 Chou SM. Pathognomy of intraneuronal inclusions in ALS. In: Tsubaki T, Toyokura, Y. (ed.). *Amyotrophic Lateral Sclerosis*. Baltimore, 1979; 135-76.
- 18 Tsukagoshi H, Yanagisawa N, Oguchi K, Nagashima K, Murakami T. Morphometric quantification of the cervical limb motor cells in controls and in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1979; **41**: 287-97.
- 19 Kawamura Y, Dyck PJ, Shimono M, Okazaki H, Tateishi J, Doi H. Morphometric comparison of the vulnerability of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1981; **40**: 667-75.
- 20 Sobue G, Sahashi K, Takahashi A, Matsuoka Y, Muroga T, Sobue I. Degenerating compartment and functioning compartment of motor neurons in ALS: possible process of motor neuron loss. *Neurology*. 1983; **33**: 654-7.
- 21 Kennedy WR. Innervation of muscle spindles in amyotrophic lateral sclerosis. *Mayo Clin Proc*. 1971; **46**: 245-57.
- 22 Swash M, Fox KP. The pathology of the human muscle spindle: effect of denervation. *J Neurol Sci*. 1974; **22**: 1-24.
- 23 Sobue G, Matsuoka Y, Mukai E, Takayanagi T, Sobue I. Pathology of myelinated fibers in cervical and lumbar ventral spinal roots in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1981; **50**: 413-21.
- 24 Sobue G, Matsuoka Y, Mukai E, Takayanagi T, Sobue I, Hashizume Y. Spinal and cranial motor nerve roots in amyotrophic lateral sclerosis and X-linked recessive bulbospinal muscular atrophy: morphometric and teased-fiber study. *Acta Neuropathol*. 1981; **55**: 227-35.
- 25 Hanyu N, Oguchi, K., Yanagisawa, N., Tsukagoshi, H. Degeneration and regeneration of ventral root fibers in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci*. 1981; **55**: 99-115.
- 26 Bradley WG, Good P, Rasool CG, Adelman LS. Morphometric and biochemical studies of peripheral nerves in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1983; **14**: 267-77.

- 27 Wohlfart G, Swank PL. Pathology of amyotrophic lateral sclerosis: fiber analysis of the ventral roots and pyramidal tracts of the spinal cord. *Arch Neurol Psychiatr.* 1941; **46**: 783-99.
- 28 A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology.* 1999; **52**: 1427-33.
- 29 Akbar MT, Torp R, Danbolt NC, Levy LM, Meldrum BS, Ottersen OP. Expression of glial glutamate transporters GLT-1 and GLAST is unchanged in the hippocampus in fully kindled rats. *Neuroscience.* 1997; **78**: 351-9.
- 30 Borasio GD, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guilloff RJ, Jerusalem F, *et al.* A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis. European ALS/IGF-I Study Group. *Neurology.* 1998; **51**: 583-6.
- 31 Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinis DF, Kratz R, *et al.* Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group. *Neurology.* 1997; **49**: 1621-30.
- 32 Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N Engl J Med.* 1994; **330**: 585-91.
- 33 Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Powe L, Durrleman S, *et al.* A confirmatory dose-ranging study of riluzole in ALS. ALS/Riluzole Study Group-II. *Neurology.* 1996; **47**: S242-50.
- 34 Lacomblez L, Bensimon G, Leigh PN, Guillet P, Meininger V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet.* 1996; **347**: 1425-31.
- 35 Monani UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease. *Neuron.* 2005; **48**: 885-96.
- 36 Grohmann K, Schuelke M, Diers A, Hoffmann K, Lucke B, Adams C, *et al.* Mutations in the gene encoding immunoglobulin mu-binding protein 2 cause spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1. *Nat Genet.* 2001; **29**: 75-7.
- 37 Kobayashi H, Baumbach L, Matise TC, Schiavi A, Greenberg F, Hoffman EP. A gene for a severe lethal form of X-linked arthrogyrosis (X-linked infantile spinal muscular atrophy) maps to human chromosome Xp11.3-q11.2. *Hum Mol Genet.* 1995; **4**: 1213-6.
- 38 La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature.* 1991;

352: 77-9.

39 Sambuughin N, Sivakumar K, Selenge B, Lee HS, Friedlich D, Baasanjav D, *et al.* Autosomal dominant distal spinal muscular atrophy type V (dSMA-V) and Charcot-Marie-Tooth disease type 2D (CMT2D) segregate within a single large kindred and map to a refined region on chromosome 7p15. *J Neurol Sci.* 1998; **161**: 23-8.

40 van der Vleuten AJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Frijns CJ, Smits AP, Hageman G, Padberg GW, *et al.* Localisation of the gene for a dominant congenital spinal muscular atrophy predominantly affecting the lower limbs to chromosome 12q23-q24. *Eur J Hum Genet.* 1998; **6**: 376-82.

41 Viollet L, Barois A, Rebeiz JG, Rifai Z, Burlet P, Zarhrate M, *et al.* Mapping of autosomal recessive chronic distal spinal muscular atrophy to chromosome 11q13. *Ann Neurol.* 2002; **51**: 585-92.

42 Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 1995; **80**: 155-65.

43 Fidzianska A. Spinal muscular atrophy in childhood. *Semin Pediatr Neurol.* 1996; **3**: 53-8.

44 Rudnik-Schoneborn S, Goebel HH, Schlote W, Molaian S, Omran H, Ketelsen U, *et al.* Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology.* 2003; **60**: 983-7.

45 Kumagai T, Hashizume Y. Morphological and morphometric studies on the spinal cord lesion in Werdnig-Hoffmann disease. *Brain Dev.* 1982; **4**: 87-96.

46 Marshall A, Duchon LW. Sensory system involvement in infantile spinal muscular atrophy. *J Neurol Sci.* 1975; **26**: 349-59.

47 Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Immunocytochemical and ultrastructural studies of Werdnig-Hoffmann disease. *Acta Neuropathol.* 1991; **81**: 408-17.

48 Averill DR, Jr. Degenerative myelopathy in the aging German Shepherd dog: clinical and pathologic findings. *J Am Vet Med Assoc.* 1973; **162**: 1045-51.

49 Griffiths IR, Duncan ID. Chronic degenerative radiculomyelopathy in the dog. *J Small Anim Pract.* 1975; **16**: 461-71.

50 Braund KG, Vandeveld M. German Shepherd dog myelopathy--a morphologic and morphometric study. *Am J Vet Res.* 1978; **39**: 1309-15.

- 51 Coates JR, March PA, Oglesbee M, Ruaux CG, Olby NJ, Berghaus RD, *et al.* Clinical characterization of a familial degenerative myelopathy in Pembroke Welsh Corgi dogs. *J Vet Intern Med.* 2007; **21**: 1323-31.
- 52 Johnston PE, Barrie JA, McCulloch MC, Anderson TJ, Griffiths IR. Central nervous system pathology in 25 dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Vet Rec.* 2000; **146**: 629-33.
- 53 Matthews NS, de Lahunta A. Degenerative myelopathy in an adult miniature poodle. *J Am Vet Med Assoc.* 1985; **186**: 1213-5.
- 54 March PA, Coates JR, Abyad RJ, Williams DA, O'Brien DP, Olby NJ, *et al.* Degenerative myelopathy in 18 pembroke welsh corgi dogs. *Vet Pathol.* 2009; **46**: 241-50.
- 55 Bichsel P, Vandeveld M, Lang J, Kull-Hachler S. Degenerative myelopathy in a family of Siberian Husky dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; **183**: 998-1000, 965.
- 56 Awano T, Johnson GS, Wade CM, Katz ML, Johnson GC, Taylor JF, *et al.* Genome-wide association analysis reveals a SOD1 mutation in canine degenerative myelopathy that resembles amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; **106**: 2794-9.
- 57 Divers TJ, Mohammed HO, Cummings JF, Valentine BA, De Lahunta A, Jackson CA, *et al.* Equine motor neuron disease: findings in 28 horses and proposal of a pathophysiological mechanism for the disease. *Equine Vet J.* 1994; **26**: 409-15.
- 58 Cummings JF, de Lahunta A, George C, Fuhrer L, Valentine BA, Cooper BJ, *et al.* Equine motor neuron disease; a preliminary report. *Cornell Vet.* 1990; **80**: 357-79.
- 59 Cummings JF, de Lahunta A, Mohammed HO, Divers TJ, Summers BA, Valentine BA, *et al.* Endothelial lipopigment as an indicator of alpha-tocopherol deficiency in two equine neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* 1995; **90**: 266-72.
- 60 Summers BA, Cummings, J.F., de Lahunta, A. *Veterinary Neuropathology*, 1995.
- 61 Higgins RJ, Rings DM, Fenner WR, Stevenson S. Spontaneous lower motor neuron disease with neurofibrillary accumulation in young pigs. *Acta Neuropathol.* 1983; **59**: 288-94.
- 62 Shields RP, Vandeveld M. Spontaneous lower motor neuron disease in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Acta Neuropathol.* 1978; **44**: 85-90.

- 63 Cork LC, Price DL, Griffin JW, Sack GH, Jr. Hereditary canine spinal muscular atrophy: canine motor neuron disease. *Can J Vet Res.* 1990; **54**: 77-82.
- 64 He Q, Lowrie C, Shelton GD, Castellani RJ, Menotti-Raymond M, Murphy W, *et al.* Inherited motor neuron disease in domestic cats: a model of spinal muscular atrophy. *Pediatr Res.* 2005; **57**: 324-30.
- 65 Fyfe JC, Menotti-Raymond M, David VA, Brichta L, Schaffer AA, Agarwala R, *et al.* An approximately 140-kb deletion associated with feline spinal muscular atrophy implies an essential LIX1 function for motor neuron survival. *Genome Res.* 2006; **16**: 1084-90.
- 66 Parkinson NJ, Baumer D, Rose-Morris A, Talbot K. Candidate screening of the bovine and feline spinal muscular atrophy genes reveals no evidence for involvement in human motor neuron disorders. *Neuromuscul Disord.* 2008; **18**: 394-7.
- 67 el-Hamidi M, Leipold HW, Vestweber JG, Saperstein G. Spinal muscular atrophy in Brown Swiss calves. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1989; **36**: 731-8.
- 68 Krebs S, Medugorac I, Russ I, Ossent P, Bleul U, Schmahl W, *et al.* Fine-mapping and candidate gene analysis of bovine spinal muscular atrophy. *Mamm Genome.* 2006; **17**: 67-76.
- 69 Bruijn LI, Becher MW, Lee MK, Anderson KL, Jenkins NA, Copeland NG, *et al.* ALS-linked SOD1 mutant G85R mediates damage to astrocytes and promotes rapidly progressive disease with SOD1-containing inclusions. *Neuron.* 1997; **18**: 327-38.
- 70 Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man. *Exp Neurol.* 2004; **185**: 232-40.
- 71 Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science.* 1994; **264**: 1772-5.
- 72 Reaume AG, Elliott JL, Hoffman EK, Kowall NW, Ferrante RJ, Siwek DF, *et al.* Motor neurons in Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. *Nat Genet.* 1996; **13**: 43-7.
- 73 Bowling AC, Barkowski EE, McKenna-Yasek D, Sapp P, Horvitz HR, Beal MF, *et al.* Superoxide dismutase concentration and activity in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1995; **64**: 2366-9.
- 74 Cleveland DW, Laing N, Hulse PV, Brown RH, Jr. Toxic mutants in Charcot's sclerosis. *Nature.* 1995; **378**: 342-3.

- 75 Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV. Oxygen-induced maturation of SOD1: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J.* 2004; **23**: 2872-81.
- 76 Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Corson LB, Becker M, Cleveland DW, Price DL, *et al.* The copper chaperone CCS is abundant in neurons and astrocytes in human and rodent brain. *J Neurochem.* 1999; **72**: 422-9.
- 77 Subramaniam JR, Lyons WE, Liu J, Bartnikas TB, Rothstein J, Price DL, *et al.* Mutant SOD1 causes motor neuron disease independent of copper chaperone-mediated copper loading. *Nat Neurosci.* 2002; **5**: 301-7.
- 78 Wong PC, Waggoner D, Subramaniam JR, Tessarollo L, Bartnikas TB, Culotta VC, *et al.* Copper chaperone for superoxide dismutase is essential to activate mammalian Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; **97**: 2886-91.
- 79 Durham HD, Roy J, Dong L, Figlewicz DA. Aggregation of mutant Cu/Zn superoxide dismutase proteins in a culture model of ALS. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1997; **56**: 523-30.
- 80 Johnston JA, Dalton MJ, Gurney ME, Kopito RR. Formation of high molecular weight complexes of mutant Cu, Zn-superoxide dismutase in a mouse model for familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; **97**: 12571-6.
- 81 Watanabe M, Dykes-Hoberg M, Culotta VC, Price DL, Wong PC, Rothstein JD. Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues. *Neurobiol Dis.* 2001; **8**: 933-41.
- 82 Wong PC, Pardo CA, Borchelt DR, Lee MK, Copeland NG, Jenkins NA, *et al.* An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron.* 1995; **14**: 1105-16.
- 83 Andreassen OA, Ferrante RJ, Klivenyi P, Klein AM, Shinobu LA, Epstein CJ, *et al.* Partial deficiency of manganese superoxide dismutase exacerbates a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol.* 2000; **47**: 447-55.
- 84 Kaal EC, Vlug AS, Versleijen MW, Kuilman M, Joosten EA, Bar PR. Chronic mitochondrial inhibition induces selective motoneuron death in vitro: a new model for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2000; **74**: 1158-65.
- 85 Kong J, Xu Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci.* 1998; **18**: 3241-50.

- 86 Pasinelli P, Belford ME, Lennon N, Bacskai BJ, Hyman BT, Trotti D, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis-associated SOD1 mutant proteins bind and aggregate with Bcl-2 in spinal cord mitochondria. *Neuron*. 2004; **43**: 19-30.
- 87 Siklos L, Engelhardt JI, Alexianu ME, Gurney ME, Siddique T, Appel SH. Intracellular calcium parallels motoneuron degeneration in SOD-1 mutant mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; **57**: 571-87.
- 88 Yoshihara T, Ishigaki S, Yamamoto M, Liang Y, Niwa J, Takeuchi H, *et al.* Differential expression of inflammation- and apoptosis-related genes in spinal cords of a mutant SOD1 transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem*. 2002; **80**: 158-67.
- 89 Guo H, Lai L, Butchbach ME, Stockinger MP, Shan X, Bishop GA, *et al.* 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*. 2003; **12**: 2519-32.
- 90 Howland DS, Liu J, She Y, Goad B, Maragakis NJ, Kim B, *et al.* Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**: 1604-9.
- 91 Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, *et al.* Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 1996; **16**: 675-86.
- 92 Rothstein JD, Kuncl R, Chaudhry V, Clawson L, Cornblath DR, Coyle JT, *et al.* Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Ann Neurol*. 1991; **30**: 224-5.
- 93 Rothstein JD, Tsai G, Kuncl RW, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, *et al.* Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1990; **28**: 18-25.
- 94 Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 1995; **38**: 73-84.
- 95 Shaw PJ, Forrest V, Ince PG, Richardson JP, Wastell HJ. CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration*. 1995; **4**: 209-16.
- 96 Spencer PS, Kisby GE, Ross SM, Roy DN, Hugon J, Ludolph AC, *et al.* Guam ALS-PDC: possible causes. *Science*. 1993; **262**: 825-6.
- 97 Spreux-Varoquaux O, Bensimon G, Lacomblez L, Salachas F, Pradat PF, Le

Forestier N, *et al.* Glutamate levels in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis: a reappraisal using a new HPLC method with coulometric detection in a large cohort of patients. *J Neurol Sci.* 2002; **193**: 73-8.

98 Bendotti C, Tortarolo M, Suchak SK, Calvaresi N, Carvelli L, Bastone A, *et al.* Transgenic SOD1 G93A mice develop reduced GLT-1 in spinal cord without alterations in cerebrospinal fluid glutamate levels. *J Neurochem.* 2001; **79**: 737-46.

99 Martin LJ. Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1999; **58**: 459-71.

100 Spooeren WP, Hengerer B. DNA laddering and caspase 3-like activity in the spinal cord of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2000; **46**: 63-9.

101 Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 1997; **277**: 559-62.

102 Li M, Ona VO, Guegan C, Chen M, Jackson-Lewis V, Andrews LJ, *et al.* Functional role of caspase-1 and caspase-3 in an ALS transgenic mouse model. *Science.* 2000; **288**: 335-9.

103 Pasinelli P, Borchelt DR, Houseweart MK, Cleveland DW, Brown RH, Jr. Caspase-1 is activated in neural cells and tissue with amyotrophic lateral sclerosis-associated mutations in copper-zinc superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**: 15763-8.

104 Pasinelli P, Houseweart MK, Brown RH, Jr., Cleveland DW. Caspase-1 and -3 are sequentially activated in motor neuron death in Cu,Zn superoxide dismutase-mediated familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; **97**: 13901-6.

105 Friedlander RM, Gagliardini V, Hara H, Fink KB, Li W, MacDonald G, *et al.* Expression of a dominant negative mutant of interleukin-1 beta converting enzyme in transgenic mice prevents neuronal cell death induced by trophic factor withdrawal and ischemic brain injury. *J Exp Med.* 1997; **185**: 933-40.

106 Hirano A, Donnenfeld H, Sasaki S, Nakano I. Fine structural observations of neurofilamentous changes in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1984; **43**: 461-70.

107 Kawaguchi S, Miyata H, Kawamura M, Harada Y. Morphological and electrophysiological evidence for axonal regeneration of axotomized cerebellothalamic neurons in kittens. *Neurosci Lett.* 1981; **25**: 13-8.

- 108 Ernfors P, Lee KF, Kucera J, Jaenisch R. Lack of neurotrophin-3 leads to deficiencies in the peripheral nervous system and loss of limb proprioceptive afferents. *Cell*. 1994; **77**: 503-12.
- 109 Williamson TL, Cleveland DW. Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci*. 1999; **2**: 50-6.
- 110 Ackerley S, Thornhill P, Grierson AJ, Brownlees J, Anderton BH, Leigh PN, *et al*. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *J Cell Biol*. 2003; **161**: 489-95.
- 111 Lobsiger CS, Garcia ML, Ward CM, Cleveland DW. Altered axonal architecture by removal of the heavily phosphorylated neurofilament tail domains strongly slows superoxide dismutase 1 mutant-mediated ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; **102**: 10351-6.
- 112 Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM. Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol*. 1997; **139**: 1307-15.
- 113 LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, *et al*. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron*. 2002; **34**: 715-27.
- 114 Messer A, Plummer J, Maskin P, Coffin JM, Frankel WN. Mapping of the motor neuron degeneration (Mnd) gene, a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Genomics*. 1992; **13**: 797-802.
- 115 Messer A, Flaherty L. Autosomal dominance in a late-onset motor neuron disease in the mouse. *J Neurogenet*. 1986; **3**: 345-55.
- 116 Messer A, Strominger NL, Mazurkiewicz JE. Histopathology of the late-onset motor neuron degeneration (Mnd) mutant in the mouse. *J Neurogenet*. 1987; **4**: 201-13.
- 117 Mazurkiewicz JE. Ubiquitin deposits are present in spinal motor neurons in all stages of the disease in the motor neuron degeneration (Mnd) mutant of the mouse. *Neurosci Lett*. 1991; **128**: 182-6.
- 118 Callahan LM, Wylen EL, Messer A, Mazurkiewicz JE. Neurofilament distribution is altered in the Mnd (motor neuron degeneration) mouse. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1991; **50**: 491-504.
- 119 Pardo CA, Rabin BA, Palmer DN, Price DL. Accumulation of the adenosine triphosphate synthase subunit C in the mnd mutant mouse. A model for neuronal

ceroid lipofuscinosis. *Am J Pathol.* 1994; **144**: 829-35.

120 Bronson RT, Lake BD, Cook S, Taylor S, Davisson MT. Motor neuron degeneration of mice is a model of neuronal ceroid lipofuscinosis (Batten's disease). *Ann Neurol.* 1993; **33**: 381-5.

121 Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, *et al.* Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; **94**: 9920-5.

122 Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, *et al.* A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2000; **24**: 66-70.

123 Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, *et al.* The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn*(^{-/-}) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000; **9**: 333-9.

124 Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M. Reduced survival motor neuron (*Smn*) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet.* 2000; **9**: 341-6.

125 Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, *et al.* SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. *Hum Mol Genet.* 2005; **14**: 845-57.

126 Monani UR, Pastore MT, Gavriliina TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, *et al.* A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J Cell Biol.* 2003; **160**: 41-52.

127 Hrabe de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, *et al.* Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet.* 2000; **25**: 444-7.

128 Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, *et al.* The large-scale Munich ENU-mouse-mutagenesis screen. *Mamm Genome.* 2000; **11**: 507-10.

129 Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annuar A, Bowen S, *et al.* Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science.* 2003; **300**: 808-12.

130 Braunstein KE. Untersuchungen von Motorik, Kognition und Verhalten bei

Mausmodellen von Motoneuronerkrankungen. *Fakultät für Naturwissenschaften*. Ulm, Universität Ulm, 2008.

131 Ahmad-Annuar A, Shah P, Hafezparast M, Hummerich H, Witherden AS, Morrison KE, *et al.* No association with common Caucasian genotypes in exons 8, 13 and 14 of the human cytoplasmic dynein heavy chain gene (DNCHC1) and familial motor neuron disorders. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord.* 2003; **4**: 150-7.

132 Kieran D, Hafezparast M, Bohnert S, Dick JR, Martin J, Schiavo G, *et al.* A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. *J Cell Biol.* 2005; **169**: 561-7.

133 Teuchert M, Fischer D, Schwalenstoecker B, Habisch HJ, Bockers TM, Ludolph AC. A dynein mutation attenuates motor neuron degeneration in SOD1(G93A) mice. *Exp Neurol.* 2006; **198**: 271-4.

134 Dupuis L, Fergani A, Braunstein KE, Eschbach J, Holl N, Rene F, *et al.* Mice with a mutation in the dynein heavy chain 1 gene display sensory neuropathy but lack motor neuron disease. *Exp Neurol.* 2009; **215**: 146-52.

135 Ilieva HS, Yamanaka K, Malkmus S, Kakinohana O, Yaksh T, Marsala M, *et al.* Mutant dynein (Loa) triggers proprioceptive axon loss that extends survival only in the SOD1 ALS model with highest motor neuron death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; **105**: 12599-604.

136 Strom AL, Gal J, Shi P, Kasarskis EJ, Hayward LJ, Zhu H. Retrograde axonal transport and motor neuron disease. *J Neurochem.* 2008; **106**: 495-505.

137 Chevalier-Larsen E, Holzbaur EL. Axonal transport and neurodegenerative disease. *Biochim Biophys Acta.* 2006; **1762**: 1094-108.

138 Hirano A. Cytopathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Adv Neurol.* 1991; **56**: 91-101.

139 Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G. Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1984; **43**: 471-80.

140 Liu Q, Xie F, Siedlak SL, Nunomura A, Honda K, Moreira PI, *et al.* Neurofilament proteins in neurodegenerative diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2004; **61**: 3057-75.

141 Marx A, Muller J, Mandelkow E. The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem.* 2005; **71**: 299-344.

- 142 Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, *et al.* Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*. 2001; **105**: 587-97.
- 143 Xia CH, Roberts EA, Her LS, Liu X, Williams DS, Cleveland DW, *et al.* Abnormal neurofilament transport caused by targeted disruption of neuronal kinesin heavy chain KIF5A. *J Cell Biol*. 2003; **161**: 55-66.
- 144 Schroer TA. Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Curr Opin Cell Biol*. 1994; **6**: 69-73.
- 145 Levy JR, Holzbaur EL. Cytoplasmic dynein/dynactin function and dysfunction in motor neurons. *Int J Dev Neurosci*. 2006; **24**: 103-11.
- 146 Ginty DD, Segal RA. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. *Curr Opin Neurobiol*. 2002; **12**: 268-74.
- 147 Bhattacharyya A, Watson FL, Pomeroy SL, Zhang YZ, Stiles CD, Segal RA. High-resolution imaging demonstrates dynein-based vesicular transport of activated Trk receptors. *J Neurobiol*. 2002; **51**: 302-12.
- 148 Yano H, Lee FS, Kong H, Chuang J, Arevalo J, Perez P, *et al.* Association of Trk neurotrophin receptors with components of the cytoplasmic dynein motor. *J Neurosci*. 2001; **21**: RC125.
- 149 Senger DL, Campenot RB. Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J Cell Biol*. 1997; **138**: 411-21.
- 150 Asai DJ, Koonce MP. The dynein heavy chain: structure, mechanics and evolution. *Trends Cell Biol*. 2001; **11**: 196-202.
- 151 Gibbons IR, Lee-Eiford A, Mocz G, Phillipson CA, Tang WJ, Gibbons BH. Photosensitized cleavage of dynein heavy chains. Cleavage at the "V1 site" by irradiation at 365 nm in the presence of ATP and vanadate. *J Biol Chem*. 1987; **262**: 2780-6.
- 152 Mocz G, Gibbons IR. Phase partition analysis of nucleotide binding to axonemal dynein. *Biochemistry*. 1996; **35**: 9204-11.
- 153 Goodenough U, Heuser J. Structural comparison of purified dynein proteins with in situ dynein arms. *J Mol Biol*. 1984; **180**: 1083-118.
- 154 Gee MA, Heuser JE, Vallee RB. An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain. *Nature*. 1997; **390**: 636-9.

- 155 Koonce MP. Identification of a microtubule-binding domain in a cytoplasmic dynein heavy chain. *J Biol Chem.* 1997; **272**: 19714-8.
- 156 Holzbaur EL. Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol.* 2004; **14**: 233-40.
- 157 Munch C, Sedlmeier R, Meyer T, Homberg V, Sperfeld AD, Kurt A, *et al.* Point mutations of the p150 subunit of dynactin (DCTN1) gene in ALS. *Neurology.* 2004; **63**: 724-6.
- 158 Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, *et al.* Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet.* 2003; **33**: 455-6.
- 159 Puls I, Oh SJ, Sumner CJ, Wallace KE, Floeter MK, Mann EA, *et al.* Distal spinal and bulbar muscular atrophy caused by dynactin mutation. *Ann Neurol.* 2005; **57**: 687-94.
- 160 Schafer DA, Gill SR, Cooper JA, Heuser JE, Schroer TA. Ultrastructural analysis of the dynactin complex: an actin-related protein is a component of a filament that resembles F-actin. *J Cell Biol.* 1994; **126**: 403-12.
- 161 Holzbaur EL, Hammarback JA, Paschal BM, Kravit NG, Pfister KK, Vallee RB. Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the Drosophila gene Glued. *Nature.* 1991; **351**: 579-83.
- 162 Karki S, Holzbaur EL. Affinity chromatography demonstrates a direct binding between cytoplasmic dynein and the dynactin complex. *J Biol Chem.* 1995; **270**: 28806-11.
- 163 Vaughan KT, Vallee RB. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol.* 1995; **131**: 1507-16.
- 164 Harada A, Takei Y, Kanai Y, Tanaka Y, Nonaka S, Hirokawa N. Golgi vesiculation and lysosome dispersion in cells lacking cytoplasmic dynein. *J Cell Biol.* 1998; **141**: 51-9.
- 165 Echeverri CJ, Paschal BM, Vaughan KT, Vallee RB. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol.* 1996; **132**: 617-33.
- 166 Eckley DM, Gill SR, Melkonian KA, Bingham JB, Goodson HV, Heuser JE, *et al.* Analysis of dynactin subcomplexes reveals a novel actin-related protein associated with the arp1 minifilament pointed end. *J Cell Biol.* 1999; **147**: 307-20.

- 167 Shah PR, Ahmad-Annuar A, Ahmadi KR, Russ C, Sapp PC, Horvitz HR, *et al.* No association of DYNC1H1 with sporadic ALS in a case-control study of a northern European derived population: a tagging SNP approach. *Amyotroph Lateral Scler.* 2006; **7**: 46-56.
- 168 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature.* 2001; **410**: 37-40.
- 169 Grewal SS, York RD, Stork PJ. Extracellular-signal-regulated kinase signalling in neurons. *Curr Opin Neurobiol.* 1999; **9**: 544-53.
- 170 Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999; **71**: 479-500.
- 171 Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001; **22**: 153-83.
- 172 English J, Pearson G, Wilsbacher J, Swantek J, Karandikar M, Xu S, *et al.* New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res.* 1999; **253**: 255-70.
- 173 Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.* 1998; **74**: 49-139.
- 174 Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 26563-71.
- 175 Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A. ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* 2000; **20**: 8382-9.
- 176 Terasawa K, Okazaki K, Nishida E. Regulation of c-Fos and Fra-1 by the MEK5-ERK5 pathway. *Genes Cells.* 2003; **8**: 263-73.
- 177 Akaike M, Che W, Marmarosh NL, Ohta S, Osawa M, Ding B, *et al.* The hinge-helix 1 region of peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) mediates interaction with extracellular signal-regulated kinase 5 and PPARgamma1 transcriptional activation: involvement in flow-induced PPARgamma activation in endothelial cells. *Mol Cell Biol.* 2004; **24**: 8691-704.
- 178 Giroux S, Tremblay M, Bernard D, Cardin-Girard JF, Aubry S, Larouche L, *et al.* Embryonic death of Mek1-deficient mice reveals a role for this kinase in angiogenesis in the labyrinthine region of the placenta. *Curr Biol.* 1999; **9**: 369-72.
- 179 Belanger LF, Roy S, Tremblay M, Brott B, Steff AM, Mourad W, *et al.* Mek2 is

- dispensable for mouse growth and development. *Mol Cell Biol.* 2003; **23**: 4778-87.
- 180 Hatano N, Mori Y, Oh-hora M, Kosugi A, Fujikawa T, Nakai N, *et al.* Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells.* 2003; **8**: 847-56.
- 181 Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, *et al.* Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; **100**: 12759-64.
- 182 Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K. Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; **99**: 9248-53.
- 183 Sohn SJ, Sarvis BK, Cado D, Winoto A. ERK5 MAPK regulates embryonic angiogenesis and acts as a hypoxia-sensitive repressor of vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 43344-51.
- 184 Yan L, Carr J, Ashby PR, Murry-Tait V, Thompson C, Arthur JS. Knockout of ERK5 causes multiple defects in placental and embryonic development. *BMC Dev Biol.* 2003; **3**: 11.
- 185 Nishimoto S, Kusakabe M, Nishida E. Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep.* 2005; **6**: 1064-9.
- 186 Ibanez CF. Message in a bottle: long-range retrograde signaling in the nervous system. *Trends Cell Biol.* 2007; **17**: 519-28.
- 187 Campenot RB. Local control of neurite development by nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; **74**: 4516-9.
- 188 Campenot RB. NGF and the local control of nerve terminal growth. *J Neurobiol.* 1994; **25**: 599-611.
- 189 Watson FL, Heerssen HM, Bhattacharyya A, Klesse L, Lin MZ, Segal RA. Neurotrophins use the Erk5 pathway to mediate a retrograde survival response. *Nat Neurosci.* 2001; **4**: 981-8.
- 190 Bonni A, Brunet A, West AE, Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms. *Science.* 1999; **286**: 1358-62.
- 191 Kaplan DR, Miller FD. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol.* 2000; **10**: 381-91.

- 192 Li B, Xu W, Luo C, Gozal D, Liu R. VEGF-induced activation of the PI3-K/Akt pathway reduces mutant SOD1-mediated motor neuron cell death. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003; **111**: 155-64.
- 193 Dewil M, Lambrechts D, Sciot R, Shaw PJ, Ince PG, Robberecht W, *et al.* Vascular endothelial growth factor counteracts the loss of phospho-Akt preceding motor neurone degeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007; **33**: 499-509.
- 194 Nagano I, Murakami T, Manabe Y, Abe K. Early decrease of survival factors and DNA repair enzyme in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice that express a mutant SOD1 gene. *Life Sci.* 2002; **72**: 541-8.
- 195 Peviani M, Cheroni C, Troglio F, Quarto M, Pelicci G, Bendotti C. Lack of changes in the PI3K/AKT survival pathway in the spinal cord motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Mol Cell Neurosci.* 2007; **34**: 592-602.
- 196 Wagey R, Pelech SL, Duronio V, Krieger C. Phosphatidylinositol 3-kinase: increased activity and protein level in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 1998; **71**: 716-22.
- 197 Dolcet X, Egea J, Soler RM, Martin-Zanca D, Comella JX. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *J Neurochem.* 1999; **73**: 521-31.
- 198 Cho HJ, Kim SY, Park MJ, Kim DS, Kim JK, Chu MY. Expression of mRNA for brain-derived neurotrophic factor in the dorsal root ganglion following peripheral inflammation. *Brain Res.* 1997; **749**: 358-62.
- 199 Leibrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengerer B, Masiakowski P, *et al.* Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature.* 1989; **341**: 149-52.
- 200 Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA. Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J.* 1990; **9**: 2459-64.
- 201 Schwartz PM, Borghesani PR, Levy RL, Pomeroy SL, Segal RA. Abnormal cerebellar development and foliation in BDNF^{-/-} mice reveals a role for neurotrophins in CNS patterning. *Neuron.* 1997; **19**: 269-81.
- 202 Segal RA, Takahashi H, McKay RD. Changes in neurotrophin responsiveness during the development of cerebellar granule neurons. *Neuron.* 1992; **9**: 1041-52.
- 203 Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR. Brain-derived neurotrophic

factor rapidly enhances synaptic transmission in hippocampal neurons via postsynaptic tyrosine kinase receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; **92**: 8074-7.

204 Pozzo-Miller LD, Gottschalk W, Zhang L, McDermott K, Du J, Gopalakrishnan R, *et al*. Impairments in high-frequency transmission, synaptic vesicle docking, and synaptic protein distribution in the hippocampus of BDNF knockout mice. *J Neurosci*. 1999; **19**: 4972-83.

205 Obata K, Noguchi K. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res*. 2006; **55**: 1-10.

206 Thompson SW, Bennett DL, Kerr BJ, Bradbury EJ, McMahon SB. Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96**: 7714-8.

207 Yan Q, Elliott J, Snider WD. Brain-derived neurotrophic factor rescues spinal motor neurons from axotomy-induced cell death. *Nature*. 1992; **360**: 753-5.

208 Novikov L, Novikova L, Kellerth JO. Brain-derived neurotrophic factor promotes survival and blocks nitric oxide synthase expression in adult rat spinal motoneurons after ventral root avulsion. *Neurosci Lett*. 1995; **200**: 45-8.

209 Novikova L, Novikov L, Kellerth JO. Effects of neurotransplants and BDNF on the survival and regeneration of injured adult spinal motoneurons. *Eur J Neurosci*. 1997; **9**: 2774-7.

210 Lewin SL, Utley DS, Cheng ET, Verity AN, Terris DJ. Simultaneous treatment with BDNF and CNTF after peripheral nerve transection and repair enhances rate of functional recovery compared with BDNF treatment alone. *Laryngoscope*. 1997; **107**: 992-9.

211 Mutoh T, Sobue G, Hamano T, Kuriyama M, Hirayama M, Yamamoto M, *et al*. Decreased phosphorylation levels of TrkB neurotrophin receptor in the spinal cords from patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurochem Res*. 2000; **25**: 239-45.

212 Tsuzaka K, Ishiyama T, Piro EP, Mitsumoto H. Role of brain-derived neurotrophic factor in wobbler mouse motor neuron disease. *Muscle Nerve*. 2001; **24**: 474-80.

213 Kawamoto Y, Nakamura S, Akiguchi I, Kimura J. Immunohistochemical localization of brain-derived neurotrophic factor in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis and non-amyotrophic lateral sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998; **57**: 822-30.

214 Miller RS, R. New approaches to the treatment of ALS. *Neurology*. 1997; **48**: 28-32.

- 215 Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992; **116**: 201-11.
- 216 Remmele W, Hildebrand U, Hienz HA, Klein PJ, Vierbuchen M, Behnken LJ, *et al.* Comparative histological, histochemical, immunohistochemical and biochemical studies on oestrogen receptors, lectin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. 1986; **409**: 127-47.
- 217 Remmele W, Schicketanz KH. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract*. 1993; **189**: 862-6.
- 218 Matiasek K. Persönliche Mitteilung. 2008.
- 219 Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003; **115**: 727-38.
- 220 Ligon LA, LaMonte BH, Wallace KE, Weber N, Kalb RG, Holzbaur EL. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport*. 2005; **16**: 533-6.
- 221 Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, *et al.* A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet*. 2002; **71**: 1189-94.
- 222 Zhang F, Strom AL, Fukada K, Lee S, Hayward LJ, Zhu H. Interaction between familial amyotrophic lateral sclerosis (ALS)-linked SOD1 mutants and the dynein complex. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 16691-9.
- 223 Buijn LI, Houseweart MK, Kato S, Anderson KL, Anderson SD, Ohama E, *et al.* Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. *Science*. 1998; **281**: 1851-4.
- 224 Powers JM, DeCiero DP, Cox C, Richfield EK, Ito M, Moser AB, *et al.* The dorsal root ganglia in adrenomyeloneuropathy: neuronal atrophy and abnormal mitochondria. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001; **60**: 493-501.
- 225 Rexed B. A cytoarchitectonic atlas of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*. 1954; **100**: 297-379.
- 226 Barber RP, Phelps PE, Houser CR, Crawford GD, Salvaterra PM, Vaughn JE. The morphology and distribution of neurons containing choline acetyltransferase in the adult rat spinal cord: an immunocytochemical study. *J Comp Neurol*. 1984; **229**: 329-46.

- 227 Huang A, Noga BR, Carr PA, Fedirchuk B, Jordan LM. Spinal cholinergic neurons activated during locomotion: localization and electrophysiological characterization. *J Neurophysiol.* 2000; **83**: 3537-47.
- 228 Ma WY, Vacca-Galloway LL. Reduced branching and length of dendrites detected in cervical spinal cord motoneurons of Wobbler mouse, a model for inherited motoneuron disease. *J Comp Neurol.* 1991; **311**: 210-22.
- 229 Howe CL, Mobley WC. Long-distance retrograde neurotrophic signaling. *Curr Opin Neurobiol.* 2005; **15**: 40-8.
- 230 Henderson CE. The role of muscle in the development and differentiation of spinal motoneurons: in vitro studies. *Ciba Found Symp.* 1988; **138**: 172-91.
- 231 Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Winslow JW, Cayouette MH, Price DL. Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron.* 1993; **10**: 359-67.
- 232 Maisonpierre PC, Belluscio L, Friedman B, Alderson RF, Wiegand SJ, Furth ME, *et al.* NT-3, BDNF, and NGF in the developing rat nervous system: parallel as well as reciprocal patterns of expression. *Neuron.* 1990; **5**: 501-9.
- 233 Maisonpierre PC, Belluscio L, Squinto S, Ip NY, Furth ME, Lindsay RM, *et al.* Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science.* 1990; **247**: 1446-51.
- 234 Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, Olson L, Thoenen H. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve: different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA. *J Cell Biol.* 1992; **119**: 45-54.
- 235 Acheson A, Barker PA, Alderson RF, Miller FD, Murphy RA. Detection of brain-derived neurotrophic factor-like activity in fibroblasts and Schwann cells: inhibition by antibodies to NGF. *Neuron.* 1991; **7**: 265-75.
- 236 Gibbons A, Wreford N, Pankhurst J, Bailey K. Continuous supply of the neurotrophins BDNF and NT-3 improve chick motor neuron survival in vivo. *Int J Dev Neurosci.* 2005; **23**: 389-96.
- 237 Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science.* 1994; **265**: 1107-10.
- 238 Laske C, Stransky E, Leyhe T, Eschweiler GW, Wittorf A, Richartz E, *et al.* Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 2006; **113**: 1217-24.

- 239 Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, *et al.* BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*. 1991; **350**: 230-2.
- 240 DiStefano PS, Friedman B, Radziejewski C, Alexander C, Boland P, Schick CM, *et al.* The neurotrophins BDNF, NT-3, and NGF display distinct patterns of retrograde axonal transport in peripheral and central neurons. *Neuron*. 1992; **8**: 983-93.
- 241 Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M. trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J*. 1989; **8**: 3701-9.
- 242 Martin-Zanca D, Barbacid M, Parada LF. Expression of the trk proto-oncogene is restricted to the sensory cranial and spinal ganglia of neural crest origin in mouse development. *Genes Dev*. 1990; **4**: 683-94.
- 243 Schecterson LC, Bothwell M. Novel roles for neurotrophins are suggested by BDNF and NT-3 mRNA expression in developing neurons. *Neuron*. 1992; **9**: 449-63.
- 244 Bhattacharyya A, Watson FL, Bradlee TA, Pomeroy SL, Stiles CD, Segal RA. Trk receptors function as rapid retrograde signal carriers in the adult nervous system. *J Neurosci*. 1997; **17**: 7007-16.
- 245 Watson FL, Heerssen HM, Moheban DB, Lin MZ, Sauvageot CM, Bhattacharyya A, *et al.* Rapid nuclear responses to target-derived neurotrophins require retrograde transport of ligand-receptor complex. *J Neurosci*. 1999; **19**: 7889-900.
- 246 Heerssen HM, Pazyra MF, Segal RA. Dynein motors transport activated Trks to promote survival of target-dependent neurons. *Nat Neurosci*. 2004; **7**: 596-604.
- 247 Cavanaugh JE, Ham J, Hetman M, Poser S, Yan C, Xia Z. Differential regulation of mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and ERK5 by neurotrophins, neuronal activity, and cAMP in neurons. *J Neurosci*. 2001; **21**: 434-43.
- 248 Miloso M, Scuteri A, Foudah D, Tredici G. MAPKs as mediators of cell fate determination: an approach to neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem*. 2008; **15**: 538-48.
- 249 Wang X, Tournier C. Regulation of cellular functions by the ERK5 signalling pathway. *Cell Signal*. 2006; **18**: 753-60.
- 250 Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*. 1996; **271**: 4138-42.

- 251 Murray B, Alessandrini A, Cole AJ, Yee AG, Furshpan EJ. Inhibition of the p44/42 MAP kinase pathway protects hippocampal neurons in a cell-culture model of seizure activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**: 11975-80.
- 252 Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, *et al*. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J Biol Chem*. 2000; **275**: 12200-6.
- 253 Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; **270**: 1326-31.
- 254 Virdee K, Tolkovsky AM. Activation of p44 and p42 MAP kinases is not essential for the survival of rat sympathetic neurons. *Eur J Neurosci*. 1995; **7**: 2159-69.
- 255 Virdee K, Tolkovsky AM. Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival of sympathetic neurones. *J Neurochem*. 1996; **67**: 1801-5.
- 256 Creedon DJ, Johnson EM, Lawrence JC. Mitogen-activated protein kinase-independent pathways mediate the effects of nerve growth factor and cAMP on neuronal survival. *J Biol Chem*. 1996; **271**: 20713-8.
- 257 Reynolds CH, Betts JC, Blackstock WP, Nebreda AR, Anderton BH. Phosphorylation sites on tau identified by nanoelectrospray mass spectrometry: differences in vitro between the mitogen-activated protein kinases ERK2, c-Jun N-terminal kinase and P38, and glycogen synthase kinase-3beta. *J Neurochem*. 2000; **74**: 1587-95.
- 258 Zigmond MJ. Triggering endogenous neuroprotective mechanisms in Parkinson's disease: studies with a cellular model. *J Neural Transm Suppl*. 2006: 439-42.
- 259 Chung YH, Joo KM, Lim HC, Cho MH, Kim D, Lee WB, *et al*. Immunohistochemical study on the distribution of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (ERK) in the central nervous system of SOD1G93A transgenic mice. *Brain Res*. 2005; **1050**: 203-9.
- 260 Reynolds AJ, Hendry IA, Bartlett SE. Anterograde and retrograde transport of active extracellular signal-related kinase 1 (ERK1) in the ligated rat sciatic nerve. *Neuroscience*. 2001; **105**: 761-71.
- 261 Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, *et al*. Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*. 1997; **275**: 661-5.
- 262 Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN, *et al*.

The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 1997; **11**: 701-13.

263 Warita H, Manabe Y, Murakami T, Shiro Y, Nagano I, Abe K. Early decrease of survival signal-related proteins in spinal motor neurons of presymptomatic transgenic mice with a mutant SOD1 gene. *Apoptosis.* 2001; **6**: 345-52.

264 Sugimoto T, Bennett GJ, Kajander KC. Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine. *Pain.* 1990; **42**: 205-13.

265 Saxod R, Torch S, Vila A, Laurent A, Stoebner P. The density of myelinated fibres is related to the fascicle diameter in human superficial peroneal nerve. Statistical study of 41 normal samples. *J Neurol Sci.* 1985; **71**: 49-64.

266 Dolapchieva S, Eggers R, Kuhnel W. Automatic image analysis of the postnatal growth of axons and myelin sheaths in the tibial and peroneal nerves of the rabbit. *Ann Anat.* 2000; **182**: 133-42.

267 Romero E, Cuisenaire O, Deneff JF, Delbeke J, Macq B, Veraart C. Automatic morphometry of nerve histological sections. *J Neurosci Methods.* 2000; **97**: 111-22.

268 Wheeler SJ, Plummer JM. Age-related changes in the fibre composition of equine peripheral nerve. *J Neurol Sci.* 1989; **90**: 53-66.

269 Rushton WA. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol.* 1951; **115**: 101-22.

270 Schnepf P, Schnepf G. [Analysis of peripheral nerve fibres in animals of different body size. II. Ratio of axon diameter to fibre diameter and internodal length]. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 1971; **119**: 99-114.

271 Hiscoe HB. Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anat Rec.* 1947; **99**: 447-75.

272 Cooper NA, Kidman AD. Quantitation of the Schmidt-Lanterman incisures in juvenile, adult, remyelinated and regenerated fibres of the chicken sciatic nerve. *Acta Neuropathol.* 1984; **64**: 251-8.

273 Sotnikov OS. [Data on the Statics and Dynamics of Structure of the Schmidt-Lantermann Incisures.]. *Arkh Anat Gistol Embriol.* 1965; **48**: 31-42.

274 Ortiz-Hildago C, Weller, R. O. . Peripheral Nervous System. In: SS S (ed.). *Histology for Pathologists.* New York, Raven Press, 1992.

- 275 Celio MR. [The Schmidt-Lantermann incisures of the myelin sheath of Mauthner axons: site of longitudinal myelin growth]. *Brain Res.* 1976; **108**: 221-35.
- 276 Robertson JD. The ultrastructure of Schmidt-Lanterman clefts and related shearing defects of the myelin sheath. *J Biophys Biochem Cytol.* 1958; **4**: 39-46.
- 277 Sobue G, Yasuda T, Mitsuma T, Ross AH, Pleasure D. Expression of nerve growth factor receptor in human peripheral neuropathies. *Ann Neurol.* 1988; **24**: 64-72.
- 278 Cleveland DW, Bruijn LI, Wong PC, Marszalek JR, Vechio JD, Lee MK, *et al.* Mechanisms of selective motor neuron death in transgenic mouse models of motor neuron disease. *Neurology.* 1996; **47**: S54-61; discussion S61-2.
- 279 Sasaki S, Maruyama S. Increase in diameter of the axonal initial segment is an early change in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1992; **110**: 114-20.
- 280 Delio DA, Fiori MG, Lowndes HE. Motor unit function during evolution of proximal axonal swellings. *J Neurol Sci.* 1992; **109**: 30-40.
- 281 Gold BG. The pathophysiology of proximal neurofilamentous giant axonal swellings: implications for the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Toxicology.* 1987; **46**: 125-39.
- 282 Delisle MB, Carpenter S. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci.* 1984; **63**: 241-50.
- 283 Burt NS, Mc NA, Rossiter RJ. Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration; lipids after nerve crush (axonotmesis). *Biochem J.* 1950; **47**: 318-23.
- 284 Johnson AC, Mc NA, Rossiter RJ. Chemical studies of peripheral nerve during Wallerian degeneration; lipids. *Biochem J.* 1949; **45**: 500-8.
- 285 Krinke G, Froehlich E, Herrmann M, Schnider K, Da Silva F, Suter J, *et al.* Adjustment of the myelin sheath to axonal atrophy in the rat spinal root by the formation of infolded myelin loops. *Acta Anat (Basel).* 1988; **131**: 182-7.

IX ANHANG

1. Tabellen

1.1 Anzahl der Motoneurone

Tab. 1: Ventralhornneurone pro Rückenmarksquerschnitt der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	7,2	2,5	7,75
12	8,25	2,75	6
13	8,2	2,2	6,6
14	8,25	2	7,8
MW	7,98	2,36	7,04
STABW	0,52	0,33	0,89

Tab. 2: Ventralhornneurone pro Rückenmarksquerschnitt der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	4,4	2,8	4,6
2	6	1,6	4
3	5,6	2,6	5,8
4	5,75	1,25	4,75
5	5,2	0,8	4,6
6	5,67	2,2	2,8
7	4	1,2	4,33
8	6,5	1	4,5
9	5,8	1,75	6,2
10	4	1,5	4
MW	5,29	1,67	4,56
STABW	0,87	0,67	0,95

Tab. 3 : Interneurone pro Rückenmarksquerschnitt der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	2	1	2
12	1	1	1
13	1	1	4
14	1	0	3
MW	1,25	0,75	2,50
STABW	0,50	0,50	1,29

Tab. 4: Interneurone pro Rückenmarksquerschnitt der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	2	1	1
2	0	1	1
3	1	0	1
4	1	1	0
5	0	1	1
6	2	1	0
7	1	1	0
8	4	1	0
9	1	1	4
10	2	0	1
MW	1,40	0,80	0,90
STABW	1,17	0,42	1,20

Tab. 5: Motoneurone abzüglich Interneurone pro Rückenmarksquerschnitt der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	5,2	1,5	5,75
12	7,25	1,75	5
13	7,2	1,2	2,6
14	7,25	2	4,8
MW	6,73	1,61	4,54
STABW	1,02	0,34	1,35

Tab. 6: Motoneurone abzüglich Interneurone pro Rückenmarksquerschnitt der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	2,4	1,8	3,6
2	5	0,6	3
3	4,6	2,6	4,8
4	4,75	0,25	4,75
5	5,2	0,8	4,6
6	5,67	2,2	2,8
7	3	0,2	4,33
8	2,5	0	4,5
9	4,8	0,75	2,2
10	2	1,5	3
MW	3,99	1,07	3,76
STABW	1,36	0,90	0,95

1.2 Expressionsarten

Tab. 7: pMAPK-Extensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	4	4	4
12	4	4	4
13	4	4	4
14	4	4	4
MW	4,00	4,00	4,00
STABW	0,00	0,00	0,00

Tab. 8: pMAPK-Intensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	1,5	1,75	1,5
12	1,5	1,75	2
13	1,25	2	2
14	2	2,25	2
MW	1,56	1,94	1,88
STABW	0,31	0,24	0,25

Tab. 9: Expressionsstärke der pMAPK im Remmele-Summationscore, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	6	7	6
12	6	7	8
13	5	8	8
14	8	9	8
MW	6,25	7,75	7,50
STABW	1,26	0,96	1,00

Tab. 10: pMAPK-Extensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	3	4	4
2	4	4	4
3	4	4	4
4	4	4	4
5	4	4	4
6	4	3	4
7	/	4	/
8	4	4	2
9	4	3	3
10	4	4	3
MW	3,88	3,78	3,56
STABW	0,35	0,44	0,73

Tab. 11: pMAPK-Intensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	2	1,75	1,5
2	1,5	1,5	1
3	2	2,5	2
4	1	1	1
5	2	1,625	2
6	1,5	2	1
7	/	2,5	/
8	1,5	1,25	1,5
9	1,5	1,6	2
10	1,75	2	1
MW	1,66	1,77	1,44
STABW	0,35	0,49	0,46

Tab. 12: Expressionsstärke der pMAPK im Remmele-Summationsscore, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	6	7	6
2	6	6	4
3	8	10	8
4	4	4	4
5	8	7	8
6	6	6	4
7	/	10	/
8	6	5	3
9	6	5	6
10	7	8	3
MW	6,33	6,8	5,11
STABW	1,22	2,04	1,96

Tab. 13: nukleäre Expressionsstärke der pMAPK im einfachen Score, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	2	1	2
12	2	2	2
13	2	2	2
14	2	1	2
MW	2,00	1,50	2,00
STABW	0,00	0,58	0,00

Tab. 14: nukleäre Expressionsstärke der pMAPK im einfachen Score, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	0	2	1
2	1	2	1
3	2	2	2
4	1	1	1
5	1	2	2
6	2	2	1
7	/	2	/
8	1	1	1
9	1	2	1
10	2	2	1
MW	1,22	1,80	1,22
STABW	0,67	0,42	0,44

Tab. 15: zytoplasmatische Expressionsstärke der pMAPK im einfachen Score, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	0	0	0
MW	0,00	0,00	0,00
STABW	0,00	0,00	0,00

Tab. 16: zytoplasmatische Expressionsstärke der pMAPK im einfachen Score,

Cra1-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	0	2	1
2	0	0	0
3	1	0	0
4	0	1	0
5	0	1	1
6	0	0	0
7	/	0	/
8	0	0	0
9	0	0	0
10	0	0	0
MW	0,11	0,40	0,22
STABW	0,33	0,70	0,44

Tab. 17: Erk5-Extensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	4	4	4
12	4	4	4
13	4	4	4
14	4	4	4
MW	4,00	4,00	4,00
STABW	0,00	0,00	0,00

Tab. 18: Erk5-Intensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	1	1	1,25
12	1	2	1,5
13	1	2	2
14	0,75	1,5	1
MW	0,94	1,63	1,44
STABW	0,13	0,48	0,43

Tab. 19: Expressionsstärke der Erk5 im Remmele-Summationsscore, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	4	4	5
12	4	8	6
13	4	8	8
14	3	6	4
MW	3,75	6,5	5,75
STABW	0,5	1,91	1,71

Tab. 20: Erk5-Extensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	4	4	4
2	4	/	2
3	4	/	4
4	4	4	/
5	4	/	4
6	4	4	1
7	4	4	4
8	4	4	2
9	4	4	4
10	4	4	4
MW	4,00	4,00	3,22
STABW	0,00	0,00	1,20

Tab. 21: Erk5-Intensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	2,25	2,25	2
2	/	/	1
3	0,625	/	0,625
4	0,5	1	/
5	1,375	/	1,75
6	1,75	2	0,5
7	1	1	1
8	1	1	0,5
9	1	1,5	1
10	1	0,5	1
MW	1,17	1,32	1,04
STABW	0,55	0,62	0,52

Tab. 22: Expressionsstärke der Erk5 im Remmele-Summationsscore, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	9	9	8
2	/	/	2
3	2,5	/	2,5
4	3	4	/
5	3,5	0	7
6	7	8	0,5
7	4	4	4
8	4	4	1
9	4	6	4
10	4	2	4
MW	4,56	4,63	3,67
SD	2,08	2,97	2,54

Tab. 23: nukleäre Expressionsstärke der Erk5 im einfachen Score, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	2	2	2,0
12	2	/	2,0
13	2	2	2
14	1	1	1
MW	1,75	1,67	1,75
SD	0,50	0,58	0,50

Tab. 24: nukleäre Expressionsstärke der Erk5 im einfachen Score der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	1	1	1
2	/	/	1
3	1	2	1
4	1	1	/
5	1	/	1
6	1	2	1
7	1	1	1
8	1	2	0
9	1	1	1
10	1	1	1
MW	1,00	1,38	0,89
SD	0,00	0,52	0,33

Tab. 25: zytoplasmatische Expressionsstärke der Erk5 im einfachen Score, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	1	1	1
12	1		1
13	1	0	2
14	0	0	0
MW	0,75	0,33	1,00
SD	0,50	0,58	0,82

Tab. 26: zytoplasmatische Expressionsstärke der Erk5 im einfachen Score, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	1	0	1
2			0
3	0	0	0
4	1	0	
5	0		1
6	1	1	0
7	0	0	1
8	0	0	0
9	1	0	0
10	1	0	1
MW	0,56	0,13	0,44
SD	0,53	0,35	0,53

Tab. 27: pAkt-Extensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	4	4	4
12	4	4	4
13	4	4	4
14	4	4	4
MW	4,00	4,00	4,00
STABW	0,00	0,00	0,00

Tab. 28: pAkt-Intensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	1,25	1,75	1,25
12	1,25	1,5	1,5
13	0,5	1,25	1,5
14	1	2	1
MW	1,00	1,63	1,31
STABW	0,35	0,32	0,24

Tab. 29: Expressionsstärke der pAkt im Remmele-Summationsscore, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	6	7	5
12	5	6	6
13	2	5	6
14	4	8	4
MW	4,25	6,50	5,25
SD	1,71	1,29	0,96

Tab. 30: pAkt-Extensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	4	4	4
2	4	4	
3	4	4	4
4	4	4	4
5	4	4	4
6	4	4	4
7	/	4	/
8	4	4	4
9	4	4	4
10	4	4	4
MW	4,00	4,00	4,00
STABW	0,00	0,00	0,00

Tab. 31: pAkt-Intensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	2	1	1,25
2	1,5	1,75	/
3	1	1	1
4	1	1	1
5	1,5	1	1
6	1,5	1,75	1
7	/	1,25	/
8	1	1	1
9	1,5	1,25	1,5
10	1,25	1	1
MW	1,41	1,20	1,09
STABW	0,33	0,31	0,19

Tab. 32: Expressionsstärke der pAkt im Remmele-Summationsscore, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	8	4	5
2	6	7	0
3	4	4	4
4	4	4	4
5	6	4	4
6	6	7	4
7	/	5	/
8	4	4	4
9	6	5	6
10	5	4	4
MW	5,44	4,8	3,89
SD	1,33	1,23	1,62

Tab 33: BDNF-Extensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	2	4	4
12	4	4	4
13	4	4	4
14	4	4	4
MW	3,50	4,00	4,00
STABW	1,00	0,00	0,00

Tab. 34: BDNF-Intensität der Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	1	1,5	1,5
12	1,5	1	1,5
13	2	1,25	2,25
14	1	0,5	2
MW	1,38	1,06	1,81
STABW	0,48	0,43	0,38

Tab. 35: Expressionsstärke der BDNF im Remmele-Summationsscore, Wildtypen

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
11	2	6	6
12	6	4	6
13	6	7	9
14	4	2	7
MW	4,50	4,75	7,00
SD	1,91	2,22	1,41

Tab. 36: BDNF-Extensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	1	4	0
2	4	4	4
3	4	4	4
4	4	4	4
5	4	4	4
6	4	4	4
7		4	4
8	4	4	4
9	4	4	4
10	4	4	4
MW	3,67	4,00	3,60
STABW	1,00	0,00	1,26

Tab. 37: BDNF-Intensität der *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	3	1	0
2	1,25	1,5	1,25
3	1,75	1,25	1
4	1	1,25	1,5
5	1,5	1	1
6	1,5	1	0,5
7	/	1,75	1,75
8	1,5	1,75	0,5
9	1,75	1,5	1,75
10	1,5	2	2,25
MW	1,64	1,40	1,15
STABW	0,56	0,36	0,69

Tab. 38: Expressionsstärke der BDNF im Remmele-Summationsscore, *Cra1*-Mäuse

Tier	Zervikal	Thorakal	Lumbal
1	3	2	0
2	5	6	5
3	7	6	4
4	4	5	6
5	6	4	4
6	6	4	2
7	/	7	7
8	7	7	2
9	7	6	7
10	6	8	9
MW	5,67	5,50	4,60
SD	1,41	1,78	2,76

1.3 Pathomorphologische Fasercharakteristika

Tab. 39: Pathomorphologische Fasercharakteristika pro Faszikelquerschnitt, Wildtypen

Tier	IML	OML	MD	Axonverkleinerung	WD	Myelin-Debris	Hypomyelin. Faser
11a	2	2	1	9	0	4	0
11b	0	9	2	7	0	3	0
12a	0	13	3	7	1	2	2
13a	0	10	0	2	0	3	0
13b	1	11	0	13	0	2	1
14a	0	8	0	4	0	1	0
14b	4	14	1	10	0	3	2
MW	1,00	9,57	1,00	7,43	0,14	2,57	0,71
SD	1,53	3,95	1,15	3,69	0,38	0,98	0,95

Tab. 40: Pathomorphologische Fasercharakteristika pro Fazikelquerschnitt, *Cra1*-Mäuse

Tier	IML	OML	MD	Axon Atrophie	WD	Myelin-Debris	Hypomyelin. Faser
1a	0	7	0	3	0	2	0
1b	0	34	0	3	0	1	0
2a	0	6	0	5	1	4	0
2b	0	10	0	3	0	2	0
3a	2	9	0	1	0	1	1
3b	6	14	1	3	0	3	3
4a	2	14	0	3	0	3	5
4b	0	8	1	1	0	3	1
5a	0	13	0	4	0	1	3
5b	2	25	0	2	1	4	0
6a	3	13	1	3	0	2	0
6b	0	11	0	6	0	4	0
7a	3	13	0	6	0	4	0
8a	0	6	0	4	0	2	0
8b	0	9	0	4	0	2	0
9a	10	1	0	4	0	4	0
9b	3	8	2	4	0	4	2
10a	1	4	0	4	1	2	0
10b	8	13	0	6	0	2	0
MW	2,11	11,47	0,26	3,63	0,16	2,63	0,79
SD	2,94	7,44	0,56	1,46	0,37	1,12	1,44

1.4 Morphometrische Daten des *N. ischiadicus*

Tab. 1: Wildtypen

Tier	Faszikelfläche	Faseranzahl	Faserdichte/mm ²	Endoneuralfäche
11a	52008	743	14286	19768
11b	121073	1580	13050	50218
12a	114724	1391	12125	42983
13a	49782	836	16793	16731
13b	126354	1683	13320	55949
14a	106311	1483	13950	39707
14b	144157	1658	11501	64738
MW	102058,43	1339,14	13575	41442
SD	36834,06	389,41	1720	17870

Tab. 2: *Cra1*-Mäuse

Tier	Faszikelfläche	Faseranzahl	Faserdichte/mm ²	Endoneuralfäche
1a	28598	373	13043	9428
1b	95409	800	8385	43322
2a	46325	433	9347	16723
2b	90086	913	10135	49475
3a	94531	849	8981	34144
3b	82905	750	9047	38538
4a	137157	1322	9639	61107
4b	78656	855	10870	28144
5a	81489	1027	12603	31597
5b	74535	795	10666	26596
6a	56611	797	14079	20011
6b	78217	765	9780	33027
7a	77501	803	10361	27712
8a	70710	738	10437	37066
8b	63164	725	11478	23500
9a	37461	395	10544	14519
9b	110506	845	7647	62864
10a	49456	598	12092	15906
10b	83200	560	6731	48429
MW	75606,16	754,89	10309	32743
SD	25688,85	223,39	1835	15189

2. Histogramme

2.1 Faserflächenverteilungshistogramme der Wildtypen

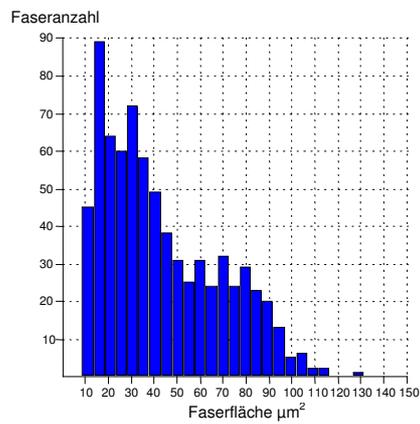


Abb. 1: Tier 11a

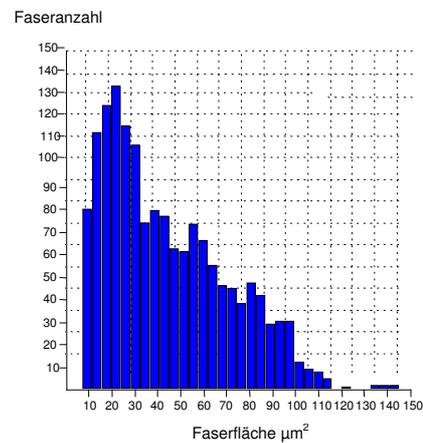


Abb. 2: Tier 11b

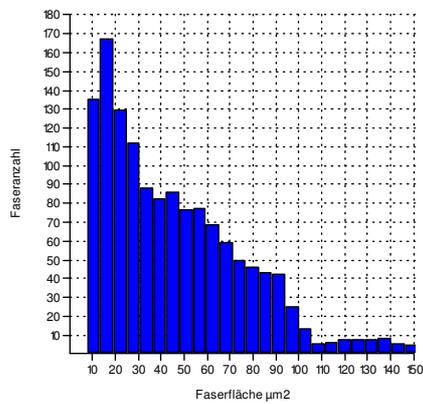


Abb. 3: Tier 12a

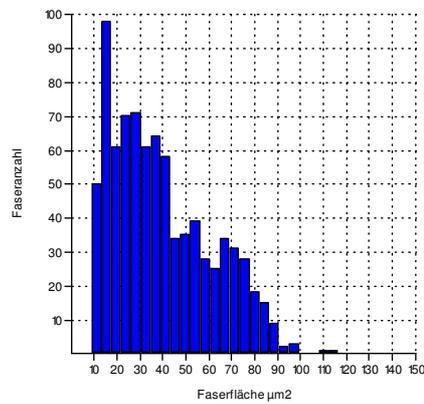


Abb. 4: Tier 13a

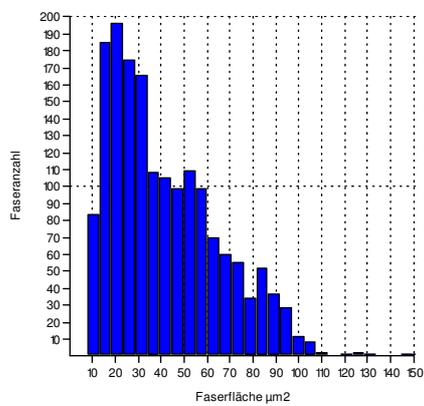


Abb. 5: Tier 13b

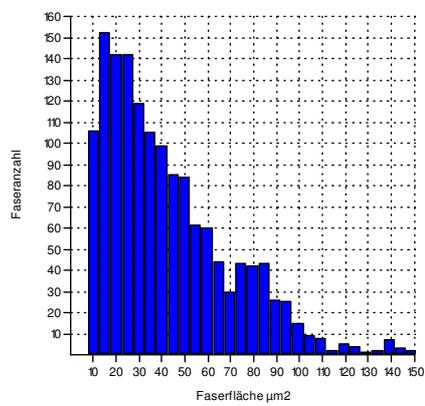


Abb. 6: Tier 14a

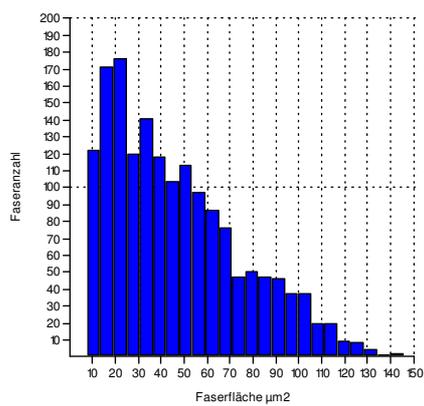


Abb. 7: Tier 14b

2.1.1 Faserflächenverteilungshistogramme der *Cra1*-Mäuse

Faseranzahl

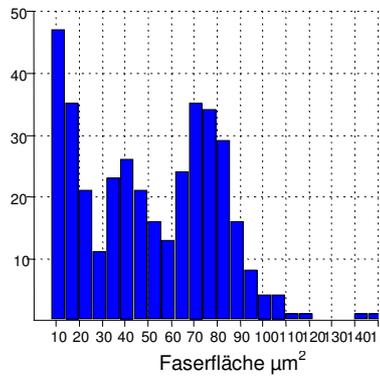


Abb. 8: Tier 1a

Faseranzahl

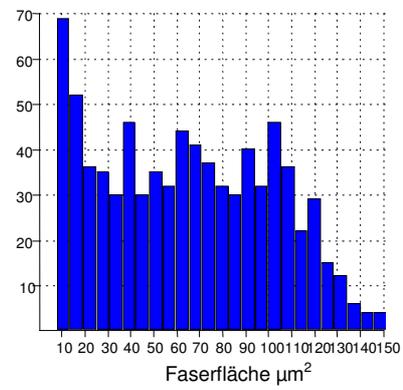


Abb. 9: Tier 1b

Faseranzahl

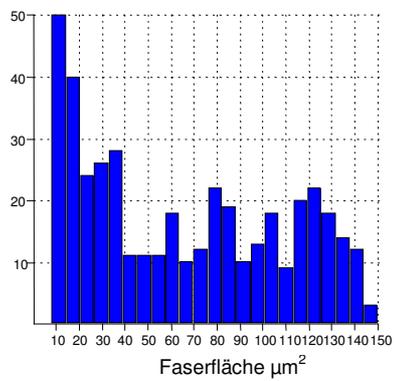


Abb. 10: Tier 2a

Faseranzahl

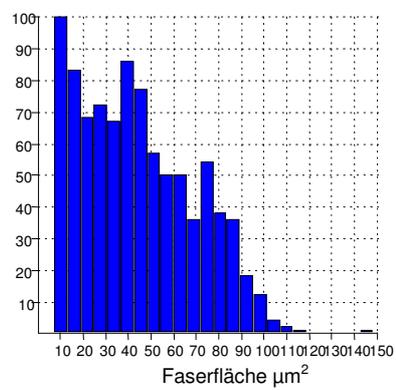


Abb. 11: Tier 2b

Faseranzahl

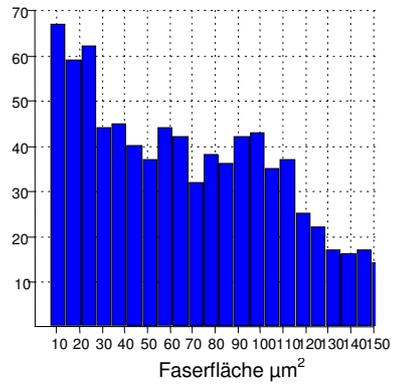


Abb. 12: Tier 3a

Faseranzahl

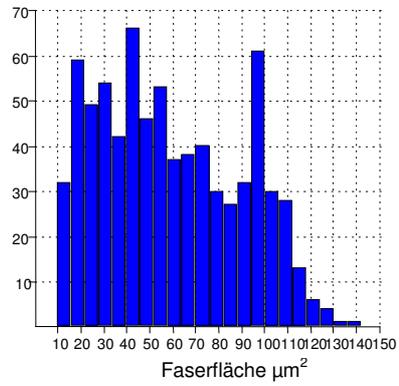


Abb. 13: Tier 3b

Faseranzahl

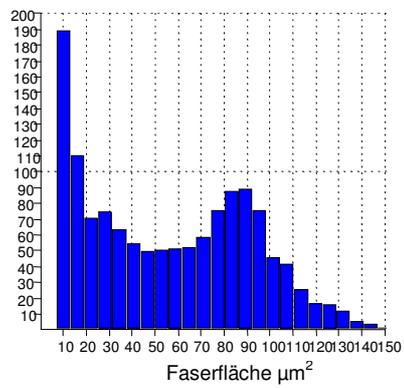


Abb. 14: Tier 4a

Faseranzahl

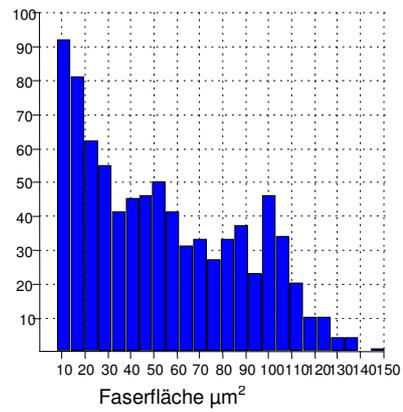


Abb. 15: Tier 4b

Faseranzahl

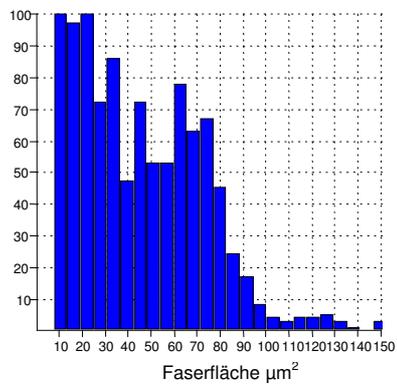


Abb. 16: Tier 5a

Faseranzahl

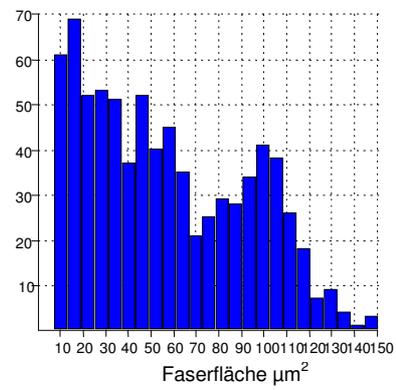


Abb. 17: Tier 5b

Faseranzahl

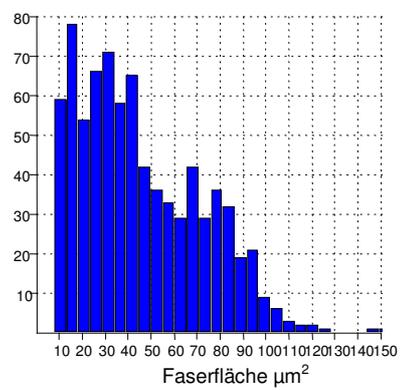


Abb. 18: Tier 6a

Faseranzahl

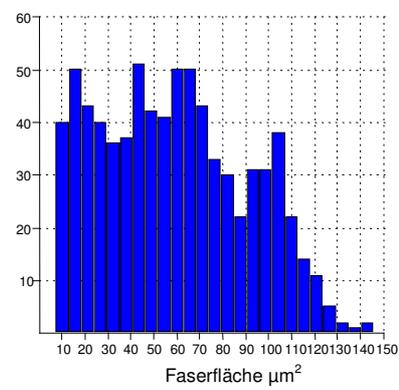


Abb. 19: Tier 6b

Faseranzahl

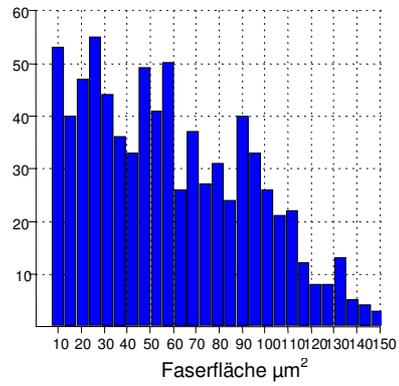


Abb. 20: Tier 7a

Faseranzahl

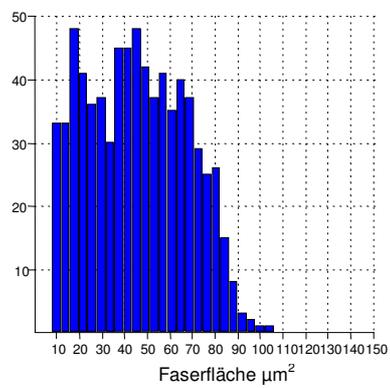


Abb. 21: Tier 8a

Faseranzahl

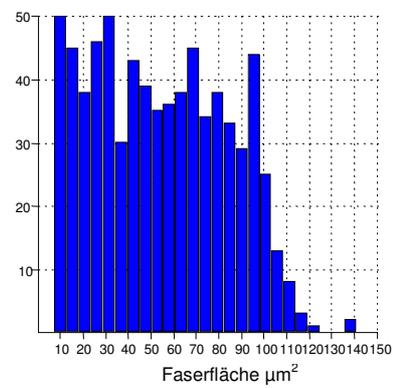


Abb. 22: Tier 8b

Faseranzahl

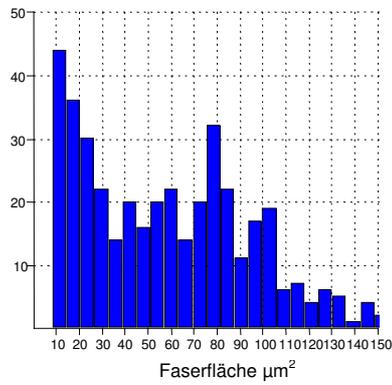


Abb. 23: Tier 9a

Faseranzahl

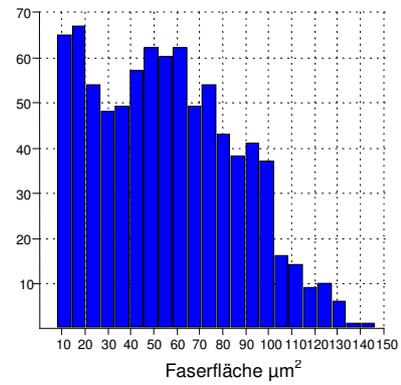


Abb. 24: Tier 9b

Faseranzahl

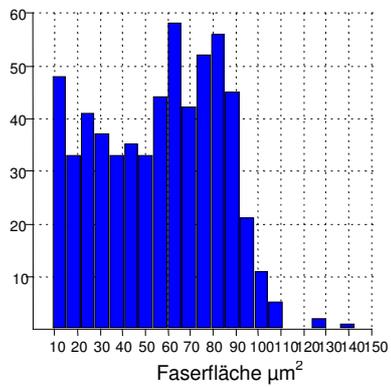


Abb. 25: 10a

Faseranzahl

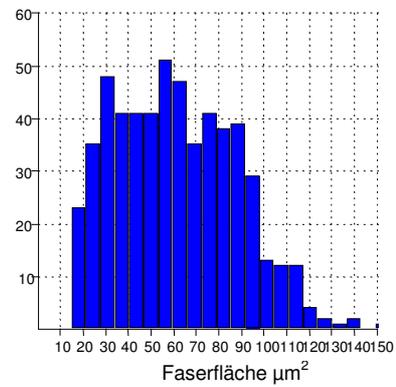


Abb. 26: 10b

2.2 Axonflächenverteilungshistogramme Wildtypen

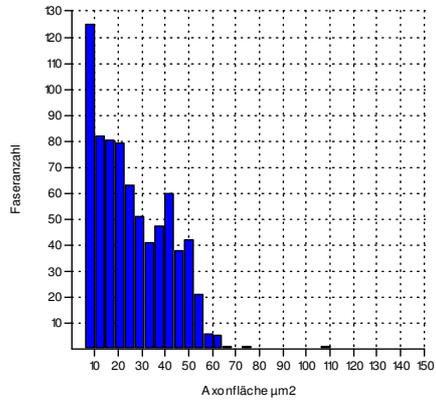


Abb. 27: Tier 11a

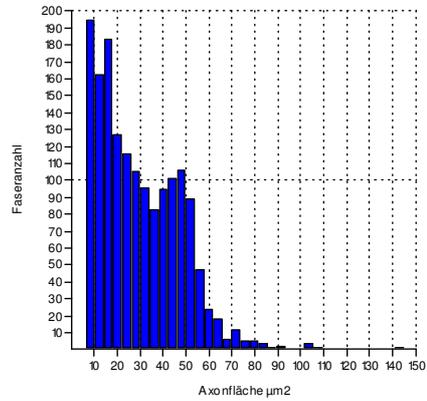


Abb. 28: Tier 11b

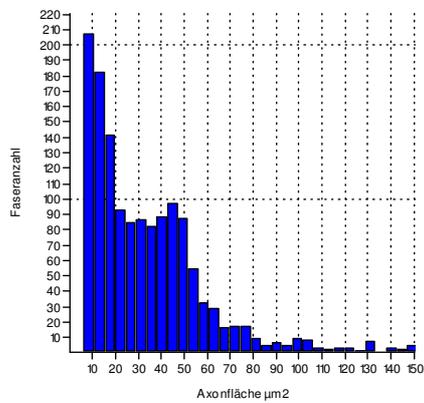


Abb. 29: Tier 12a

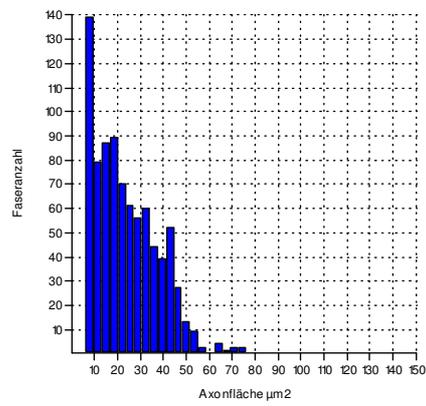


Abb. 30: Tier 13a

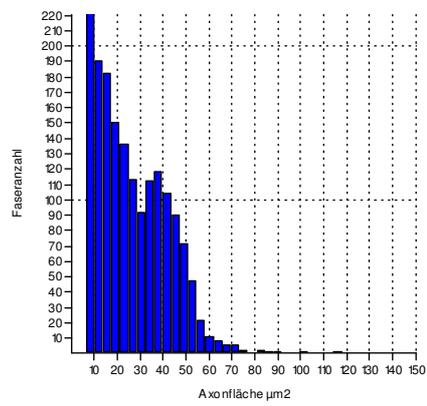


Abb. 31: Tier 13b

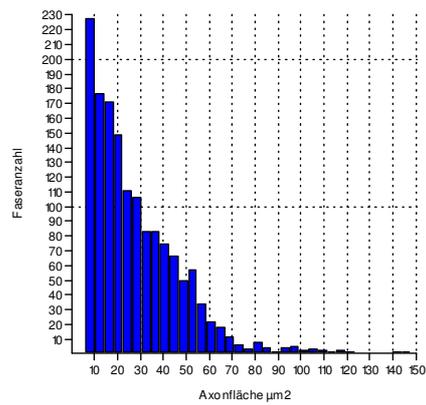


Abb. 32: Tier 14a

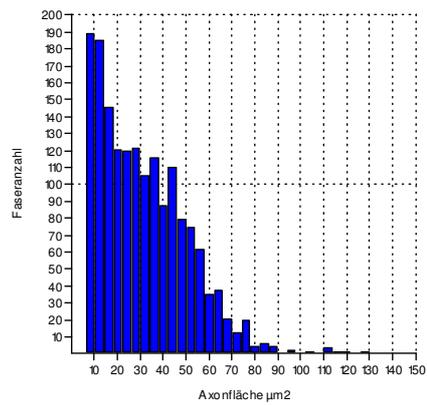


Abb. 33: Tier 14b

2.3 Axonflächenverteilungshistogramme *Cra1*-Mäuse

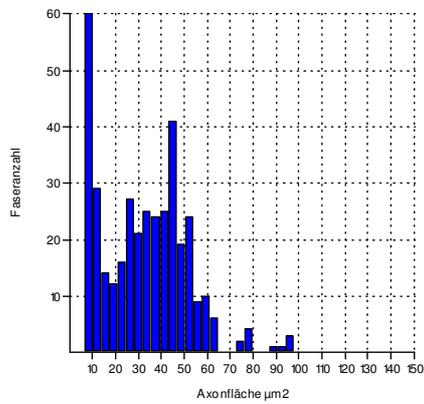


Abb. 34: Tier 1a

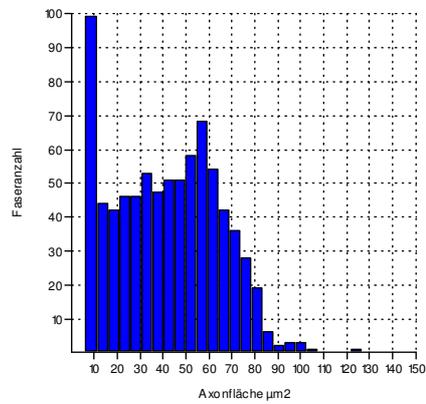


Abb. 35: Tier 1b

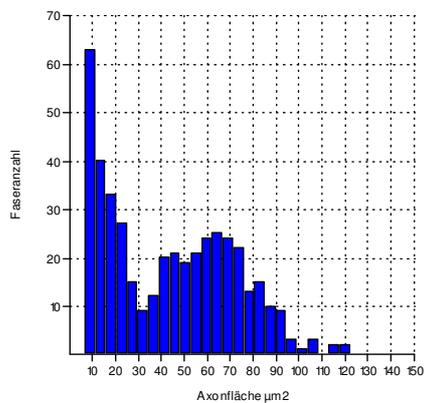


Abb. 36: Tier 2a

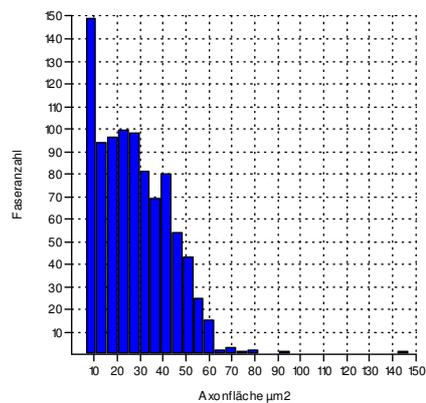


Abb. 37: Tier 2b

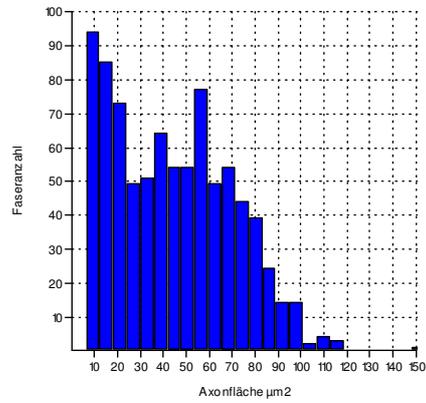


Abb. 38: Tier 3a

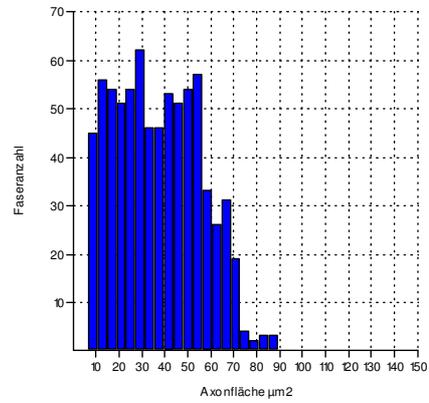


Abb. 39: Tier 3b

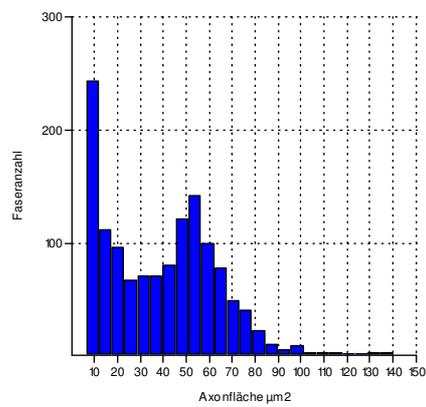


Abb. 40: Tier 4a

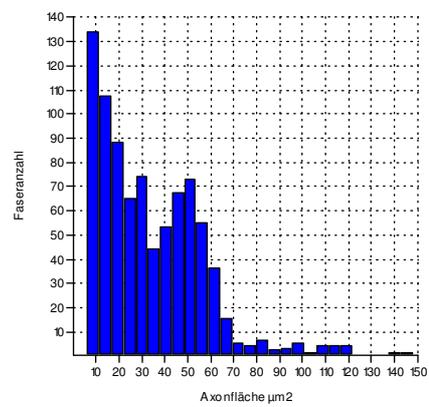


Abb. 41: Tier 4b

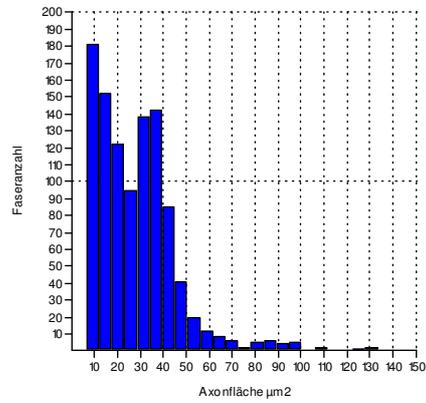


Abb. 42: Tier 5a

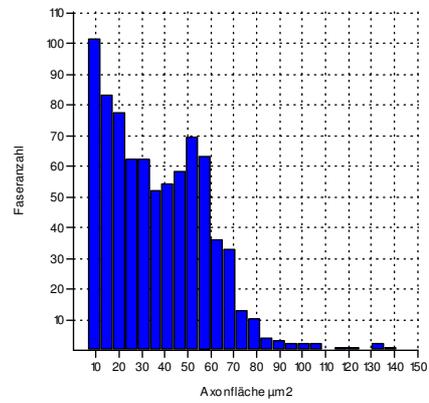


Abb. 43: Tier 5b

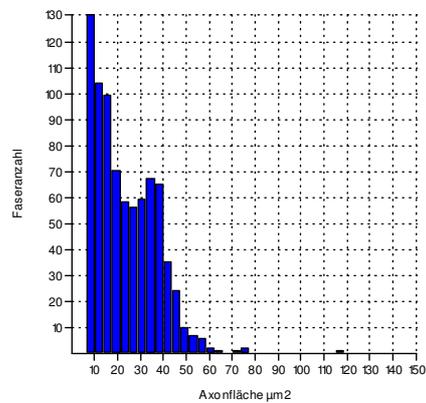


Abb. 44: Tier 6a

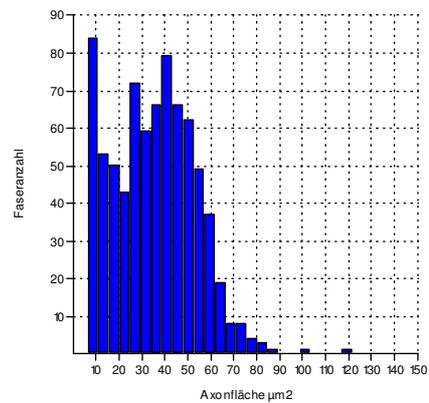


Abb. 45: Tier 6b

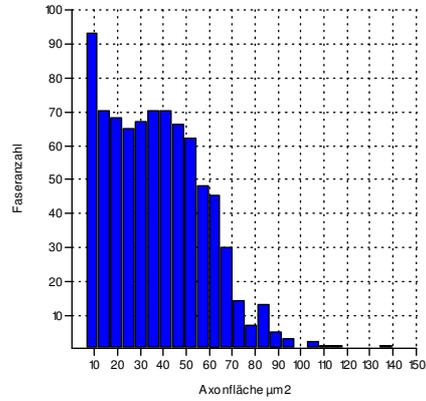


Abb.: 46: Tier 7a

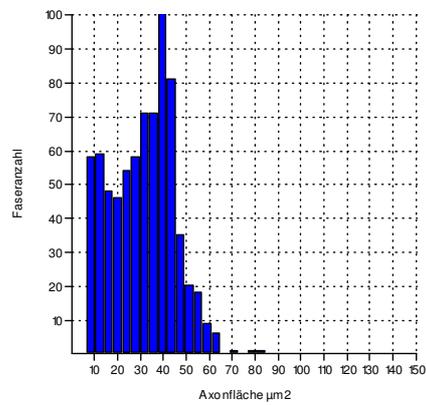


Abb. 47: Tier 8a

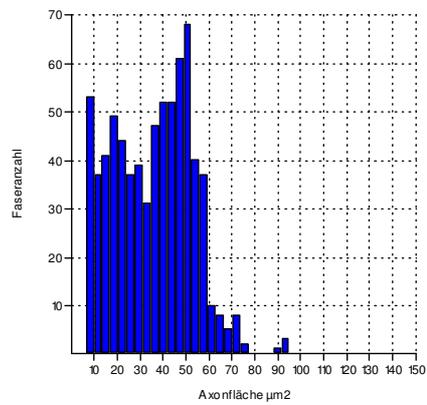


Abb. 48: Tier 8b

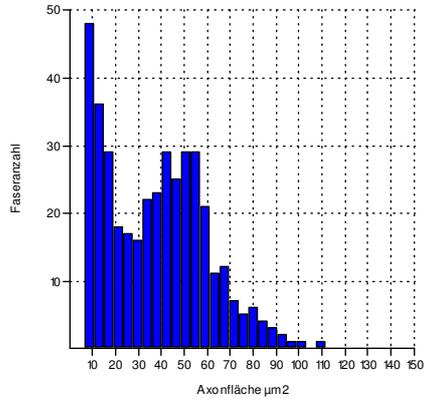


Abb. 49: Tier 9a

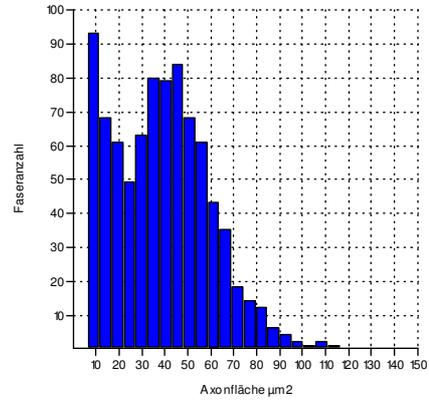


Abb. 50: Tier 9b

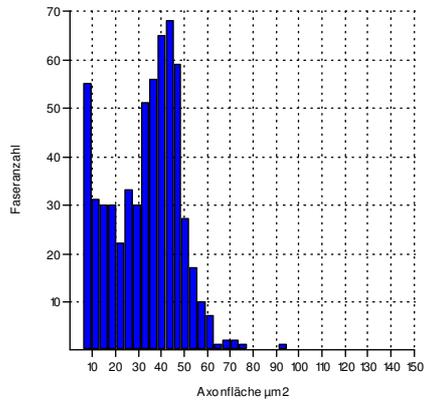


Abb. 51: Tier 10a

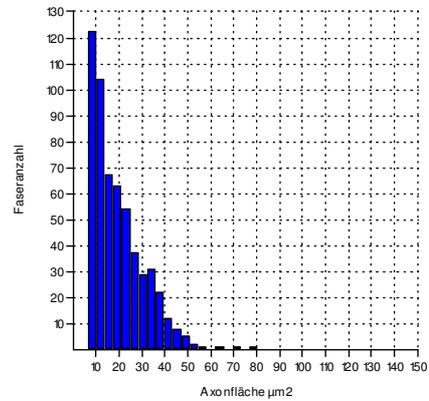


Abb. 52: Tier 10b

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Schmahl für die Überlassung des Themas und das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die freundliche Unterstützung.

Mein ganz spezieller Dank gilt Herrn Dr. Kaspar Matiasek, der mir besonders in den letzten Tagen unermüdlich zur Seite stand, und ohne dessen kompetente und geduldige Betreuung die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Des weiteren bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Schlegel für seine freundliche Unterstützung und fachliche Betreuung dieser Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön gilt meinen Eltern für ihre bedingungslose und liebevolle Unterstützung. Ohne Sie wäre mir Vieles nicht vergönnt gewesen.

Außerdem möchte ich meinem Freund Daniel Schätzle für seine endlose Geduld und die seelische und moralische Unterstützung während der ganzen Zeit danken.

Ferner danke ich den MitarbeiterInnen der Neuropathologie der tiermedizinischen Fakultät und der Neuropathologie des Klinikums Rechts der Isar für ihre freundliche Hilfe bei der Herstellung der histologischen Präparate.

