

Genom- und Verhaltensforschung

Verhaltensphänotypisierung von Mäusen

SABINE M. HÖLTER

INSTITUT FÜR ENTWICKLUNGSGENETIK, HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN, NEUHERBERG, UND TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

According to the recent global burden of disease study of the World Health Organisation, mental and neurological disorders account for a substantial proportion of the world's disease burden. In complex diseases, both life style and genetic predisposition contribute to disease development. The mouse has become a valuable animal model to understand disease etiology and to develop therapies, because mice can be easily genetically modified, and many disease symptoms can be readily measured in mice.

DOI: 10.1007/s12268-017-0777-5
© Springer-Verlag 2017

■ Psychiatrische und neurologische Erkrankungen stellen eine große Belastung dar, sowohl für Betroffene und Angehörige als auch für Gesellschaften und Gesundheits-

systeme. Nach einer kürzlichen Schätzung sind sie zusammen mit Suchterkrankungen weltweit die Hauptursache für Lebensjahre, die mit Beeinträchtigungen gelebt wurden

(years lived with disability, YLDs) [1]. Für die Suche nach den Krankheitsursachen und nach Therapien bieten sich, neben anderen Forschungsstrategien, genetisch modifizierte Mausmodelle an. Das liegt zum einen daran, dass bei der Maus als Säugetier viele motorische, emotionale, soziale und kognitive Verhaltensweisen dem Menschen ähnlich sind und dass sie in der Maus gut messbar sind. Zum anderen liegt es daran, dass für die Maus vergleichsweise viel Erfahrung in der Erzeugung von präzisen genetischen Mausmodellen vorhanden ist. So können aus genomweiten Assoziationsstudien und nachfolgenden Untersuchungen beim Menschen Allele bestimmter Kandidatengene für eine Erkrankung identifiziert und unter Verwendung moderner molekularbiologischer Technologien in der Maus exprimiert werden. Wenn diese Mäuse ähnliche Symptome zeigen wie der Mensch, dann ist diese mutante Mauslinie ein gutes Tiermodell, um die Entstehung der Krankheit zu erforschen und Therapieansätze zu überprüfen.

Hintergrund

Methoden zur Charakterisierung des Verhaltens von Labornagern wurden zunächst hauptsächlich in der präklinischen pharmazeutischen Forschung entwickelt und verwendet, um Wirkstoffe auf ihre Wirksamkeit und auf potenzielle Nebenwirkungen zu untersuchen. Hierfür wurde vorwiegend die Labormaus als Tiermodell verwendet. Die Sequenzierung des Human- und des Mausgenoms [2] ermöglichte die Entstehung der funktionalen Genomforschung, in deren Zuge viele Großprojekte entstanden, die die Aufklärung der Funktion aller Gene im Säugetiergenom zum Ziel haben [3–5]. Im Rahmen dieser Entwicklung entstanden immer mehr mutante Mauslinien, und die Verhaltensphänotypisierungsmethoden wurden an die Labormaus als Tiermodell angepasst. In der Maus robust messbare Aspekte des Verhaltens, die Symptome für psychiatrische und neurologische Erkrankungen darstellen können, betreffen die Sensorik, Motorik, Emo-



▲ **Abb. 1:** Im *ladder walking*-Test läuft die Maus über eine Leiter mit unregelmäßigen Sprossenabständen. Der Beobachter zeichnet die Anzahl der Fehlritte auf, bei denen die Maus eine Sprosse verfehlt. Dieser motorische Test erfordert die dynamische Anpassung des Gangs an die unterschiedlichen Sprossenabstände. Er dient dem Nachweis motorischer Defizite, wie sie z. B. bei Tiermodellen der Parkinson'schen Erkrankung, Schlaganfall oder Rückenmarksläsionen vorkommen.

tionalität sowie Lern- und Gedächtnisfähigkeiten.

Sensorik

Für die Untersuchung der Sensorik der Maus werden Reflexantworten als zuverlässigstes Maß angesehen und bevorzugt verwendet. So wird z. B. der optokinetische Reflex (Nystagmus) ausgelöst, um das Sehvermögen zu untersuchen. Dieser Reflex wird ausgelöst, wenn die gesamte visuelle Szene sich über die Retina bewegt, das Auge also bewegten Bildern ausgesetzt ist. Dadurch wird eine Augenbewegung in die gleiche Richtung ausgelöst, periodisch unterbrochen durch Rückbewegungen (Sakkaden) in die entgegengesetzte Richtung, die das Auge wieder in die Ausgangsposition zurückbringen für eine neue Rotationssequenz. Bei der Maus ist dieser Reflex nicht anhand der Augenbewegungen, sondern anhand von Bewegungssequenzen des ganzen Kopfes messbar. Dazu wird die Maus in die Mitte einer Arena gesetzt, deren Wände aus vier Monitoren bestehen, über die durch einen Computer

gesteuert schwarz-weiße Längsstreifenmuster bewegt werden. Kann die Maus die Muster sehen, wird sie reflexartig den Kopf in Drehrichtung des Musters bewegen.

Das Hörvermögen wird mithilfe der Messung des akustischen Schreckreflexes im wachen Tier oder durch Ableitung akustisch evozierter Hirnstammpotenziale am narkotisierten Tier überprüft. Die Schmerzsensibilität wird häufig als Messung der Reaktionszeit auf einen Wärmereiz ermittelt, entweder mit dem *hot plate*-Test (supraspinaler Reflex), bei dem die Wärme auf alle vier Pfoten appliziert wird, oder mit dem *tail flick*-Test (spinaler Reflex), bei dem die Wärme lokal auf eine Stelle am Schwanz appliziert wird [6]. Die Sensibilität des Geruchs- und des Geschmackssinns wird meistens unter Verwendung von Präferenztests analysiert, z. B. indem verschiedene Verdünnungen attraktiver Geruchs- oder Geschmacksstoffe angeboten werden [7]. Die Präpulsinhibition des akustischen Schreckreflexes ist ein weitverbreiteter Test zur Untersuchung der sensorischen Integrationsfähigkeit. Stö-

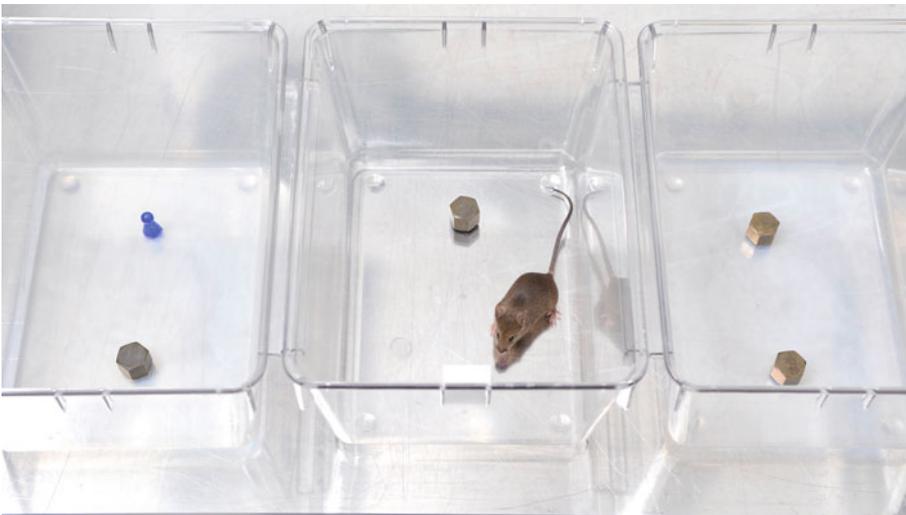
rungen dieses Reflexes treten im Zusammenhang mit Schizophrenie und anderen neuropsychiatrischen Erkrankungen auf [8].

Motorik

Zur Untersuchung der Motorik werden sowohl die Spontanaktivität als auch die motorischen Fähigkeiten getestet. Für die Messung der Spontanaktivität werden die Tiere in eine bisher unbekannte Umgebung gesetzt, in der möglichst automatisiert, z. B. mithilfe von Videotracking- oder Lichtschrankensystemen, die Bewegung quantifiziert wird. Hierfür wird am häufigsten der *open field*-Test verwendet, für den meistens eine quadratische Arena eingesetzt wird, die die Tiere frei erkunden können. Gemessen werden die Intensität sowie der Ort (Wandnähe oder exponierte Mitte der Arena) der Exploration und die Entwicklung über die Zeit [9]. Aber auch die freiwillige Laufaktivität in einem Laufrad, das sich im Heimkäfig der Maus befindet, kann zur Bestimmung der motorischen Aktivität verwendet werden. Die motorischen Fähigkeiten wer-



▲ **Abb. 2:** Im *elevated plus-maze*-Test wird die Emotionalität bzw. Ängstlichkeit gemessen. Die Testapparatur besteht aus zwei offenen, exponierten und zwei „geschlossenen“ Armen mit hohen Wänden. Mäuse bevorzugen natürlicherweise die geschützten, geschlossenen Arme, sodass die Zeit, die sie auf den „offenen“ Armen verbringen, als Maß für ihre Ängstlichkeit genommen werden kann. Je mehr Zeit eine Maus auf dem „offenen“ Arm verbringt, desto weniger ängstlich ist sie.



▲ **Abb. 3:** Der Objekterkennungstest dient der Messung des Erinnerungsvermögens an Objekte. Zunächst darf die Maus zwei identische Objekte erkunden (rechter Käfig). Nach einer im Heimkäfig (ohne Objekte) verbrachten Retentionszeit von z. B. drei Stunden wird die Maus in einen Käfig gesetzt, in dem eines der nun bekannten Objekte durch ein neues Objekt ersetzt wurde (mittlerer Käfig, weißer Quader). erinnert sich die Maus an das bekannte Objekt, so wird sie nun das neue Objekt länger erkunden als das bereits bekannte. Nach 24 Stunden im Heimkäfig wird dieser Test noch einmal durchgeführt, wieder mit einem unbekanntem neuen Objekt (linker Käfig, blauer Spielstein). Mit dieser Methode kann das Objektgedächtnis nach drei und nach 24 Stunden ermittelt werden.

den untersucht, indem die Mäuse z. B. über einen abgerundeten Balken (*beam walking*) oder eine horizontale Leiter mit unterschiedlichen Sprossenabständen (*ladder walking*) laufen müssen (**Abb. 1**). Beim *vertical pole*-Test muss sich die Maus an einem ver-

tikalen Stab anklammern, umdrehen und herunterklettern. Darüber hinaus gibt es verschiedene Systeme zur automatisierten Ganganalyse bei Mäusen (z. B. CatWalk® oder DigiGait®), mit denen jeweils mehrere Hundert Gangparameter ermittelt werden kön-

nen. Die Muskelkraft der Tiere wird mit dem *grip strength*-Test gemessen, bei dem gemessen wird, mit wie viel Kraft die Tiere an einem Gitter oder einem Stab ziehen. Gleichgewichtssinn und motorische Koordinationfähigkeit sind gefordert beim Laufen auf einem Laufrad, dessen Umdrehungsgeschwindigkeit kontinuierlich zunimmt (*accelerating rotarod*). Zusätzlich können Störungen des Gleichgewichtssinns im Labyrinthorgan, die in keinem der bisher genannten Tests unbedingt auffallen müssen, leicht ermittelt werden, indem in einem Waschbecken voll Wasser kurz die Schwimmfähigkeit der Maus überprüft wird. Defizite in motorischen Tests weisen auf Störungen hin, die mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen im Zusammenhang stehen können, z. B. mit Morbus Parkinson, Morbus Huntington oder amyotropher Lateralsklerose.

Emotionalität

Für die Analyse krankheitsrelevanter Aspekte emotionalen Verhaltens wird bei Mäusen am häufigsten ihr Verhalten in ungewohnten Situationen untersucht. In diesen sind sie dem Konflikt zwischen der Neugier, die unbekannte Umgebung zu erkunden, und der Vermeidung möglicherweise lauender Gefahren ausgesetzt. Hierzu werden die Tiere in eine neue, bisher unbekannte Umgebung gesetzt, in der entweder die Exponiertheit die Herausforderung darstellt (*open field*-Test) oder die Helligkeit (*light-dark box*-Test) oder die Höhe (*elevated plus-maze*-Test, **Abb. 2**) oder die Konfrontation mit einem bisher unbekanntem Artgenossen (*social interaction test*). Mit den genannten Tests werden verschiedene Aspekte der Ängstlichkeit untersucht [9]. Testparadigmen für Mäuse, die Aspekte depressiven Verhaltens untersuchen, sind hauptsächlich durch Stressoren hervorgerufene Reduktionen des Flucht- und Vermeidungsverhaltens, die auch als *behavioral despair* bezeichnet werden. Die am häufigsten verwendeten Tests in diesem Zusammenhang sind der *forced swim*- und der *tail suspension*-Test, in denen die Maus für wenige Minuten in eine scheinbar ausweglose Situation gebracht und gemessen wird, ob sie versucht, diese aktiv oder passiv zu bewältigen. Passivität wird dann als depressives Verhalten gewertet. Durch die Untersuchung der Reaktivität auf einen akuten Stressor können hormonelle Veränderungen im Stressbewältigungssystem des Körpers zuverlässig detektiert werden [10].

Lernen und Gedächtnis

Bei Mäusen werden für die Untersuchung kognitiver Funktionen in der Regel aversiv (negativ) oder appetitiv (positiv) motivierende Testsituationen verwendet. Aversive Lern- und Gedächtnisinhalte können unter anderem für Angsterkrankungen, Depression oder posttraumatische Stresserkrankungen relevant sein. In diesem Zusammenhang werden vielfach Konditionierungsparadigmen verwendet, in denen die Tiere die Assoziation zwischen einem bis dahin neutralen Stimulus und einem aversiven Stimulus, z. B. einem milden Fußschock, erlernen müssen. Beispiele dafür sind aktive oder passive Vermeidungstests, kontext- oder stimulusbezogene Furchtkonditionierungsprotokolle und die Messung des furchtpotenziierten Schreckreflexes.

Für Demenzerkrankungen relevante Lern- und Gedächtnisphänotypen, wie Orientierungsvermögen und Arbeitsgedächtnis, werden z. B. in Labyrinthtests wie dem Acht-Arm-Labyrinth, *Morris water maze*, *Barnes maze*, *T-maze*, *IntelliCage* oder anhand spontaner Alternation in einem Y-Labyrinth gemessen. Verschiedene appetitiv, z. B. durch Futter oder gesüßte Flüssigkeiten, motivierte operante Konditionierungsparadigmen kommen hier zum Einsatz. Besonders interessant sind in diesem Zusammenhang auch der *social discrimination*-Test, bei dem untersucht wird, wie gut sich eine Maus an einen erst vor Kurzem kennengelernten Artgenossen erinnert, und verschiedene Objekterkennungsparadigmen (Abb. 3, [7]).

Ausblick

Einer der Vorteile von Verhaltensphänotypisierung ist ihre breite Anwendbarkeit auf verschiedene wissenschaftliche Fragestellungen, bei denen *in vivo*-Analysen unerlässlich sind, von der Suche nach neuen Wirkstoffen bis zur funktionellen Genomik. Sowohl in pharmakologischen als auch in genetischen Studien ist sie nützlich, um die biologische Relevanz von

Effekten zu überprüfen. Ein großer Teil der verwendeten Methoden ist nicht-invasiv und stellt eine geringe Belastung für die Tiere dar, wodurch ihre Anwendung auch zum Tierschutzziel *refinement* (Verfeinerung von Tierversuchen) beiträgt. Im besonderen Maße tragen dazu jene Großprojekte bei, in denen die Verhaltensphänotypisierung mit vielen anderen physiologischen und molekularbiologischen Analysemethoden kombiniert wird, um so viele Informationen wie möglich von jedem Tier zu gewinnen [4, 11]. Diese Phänotypisierungsergebnisse werden digital frei zur Verfügung gestellt (www.mousephenotype.org, www.mouseclinic.de). ■

Literatur

- [1] Whiteford HA, Ferrari AJ, Degenhardt L et al. (2015) The global burden of mental, neurological and substance use disorders: an analysis from the global burden of disease study 2010. *PLoS One* 10:e0116820
- [2] Nadeau JH, Balling R, Barsh G et al. (2001) Sequence interpretation. Functional annotation of mouse genome sequences. *Science* 291:1251–1255
- [3] Wurst W, de Angelis MH (2010) Systematic phenotyping of mouse mutants. *Nat Biotechnol* 28:684–685
- [4] Brown SD, Moore MW (2012) Towards an encyclopaedia of mammalian gene function: the International Mouse Phenotyping Consortium. *Dis Model Mech* 5:289–292
- [5] Gondo Y (2008) Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. *Nat Rev Genet* 9:803–810
- [6] Fuchs H, Gailus-Durner V, Adler T et al. (2011) Mouse phenotyping. *Methods* 53:120–135
- [7] Hölter SM, Garrett L, Einicke J et al. (2015) Assessing cognition in mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 5:331–358
- [8] Gottesman II, Gould TD (2003) The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions. *Am J Psychiatry* 160:636–645
- [9] Hölter SM, Einicke J, Sperling B et al. (2015) Tests for anxiety-related behavior in mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 5:291–309
- [10] Zimprich A, Garrett L, Deussing JM et al. (2014) A robust and reliable non-invasive test for stress reactivity in mice. *Front Behav Neurosci* 8:125
- [11] Hrabe de Angelis M, Nicholson G, Selloum M et al. (2015) Analysis of mammalian gene function through broad-based phenotypic screens across a consortium of mouse clinics. *Nat Genet* 47:969–978

Korrespondenzadresse:

Dr. Sabine M. Hölter
Institut für Entwicklungsgenetik
Helmholtz Zentrum München
Ingolstädter Landstraße 1
D-85764 Neuherberg
Tel.: 089-3187-3674
Fax: 089-3187-3099
hoelter@helmholtz-muenchen.de

AUTORIN



Sabine M. Hölter

Studium der Biologie und der Experimentellen Psychologie an der Universität Tübingen und an der University of Sussex, Brighton, UK. 1998 Promotion in Biologie an der Universität Tübingen. 1998–2001 Postdoc am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München. Seit 2001 Aufbau und Leitung des Verhaltensscreens der Deutschen Mauslinik am Helmholtz Zentrum München, Neuherberg.