

Aus der Klinik für Neurologie
(Direktor: Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Pharmakologische Inhibition von Rho-Kinase
im Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose**

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
René Günther
aus
Karl-Marx-Stadt
Göttingen 2014

D e k a n: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Lingor

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. W. Sereda

Promotor: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2015

I. Abkürzungsverzeichnis	VI
II. Abbildungsverzeichnis	VIII
III. Tabellenverzeichnis	X
1 Einleitung	1
1.1 Amyotrophe Lateralsklerose	1
1.1.1 Begrifflichkeit und Definition	1
1.1.2 Klinik, Verlauf und Prognose	2
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Ätiologie	5
1.1.6 Pathogenese	7
1.1.7 Aktuelle pharmakologische Therapie	11
1.2 Das <i>High-copy</i> -B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J-Mausmodell	11
1.2.1 Genetischer Hintergrund	11
1.2.2 Klinisch-funktionelles und pathomorphologisches Erscheinungsbild	12
1.3 ROCK-Inhibition – eine neue Therapiestrategie	15
1.3.1 Rho-Rock-Signalkaskade	15
1.3.2 ROCK-Inhibitoren	16
1.3.3 Neurophysiologische Rolle von ROCK und Hypothesen zur Neuroprotektion durch ROCK-Inhibitoren mit Bezug zur ALS	17
1.3.3.1 Axonale Plastizität und neurozelluläres Überleben	17
1.3.3.2 Proteinaggregation	22
1.4 Zielsetzung der Arbeit	24
2 Material und Methoden	27
2.1 Standardmaterialien	27
2.2 Experimentdesign	29

2.3 Tierzucht und Tierhaltung-----	29
2.4 Genotypisierung der SOD1-G93A-Punktmutation-----	30
2.5 Versuchsgruppen-----	32
2.5.1 Therapeutische Behandlung und Versuchsgruppenübersicht -----	32
2.5.2 Versuchsgruppen in einer Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil -----	34
2.5.3 Versuchsgruppen der präsymptomatischen Behandlung mit Y-27632 -----	34
2.5.4 Versuchsgruppen der symptomatischen Behandlung mit Fasudil -----	34
2.5.5 Versuchstiere zur Methodenetablierung -----	35
2.6 Klinische Analyse des SOD1-G93A-Mausmodells-----	35
2.6.1 Analyse des Krankheitsverlaufs, Versuchsabbruch und Überlebensanalyse-----	35
2.6.2 Körpergewicht-----	36
2.6.3 Motorische Verhaltenstestungen-----	37
2.6.3.1 Gitterhängeversuch (<i>hanging wire</i>) -----	37
2.6.3.2 Drehwalzentest (<i>rotarod</i>)-----	38
2.6.4 Statistische Auswertung der klinischen Parameter-----	40
2.7 Histomorphologische und elektrophysiologische Evaluation nach präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil-----	41
2.7.1 Perfusion der Versuchstiere -----	41
2.7.2 Allgemeines Procedere der Gewebepräparation -----	41
2.7.3 Darstellung und Analyse der axonalen Strukturen im Nervus ischiadicus-----	42
2.7.3.1 Präparation des Nervus ischiadicus-----	42
2.7.3.2 Fixierung und Einbettung des Nervus-ischiadicus-Gewebepräparates-----	43
2.7.3.3 Nervus ischiadicus – Gewebeaufbereitung und Myelinscheidenfärbung-----	43
2.7.3.4 Mikroskopie und Auswertung der histomorphologischen Analyse im Nervus ischiadicus-----	44

2.7.4 Analyse der motorischen Endplatten und die Bestimmung der Muskelatrophie im Musculus gastrocnemius-----	46
2.7.4.1 Präparation des Musculus gastrocnemius -----	46
2.7.4.2 Bestimmung der Muskelatrophie anhand des Musculus gastrocnemius -----	47
2.7.4.3 Gewebeaufbereitung und Darstellung der motorischen Endplatten -----	47
2.7.4.4 Mikroskopie und Analyse der motorischen Endplatteninnervation -----	49
2.7.5 Darstellung und Analyse der α -Motoneurone im Rückenmarkspräparat -----	50
2.7.5.1 Rückenmarkspräparation -----	50
2.7.5.2 Gewebeaufbereitung und Darstellung der α -Motoneurone-----	51
2.7.5.3 Mikroskopie und Auswertung der Motoneurone -----	53
2.7.6 Elektrophysiologische Untersuchungen am SOD1-G93A-Mausmodell -----	55
2.7.6.1 Anästhesie-----	55
2.7.6.2 Ablauf der elektrophysiologischen Untersuchung -----	55
2.7.7 Statistische Auswertung der histomorphologisch und elektrophysiologisch erhobenen Daten -----	56
3 Ergebnisse-----	57
3.1 Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil-----	57
3.1.1 Degenerative Veränderungen der Motoneurone im Rückenmarkvorderhorn -----	57
3.1.2 Muskelatrophie und Innervationsprofil der motorischen Endplatten-----	60
3.1.3 Degenerative Veränderungen im Nervus ischiadicus -----	62
3.1.3.1 Progredienter Verlust der Axonanzahl im SOD1-G93A-Mausmodell -----	62
3.1.3.2 Histomorphologische Analyse des Nervus ischiadicus in der Querschnittstudie -----	63
3.1.4 Elektroneurographische Untersuchung -----	66
3.1.4.1 Elektroneurographische Vorversuche-----	66
3.1.4.2 Elektroneurographische Ergebnisse in der Querschnittstudie -----	68

3.2 Präsymptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 -----	70
3.2.1 Gewichtsanalyse-----	70
3.2.1.1 Gewichtsanalyse der Weibchen -----	70
3.2.1.2 Gewichtsanalyse der Männchen -----	72
3.2.2 Motorische Verhaltensanalyse -----	74
3.2.2.1 Motorische Verhaltensanalyse der Weibchen -----	74
3.2.2.2 Motorische Verhaltensanalyse der Männchen -----	75
3.2.3 Überlebensanalyse -----	76
3.2.4 Krankheitsverlauf-----	77
3.2.4.1 Krankheitsverlauf der Weibchen -----	77
3.2.4.2 Krankheitsverlauf der Männchen -----	78
3.3 Symptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil -----	79
3.3.1 Gewichtsanalyse-----	79
3.3.1.1 Gewichtsanalyse der Weibchen -----	79
3.3.1.2 Gewichtsanalyse der Männchen -----	81
3.3.2 Motorische Verhaltensanalyse -----	83
3.3.2.1 <i>Rotarod</i> -Verhaltensanalyse der Weibchen -----	83
3.3.2.2 <i>Rotarod</i> -Verhaltensanalyse der Männchen-----	83
3.3.3 Überlebensanalyse -----	85
3.3.4 Krankheitsverlauf-----	86
3.3.4.1 Krankheitsverlauf der Weibchen -----	86
3.3.4.2 Krankheitsverlauf der Männchen -----	87
4 Diskussion -----	88
4.1 Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil -----	88
4.1.1 Milde neuroprotektive Effekte auf Ebene der Motoneurone im ZNS -----	88

4.1.2 Kein Einfluss auf degenerative Veränderungen im PNS -----	91
4.1.3 Modulation von Gliazellen -----	94
4.2 Präsymptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 -----	95
4.2.1 Verträglichkeit von Y-27632 -----	95
4.2.2 Präsymptomatische Behandlung mit Y-27632 verlängert den Erhalt der Motor- koordination -----	95
4.3 Symptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil -----	98
4.3.1 Verträglichkeit von Fasudil -----	98
4.3.2 Symptomatische Fasudilbehandlung verlängert den Erhalt der Motorkoordination in der männlichen Behandlungskohorte -----	99
5 Zusammenfassung -----	103
6 Literaturverzeichnis-----	105

I. Abkürzungsverzeichnis

ALS	-	Amyotrophe Lateralsklerose
BSA	-	<i>bovine serum albumin</i>
ChAT	-	Cholin-Acetyl-Transferase
dmL	-	distal-motorische Latenz
EAAT-2	-	<i>excitatory amino acid transporter 2</i>
ER	-	endoplasmatisches Retikulum
fALS	-	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose
fALS1	-	familiäre Amyotrophe Lateralsklerose Typ 1
FTD	-	Frontotemporale Demenz
FUS	-	<i>fused in sarcoma</i>
GAPs	-	<i>GTPase activating proteins</i>
GDI	-	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
GDP	-	Guanosindiphosphat
GEFs	-	<i>guanine nucleotide exchange factors</i>
GTP	-	Guanosintriphosphat
IPC	-	<i>insoluble protein complexes</i>
MAG	-	<i>myelin-associated glycoprotein</i>
MLC	-	<i>myosin light chain</i>
MND	-	<i>Motoneuron disease</i>
MPTP	-	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
MSAP	-	Muskelsummenaktionspotential
mNLG	-	motorische Nervenleitgeschwindigkeit
NCI	-	<i>neuronal cytoplasmatic inclusions</i>
NF-M	-	Neurofilament-M
OMgp	-	<i>oligodendrocyte-myelin-glycoprotein</i>
PBS	-	<i>phosphate buffered solution</i>
PFA	-	Paraformaldehyd
PH-Domäne	-	Pleckstrin-homologe-Domäne
PLS	-	Primäre Lateralsklerose

PTEN	-	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
RBD	-	<i>Rho binding domain</i>
ROCK	-	Rho-Kinase
sALS	-	sporadische Amyotrophe Lateralsklerose
SMA	-	Spinale Muskelatrophie
SOD1	-	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase-1
Stdf	-	Standardfehler
TDP 43	-	<i>TAR-DNA-binding protein-43</i>
UPS	-	Ubiquitin-Proteasom-System
VACht	-	<i>vesicular acetylcholine transporter</i>
ZTE	-	Zentrale Tiereinheit

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pathomechanismen der ALS	10
Abbildung 2 Zeitlicher Verlauf der klinischen und neuropathologischen Veränderungen im <i>high-copy-SOD1G93A-Mausmodell</i>	14
Abbildung 3 Aktivierung des Rho-ROCK-Signalweges mit Folge einer Unterdrückung des <i>axonalen Wachstums und des Zellüberlebens</i>	20
Abbildung 4 ROCK-Inhibition verlängert das Überleben und verbessert die motorischen <i>Fähigkeiten nach präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil</i>	25
Abbildung 5 Genotypisierung der SOD1-G93A-transgenen Tiere.....	32
Abbildung 6 Testapparaturen.....	39
Abbildung 7 Präparation des Nervus ischiadicus.....	42
Abbildung 8 Automatisierte Auswahl und Berechnung der Axoplasma-Fläche mit dem Image- <i>J-Programm</i>	46
Abbildung 9 Immunhistochemische Darstellung der motorischen Endplatte	49
Abbildung 10 Präparation des Rückenmarks.....	51
Abbildung 11 Auswertung der ChAT-Färbung.	54
Abbildung 12 Degenerative Veränderungen der Motoneurone in der Querschnittanalyse....	59
Abbildung 13 Muskelatrophie im Musculus gastrocnemius in der Querschnittanalyse	60
Abbildung 14 Innervationsprofil im Musculus gastrocnemius in der Querschnittanalyse ...	61
Abbildung 15 Progredienter Verlust der Axonanzahl im SOD1-G93A-Mausmodell	63
Abbildung 16 Histomorphologische Analyse des Nervus ischiadicus in der Querschnittanalyse	65
Abbildung 17 Elektroneurographische Vorversuche.....	67
Abbildung 18 Elektroneurographische Untersuchung in der Querschnittstudie	69
Abbildung 19 Gewichtsanalyse der Weibchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632	71
Abbildung 20 Gewichtsanalyse der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit <i>Y-27632</i>	73
Abbildung 21 Motorische Verhaltensanalyse der Weibchen in der präsymptomatischen <i>Studie mit Y-27632</i>	74

Abbildung 22 <i>Motorische Verhaltensanalyse der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632.....</i>	75
Abbildung 23 <i>Überlebensanalyse in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632.....</i>	76
Abbildung 24 <i>Analyse des Krankheitsverlaufes der Weibchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632.....</i>	77
Abbildung 25 <i>Analyse des Krankheitsverlaufes der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632.....</i>	78
Abbildung 26 <i>Gewichtsanalyse der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil ...</i>	80
Abbildung 27 <i>Gewichtsanalyse der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil ..</i>	82
Abbildung 28 <i>Rotarod-Verhaltensanalyse der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil.....</i>	83
Abbildung 29 <i>Rotarod-Verhaltensanalyse der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil.....</i>	84
Abbildung 30 <i>Überlebensanalyse in der symptomatischen Studie mit Fasudil.....</i>	85
Abbildung 31 <i>Analyse des Krankheitsverlaufes der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil.....</i>	86
Abbildung 32 <i>Analyse des Krankheitsverlaufes der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil.....</i>	87

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 <i>Standardmaterialien</i>	28
Tabelle 2 <i>Experiment- und Versuchsgruppenübersicht</i>	33
Tabelle 3 <i>Übersicht Einbettung des Nervus-ischiadicus-Gewebepräparates</i>	43

1 Einleitung

1.1 Amyotrophe Lateralsklerose

1.1.1 Begrifflichkeit und Definition

Das Krankheitsbild der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) wurde erstmals im Jahr 1869 durch den französischen Pathologen und Neurologen Jean-Martin Charcot beschrieben und zunächst als ‚Charcot’sche Sklerose‘ betitelt (Charcot und Joffroy 1869). In den Vereinigten Staaten von Amerika wird diese Erkrankung nach einem an ALS erkrankten, zu seiner Zeit sehr erfolgreichen Baseball-Spieler, auch als Lou-Gehrig-Syndrom benannt (Cleveland und Rothstein 2001). Die in Deutschland verwendete Bezeichnung Amyotrophe Lateralsklerose setzt sich zusammen aus ‚a-myo-troph‘ und ‚Lateral-sklerose‘ und beschreibt damit die Erkrankung klinisch-pathologisch. ‚A-myo-troph‘ steht für den klinischen Befund der Muskelatrophie und Muskelschwäche. ‚Lateral-Sklerose‘ bezieht sich auf die durch die Glianarbe veränderten Seitenstränge des Rückenmarks, welche in autopsierten Patienten verhärtet zu tasten sind (Rowland und Shneider 2001). Im Weiteren Sinne ist die ALS eine Motoneuronerkrankung, wobei diesem Begriff auch noch andere Erkrankungen subsummiert werden, bei denen eine fortschreitende Degeneration der Motoneurone vorliegt (Rowland und Shneider 2001; Swash und Desai 2000). Die ALS charakterisiert durch die kombinierte Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons (Swash and Desai 2000; Rowland und Shneider 2001; Lücking und Hufschmidt 2006). Eine ausschließliche Degeneration des ersten Motoneurons findet sich bei der sehr seltenen Primären Lateralsklerose (PLS), die als eigenständige Entität kontrovers diskutiert wird (Lücking und Hufschmidt 2006). Tritt eine isolierte Degeneration des zweiten Motoneurons auf, spricht man von einer spinalen Muskelatrophie (SMA), die im Kindesalter nach der Mukoviszidose eine der häufigsten letalen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen darstellt (Lücking und Hufschmidt 2006). Als weitere seltene Unterformen der degenerativen Erkrankungen der Motoneurone werden die familiäre spastische Spinalparalyse und die hereditäre Bulbärparalyse (auch bekannt als Kennedy-Syndrom) angegeben (Lücking und Hufschmidt 2006).

1.1.2 Klinik, Verlauf und Prognose

Die Klinik der ALS definiert sich durch Funktionsstörungen des im motorischen Kortex gelegenen ersten und des bulbär (im Bulbus medullae) oder spinal (in der Medulla spinalis) gelegenen zweiten Motoneurons. Die Schädigung des ersten Motoneurons spiegelt sich klinisch in Hyperreflexie, Myoklonus, Spastik und auslösbaren Pyramidenbahnzeichen (z. B. Babinski-Reflex), die des zweiten Motoneurons in Muskelschwund, Muskelschwäche und Faszikulationen wider (Rowland und Shneider 2001). Nach dem Erscheinungsbild der zu Beginn der Erkrankung auftretenden Symptomatik werden drei klinische Formen der ALS unterschieden. Der mit 65 % größte Teil der Patienten präsentiert sich mit einer auf die Extremitäten betonten Primärsymptomatik. Davon abzugrenzen sind 30 % der Patienten, welche zu Beginn mit bulbären Funktionsstörungen (z. B. Dysphagie und Dysarthrie) in Erscheinung treten. In 5 % der Fälle manifestiert sich die Erkrankung schon zu Beginn mit respiratorischen Störungen (Hardiman et al. 2011). Ein bulbärer Beginn, Schwäche der Atemmuskulatur und ein höheres Alter bei Erkrankungsbeginn gelten als negative Prognosefaktoren und gehen mit einer kürzeren Lebenserwartung einher (Talbot 2002; Logroscino et al. 2008). Trotz anfänglich lokalisierter Primärsymptomatik breitet sich die Klinik der ALS im Krankheitsverlauf weiter aus. Die meisten Patienten entwickeln Schluckstörungen mit konsekutiven Ernährungsstörungen, Gewichtsverlust und allgemeiner Schwäche. Die hinzukommende Insuffizienz der Atemmuskulatur führt unweigerlich initial zu einer Belastungsdyspnoe und später zur Ruhedyspnoe. Die letztendlich progrediente Hypoventilation mit reflektorischer Hyperkapnie endet letal (Kiernan et al. 2011). Einige der Patienten versterben jedoch auch unerwartet plötzlich an Herzversagen, Lungenembolien oder anderen Begleiterkrankungen, noch bevor die Atemnot zum Tode führt (Talbot 2002). Obwohl bei weit fortgeschrittener Erkrankung nahezu die komplette Willkürmotorik ausgefallen ist, gibt es interessanterweise muskuläre Regionen, welche bis zum Schluss von der Erkrankung verschont werden. Hierzu gehören beispielsweise Motoneuronansammlungen, die die Augenbewegung und die Sphinkteren der Ausscheidungsorgane steuern (Kanning et al. 2010). Neben dem fortschreitenden Verlust der motorischen Fähigkeiten werden bei ALS Patienten auch kognitive Einschränkungen beschrieben und nachgewiesen (Strong 2008). Schätzungen über die Häufigkeit von dementiellen Erkrankungen bei ALS-Patienten reichen von 3 bis 52 % (Strong 2008). Hierbei handelt es sich

häufig um die Form der frontotemporalen Demenz (FTD), bei der es durch degenerative Atrophien des frontalen und temporalen Hirnlappens zu Persönlichkeitsveränderungen mit einem gestörtem Sozialverhalten, interpersonellen Verhaltensauffälligkeiten und Affektverflachung kommt. Zudem können Störungen der Sprache und des Sprachverständnisses in Erscheinung treten (Strong et al. 2009). Das Auftreten einer FTD stellt ebenfalls einen negativen prognostischen Faktor dar (Chiò et al. 2009). Die ALS ist in ihrer Prognose stets infaust, wobei die Überlebenszeit variieren kann. Rund die Hälfte der Patienten versterben 30 Monate nach Symptombeginn und gerade einmal 15 - 20 % sind nach 5 Jahren noch am Leben. Lediglich ein kleiner Prozentsatz überlebt 10 Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome (Talbot 2002).

1.1.3 Epidemiologie

Die Inzidenz der ALS wird auf 2-3/100.000 pro Jahr geschätzt und ist weltweit gleich verteilt (Yoshida et al. 1986; Logroscino et al. 2010). Die Inzidenz ist für Männer (3,0/100.000) etwas höher als für Frauen (2,4/100.000) (Logroscino et al. 2010), obwohl hierbei zu erwähnen ist, dass keine geschlechterspezifischen Unterschiede bezüglich der Inzidenzen hereditärer Formen existieren (Kiernan et al. 2011). Das mediane Erkrankungsalter liegt für Männer bei 65,2 Jahren und für Frauen bei 67,0 Jahren, damit gilt die ALS als eine Erkrankung des höheren Lebensalters (Logroscino et al. 2010).

Eine epidemiologische Ausnahme bildete die südpazifische Insel Guam, auf der eine Endemie von ALS und des Parkinson-Demenz-Komplexes 1945 erstmals beschrieben wurde. 1954 wurde von dem Epidemiologen Kurland und dem Neurologen Mulder eine 100-fach höhere Inzidenz für ALS Erkrankungen bei den Ureinwohnern (Chamorros) im Vergleich zur restlichen Welt festgestellt. Zudem war hier eine sehr hohe Prävalenz familiärer Häufungen der ALS aufgefallen. Der Grund für diese Häufung ist bis heute nicht geklärt. Bei gleichbleibend hohen Inzidenzen für den Parkinson-Demenz-Komplex sind mittlerweile die Inzidenzen für ALS auf der Insel Guam interessanterweise wieder auf ein mit der Weltbevölkerung vergleichbares Niveau gesunken (Lee 2011).

1.1.4 Diagnostik

Bis dato existieren keine etablierten ALS-spezifischen Tests oder Biomarker anhand derer eine definitive Diagnose gestellt werden könnte. Aus diesem Grund gilt die Erkrankung als eine klinische Ausschlussdiagnose. Die Kombination aus klinischer Untersuchung, Krankheitsverlauf und dem Ausschluss anderer Erkrankungen mit Hilfe von apparativer und laborchemischer Diagnostik führen schließlich zur Diagnosestellung (Hardiman et al. 2011). Dabei ist es maßgeblich, dass die Kombination aus den degenerativen Veränderungen des zweiten Motoneurons mit Hilfe klinischer, elektrophysiologischer und/oder neuropathologischer Untersuchungen und des ersten Motoneurons durch klinische und elektrophysiologische Befunde nachzuweisen ist. Mit Hilfe von Zusatzdiagnostik wie Magnetresonanztomographie, Laboruntersuchungen und/oder Elektrophysiologie müssen Differenzialdiagnosen, wie motorische Neuropathien, mechanische Nerven-/Myelonkompression, entzündliche Ursachen oder primäre Muskelerkrankungen ausgeschlossen werden (Körner et al. 2011a). Diese Kriterien wurden bereits 1994 ausführlich in den *El-Escorial*-Diagnosekriterien für wissenschaftliche und klinische Versuchsstudien formuliert und 1998 als *Airlie-House*-Kriterien revidiert (Brooks 1994; Brooks et al. 2000). Im Jahr 2008 konnten diese durch die Erhöhung der Wertigkeit der Elektrophysiologie zur Diagnosestellung in den *Awaji-Shima*-Kriterien noch verbessert werden (Carvalho et al. 2008; Costa et al. 2012).

Bei den elektrophysiologischen Untersuchungen spielt die Elektromyographie als sehr sensitiver Indikator die wichtigste Rolle. Da das kompensatorische Aussprossen peripherer, überlebender Motoneuronaxone zu einer Verschleierung der Klinik führt, kann durch Visualisierung der Denervierung mittels Elektromyographie, noch vor Progression der Erkrankung, die Diagnose gesichert werden (Körner et al. 2011b). In der Elektroneurographie können sich Muskelsummenaktionspotentiale (MSAP) mit reduzierten Amplituden zeigen, wohingegen Leitungsblöcke eher für ein peripheres Engpasssyndrom (z. B. Sulcus Ulnaris Syndrom) oder eine multifokale motorische Neuropathie (MMN) sprechen würden. Da sich bei der ALS nahezu keine Sensibilitätsstörungen finden, stellt die Elektroneurographie differentialdiagnostisch auch eine feste Größe zum Ausschluss einer Polyneuropathie dar (Körner et al. 2011a).

1.1.5 Ätiologie

Die Ätiologie und Pathogenese der ALS ist trotz intensiver Forschungsbemühungen zu großen Teilen weiterhin ungeklärt. Lediglich circa 10 % der Fälle lassen sich auf genetische Mutationen mit familiärer Häufung zurückführen (van Damme und Robberecht 2013). Der Hauptanteil der ALS-Erkrankungsfälle zeigt jedoch keine familiäre Häufung und wird daher als sporadische Form (sALS) bezeichnet (Cleveland und Rothstein 2001; Lücking und Hufschmidt 2006). Ein Fünftel der familiären Formen (fALS) haben ihren Ursprung in einer autosomal-dominant vererbten Mutation des Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase-1-Gens (SOD1) auf dem Chromosom 21q22, welche zugleich als erste Genmutation der fALS bekannt wurde (fALS1) (Rosen 1993; Cleveland und Rothstein 2001). Die SOD1-Mutationen galten bis vor Kurzem als häufigste Form der fALS. Mit der Entdeckung der C9ORF72-Mutation 2011, die nun mit circa 40-50 % der fALS in Verbindung gebracht wird, rutscht die SOD1-Mutante auf den zweiten Rang der Häufigkeit der fALS (Robberecht und Philips 2013). Interessanterweise wurde die C9ORF72-Mutante nicht ausschließlich in fALS, sondern auch in 25 % von FTD und schätzungsweise in 50-70 % der mit FTD assoziierten ALS gefunden (DeJesus-Hernandez et al. 2011; Renton et al. 2011; Robberecht und Philips 2013). Die zu Grunde liegende Pathogenese ist bislang nicht bekannt.

Neben den mit Abstand häufigsten SOD1- und C9ORF72-Mutationen existieren eine Reihe weiterer Mutationen, die sich bei bestimmten Fällen von fALS identifizieren lassen. Insgesamt sind bisher über 20 Genloci bekannt (Robberecht und Philips 2013). Zu den vergleichsweise deutlich selteneren Varianten gehören unter anderem die Genmutationen der Proteinprodukte Alsin, Senataxin, *vesicle associated membrane protein B* (VAPB), Angiogenin, Optineurin, *TAR DNA binding protein* (TARDBP/TDP-43) und *fused in sarcoma* (FUS) (Ince et al. 2011). Ein typisches gemeinsames Charakteristikum der sALS und der fALS sind die in degenerierenden Motoneuronen vorhandenen *neuronal cytoplasmatic inclusions* (NCI), welche aus ubiquitinierten unlöslichen Proteinen bestehen (Leigh et al. 1991; Ince et al. 1998; Mackenzie et al. 2007). Die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen ist ein gemeinsames Charakteristikum von neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, der Chorea Huntington oder dem Morbus Alzheimer und findet sich auch bei der ALS (Forman et al. 2004). Die krankheitsspezifischen pathologischen Proteine wie α -Synuclein bei Parkinson, Huntingtin bei Chorea Huntington und *neurofibrillary tangles* bei

der Alzheimer-Erkrankung wurden bereits identifiziert (Mackenzie et al. 2010). Bei der fALS1 lassen sich intrazelluläre SOD1-Aggregat-Einschlüsse in Motoneuronen und Gliazellen finden. Im Gegensatz dazu blieb die Identifizierung von SOD1-Proteinaggregationen bei der sALS aus (Forman et al. 2004). Folglich schien naheliegend, dass insbesondere bei der sALS andere Proteine eine Rolle spielen könnten. Besondere Aufmerksamkeit gilt daher der kürzlichen Entdeckung der Mutationen in dem Protein TDP-43 in nahezu allen Fällen von SOD1-negativer fALS und dem Protein FUS in Fällen TDP-43-negativer und SOD1-negativer fALS (Neumann et al. 2006; Mackenzie et al. 2007; Kwiatkowski et al. 2009; Vance et al. 2009). Die Mutationen dieser Proteine werden für je 4 % der fALS-Fälle verantwortlich gemacht (Mackenzie et al. 2010). Von noch größerem Interesse ist jedoch, dass nicht nur in nahezu allen Fällen SOD1-negativer fALS, sondern auch in den bisher untersuchten Fällen von sALS, TDP-43 als pathologisches Protein in den NCI identifiziert wurde (Neumann et al. 2006; Mackenzie et al. 2007; Mackenzie et al. 2010). Die physiologische Funktion von TDP-43 liegt in der Regulation von Transkriptions- und *Splicing*prozessen. Darüber hinaus werden diesem Protein Funktionen bei der Apoptose, der Zellteilung und der RNA-Interaktion zugeschrieben. Welche Rolle die Pathologie der TDP-43-Genmutation spielt, ist bislang allerdings noch unklar und wird aktuell intensiv erforscht. Dennoch legt eine Hypothese nahe, dass es bei reduzierter physiologischer Funktion des TDP-43-Proteins (*loss of function*) zu morphologischen Zellkerndefekten, Zellzyklusstörungen, einem erhöhten Zelltod und gestörtem Neuritenwachstum kommen kann (Mackenzie et al. 2010). Auch die Rolle von FUS in der normalen Zellfunktion sowie in der pathologischen Form ist nicht bis ins Detail geklärt. Es scheint aber in der Zellproliferation, DNA-Reparatur, Transkriptionsregulation und RNA-Interaktion eine wichtige Rolle zu spielen (Mackenzie et al. 2010).

Neuere Studien deckten weitere Mutationen in bisher unklaren Fällen von fALS auf. Mutationen im Ubiquilin-2-Gen (UBQLN2) führen zu einer gestörten Regulation im Abbau von ubiquitinierten Proteinen und konnten für die X-chromosomal-dominante Form der fALS nachgewiesen werden. Interessanterweise finden sich in den für die ALS typischen Ubiquitin-positiven-Zelleinschlüssen hierbei nicht nur Ubiquilin-Protein-Aggregate, sondern auch Aggregate von bekannten Proteinen wie FUS und TDP-43, die auch in anderen Formen der ALS gefunden werden. SOD1-Aggregate wurden nicht nachgewiesen. Zudem zeigt eine weitere Analyse, dass sich in den Ubiquitin-positiven-Einschlüssen in Rückenmarksproben

aus sALS-Patienten auch Ubiquilin-2-Aggregate finden (Deng et al. 2011). In einer weiteren, erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung wurden Mutationen im Profilin-1-Gen als eine weitere Ursache für 1 bis 2 % der fALS-Fälle gefunden (Wu et al. 2012). Das Profilin-1-Protein ist ein bekannter Regulator des Aktin-Myosin-Zytoskelettes und dessen Isoform Profilin-2 spielt eine wesentliche Rolle in der Pathologie der ALS-verwandten Erkrankung SMA (Suetsugu 1998; Bowerman et al. 2007). Im Gegensatz zur Ubiquilin-Mutation konnte jedoch das Profilin-Protein in den Ubiquitin-positiven-Einschlüssen in humanen sALS-Rückenmark-Proben nicht nachgewiesen werden (Wu et al. 2012).

1.1.6 Pathogenese

Das klinische Erscheinungsbild der familiären und der sporadischen Form unterscheidet sich nicht wesentlich voneinander, daher dient die Erforschung der familiären Form auch mit Hilfe von Tiermodellen bis heute als eine wichtige Grundlage, um tiefere Einblicke in die Pathologie der ALS zu erhalten (Bruijn et al. 2004). In einer erst kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnte gezeigt werden, dass sich der humane, klinische Phänotyp der fALS1 und die sALS stark ähneln (Synofzik et al. 2010). Diese spezielle Genmutation war 1994 die Grundlage für die Etablierung des SOD1-G93A-Mausmodelles, welches an Position 93 der Aminosäuresequenz einen Austausch der Aminosäure Glycin gegen Alanin aufweist (Gurney et al. 1994). Ähnlich dem humanen Krankheitsbild entwickeln die Tiere muskuläre Lähmungserscheinungen infolge eines Untergangs der Motoneurone und versterben nach einem schnell progressiven Krankheitsverlauf innerhalb von 4-5 Monaten (siehe Kapitel 1.2) (Turner and Talbot 2008). Durch die Modellierung der humanen ALS stellt das SOD1-G93A-Mausmodell eine Möglichkeit zur Analyse der ALS Pathomechanismen dar.

Die SOD1 ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym, das die Umwandlung von toxischen Superoxiden, die bei der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung entstehen können, in Wasser oder Wasserstoffperoxid katalysiert (Bruijn et al. 2004). Anfänglich wurde vermutet, dass ein Funktionsverlust (*loss of function*) der Superoxiddismutase zu einer erhöhten Belastung durch Superoxide führt und die Krankheit auslösen kann. Dies konnte jedoch widerlegt werden, da in SOD1-G93A-transgenen Mäusen vielmehr eine normale bis erhöhte Enzymaktivität nachgewiesen werden konnte und auch der genetische *knock-out* oder die Überexpression von Wildtyp-SOD1 den Krankheitsverlauf nicht verändern konnten (Boillée

et al. 2006; Rothstein 2009). Eine weitere Hypothese macht vielmehr die transgenen SOD1-Proteinaggregate für den Untergang der Motoneurone verantwortlich und man spricht daher häufig von einem *gain of toxic function* der SOD1-Mutante (Boillée et al. 2006; Pasinelli und Brown 2006; Bendotti et al. 2012). Ein Hinweis hierfür ist durch die im Krankheitsverlauf zunehmenden Aggregateinschlüsse bei familiären sowie sporadischen Formen gegeben. Ob die Aggregate der Auslöser sind oder nur eine nützliche Absonderung von toxischen Proteinprodukten zum Schutz der Zelle, ist jedoch bisher nicht eindeutig geklärt (Cleveland und Rothstein 2001; Bruijn et al. 2004; Rothstein 2009). Die vorherrschende Meinung ist, dass es einerseits in Folge der *gain of toxic function* der SOD1-Mutante direkt zu einem Funktionsverlust von anderen Proteinen durch Ko-Aggregation kommt. Zum anderen glaubt man, dass die zu bewältigende Masse anfallender Proteinkomplexe zur Überlastung der zellulären Proteindegradationssysteme, der Chaperone und des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) führt. Die konsekutive Anhäufung fehlgefalteter, funktionsgestörter Proteine führt wiederum zur Störung spezifischer Organell-Funktionen, beispielsweise der Mitochondrien, des Golgi-Apparates, des endoplasmatischen Retikulums und der Peroxisomen sowie zu einem gestörten axonalen Transport (Boillée et al. 2006; Pasinelli und Brown 2006; Bendotti et al. 2012).

Des Weiteren wird eine oxidativ-toxische Wirkung durch SOD1-Mutanten und die Glutamat-Exzitotoxizität diskutiert. Letztere diente zur Etablierung eines bis heute gültigen pharmakologisch-therapeutischen Angriffspunktes (siehe Kapitel 1.1.7). Dieser Therapieansatz basierte auf dem Nachweis des Verlustes an Glutamat-Transporter-1 beziehungsweise dem *excitatory-amino-acid-transporter-2* (EAAT-2) auf der Oberfläche von Astrozyten bei ALS-Patienten (Rothstein et al. 1995). Diese Rezeptoren verhindern durch Absorption von Glutamat normalerweise eine überschießende Glutamateinwirkung mit konsekutivem Kalziumeinstrom in die Neurone (siehe Abbildung 1). Die Pathomechanismen dieser seit 1989 beschriebenen Exzitotoxizität sind bis heute nicht vollständig geklärt, jedoch weiß man, dass die Störung der Kalzium-Homöostase eine Schlüsselstellung einnimmt und die Motoneurone aufgrund der geringeren Kalziumpufferkapazität ein besonders vulnerables Ziel darstellen (Heath und Shaw 2002; Lewinski und Keller 2005).

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Pathogenese der ALS ist der Einfluss von Gliazellen. Eine wichtige Zellpopulation stellt die Mikroglia, die ortsspezifischen Makrophagen des zentralen

Nervensystems (ZNS), dar. Deren Hauptaufgabe ist die Initiierung einer ersten Abwehrreaktion bei Infektionen oder Schädigungen im ZNS. Eine weitere, den Gliazellen zugehörige Zellreihe bilden die Astrozyten, welche komplexe Aufgaben, wie zum Beispiel die Regulation von extrazellulären Neurotransmitterkonzentrationen, Aufrechterhaltung der metabolischen und ionischen Homöostase und die Bereitstellung von Wachstumsfaktoren für die benachbarten Neurone übernehmen (Philips und Robberecht 2011). Die Rolle der Gliazellen ist in der Pathogenese der ALS bisher nur unzureichend verstanden. Anhand von Tiermodellen konnte man nachweisen, dass die Anzahl von Astrozyten und aktivierter Mikroglia mit Progression der Erkrankung stetig zunehmen (Hall et al. 1998). Experimente, in denen die mutierte SOD1 selektiv in Motoneuronen, Astrozyten oder Mikroglia exprimiert wurde, konnten überraschenderweise keine oder lediglich eine milde Degeneration der Motoneurone induzieren (Gong et al. 2000; Pramatarova et al. 2001; Beers et al. 2006). Clement et al. (2003) konnten darüber hinaus anhand von chimären Mäusen zeigen, dass die Anwesenheit nicht-neuronaler Zellen vom Wildtyp in einem SOD1-transgenen Mausmodell zu einer deutlichen Verlangsamung der Degeneration der Motoneurone und zu einer Verlängerung des Überlebens führen können (Clement et al. 2003). Hieraus kann abgeleitet werden, dass die die Motoneurone umgebende Glia und andere Zellen eine wichtige Stellung bei der Degeneration der Motoneurone einnehmen (Philips und Robberecht 2011). Diese Pathomechanismen könnten eine Ursache für die typischen pathomorphologischen Veränderungen der ALS sein, die unter dem Begriff *dying back* beschrieben werden. Hierunter wird verstanden, dass die Erkrankung nicht an den Somata der Motoneurone, sondern vielmehr an deren distalen Enden, den motorischen Endplatten und Axonen, beginnt (Fischer und Glass 2007; Dadon-Nachum et al. 2011). Grund dafür könnte vor allem die oben genannte Störung des axonalen Transportes durch sich bildende Proteinkomplexablagerungen darstellen. In der wohl asymmetrischsten Zelle des menschlichen Körpers scheint das teilweise bis über einen Meter lange Axon die vulnerabelste Stelle des Motoneurons zu sein (Dadon-Nachum et al. 2011). Tatsächlich werden im SOD1-G93A-Mausmodell Denervierung der motorischen Endplatten und Degeneration der distalen Axone beobachtet, lange bevor klinische Symptome auftreten oder Motoneurone untergegangen sind (Kong und Xu 1998; Frey et al. 2000; Fischer et al. 2004; Pun et al. 2006).

In Abbildung 1 werden vereinfachend die eben genannten Pathomechanismen der ALS zusammenfassend graphisch dargestellt.

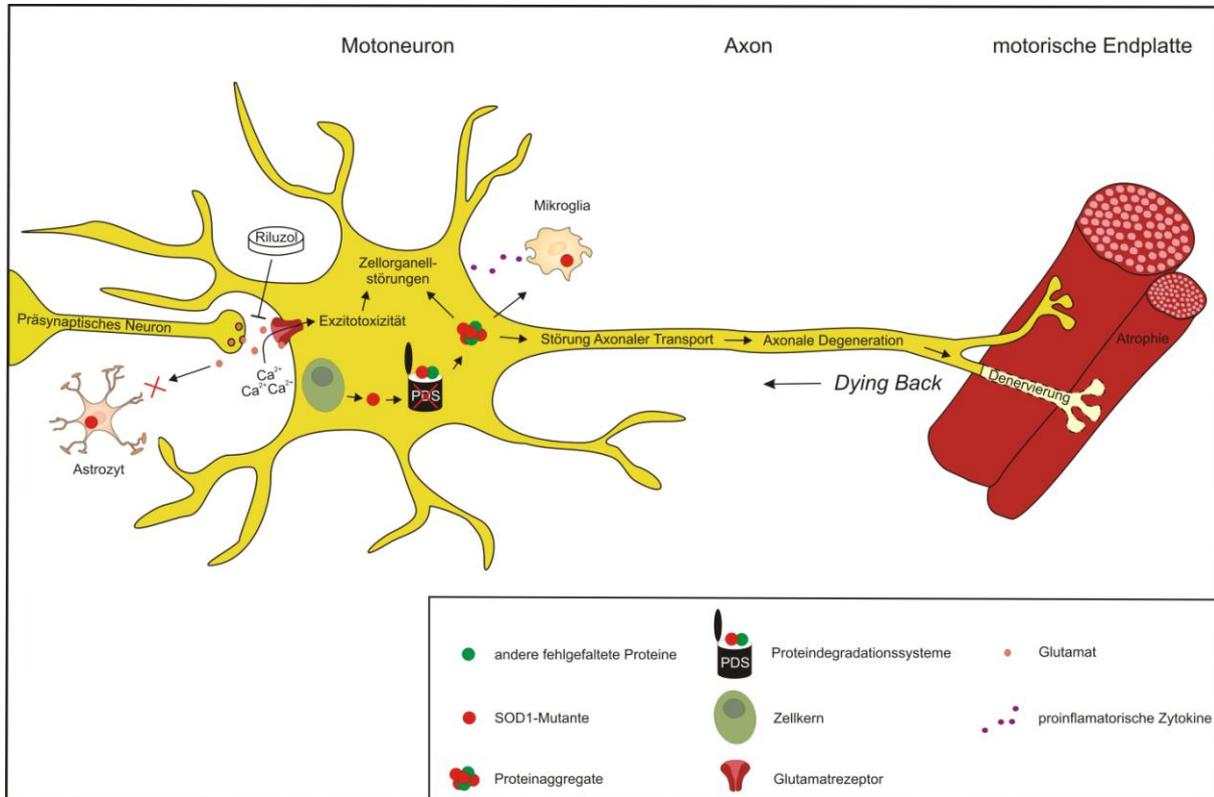


Abbildung 1 Pathomechanismen der ALS

Das Schaubild stellt vereinfachend einige der wichtigsten bisher bekannten pathophysiologischen Wege und gestörten Funktionen des Motoneurons sowie den Einfluss der mutierten Superoxiddismutase (SOD1) dar. Die SOD1-Mutante führt unter anderem zur Störung der Proteindegradationssysteme. Folglich kommt es zur Anhäufung der SOD1-Mutante selbst und anderer fehlgefalteter Proteine. Konsekutiv bilden sich durch deren Akkumulation Proteinaggregate. Die SOD1-Mutante selbst und die Proteinaggregate wiederum stören die Funktionen der Zellorganelle, v.a. der Mitochondrien, des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums sowie den axonalen Transport. Des Weiteren sind extrazelluläre Mechanismen wie die Aktivierung und Dysfunktion von Astrozyten und Mikroglia in die Pathogenese integriert. Die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt ist durch die Verminderung von EAAT2-Rezeptoren an der Oberfläche von Astrozyten gestört, sodass die extrazelluläre Konzentration an Glutamat steigt und eine Exzitotoxizität auf das Motoneuron ausübt. Aufgrund der vulnerablen Kalziumpufferkapazität erhöht sich damit die intrazelluläre freie Kalziumkonzentration. In fortgeschrittenen Krankheitsstadien setzt aktivierte Mikroglia proinflammatorische Zytokine frei, welche sich auf das Motoneuron toxisch auswirken können. Die Störung des axonalen Transports und der Zellorganelle führen zunächst distal zur Denervierung der motorischen Endplatten und zur Degeneration der terminalen Axone mit konsekutiver Atrophie der Muskulatur. Die von distal nach proximal fortschreitenden pathomorphologischen Veränderungen werden unter dem Begriff *dying back* zusammengefasst. Erst am Schluss kommt es zum Untergang der Motoneurone. Riluzol, die bisher einzige zugelassene pharmakologische Therapie, reduziert die Glutamatfreisetzung aus präsynaptischen Neuronen und erhöht die Wiederaufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt und verringert somit die Exzitotoxizität auf das Motoneuron. Abbildung modifiziert nach Robberecht und Phillips, 2013, Seite 251, mit freundlicher Genehmigung von Nature Publishing Group.

1.1.7 Aktuelle pharmakologische Therapie

Trotz umfangreicher Forschungsbemühungen sind die Therapieoptionen der ALS weiterhin enttäuschend. Neben einer Reihe symptomatischer Therapiemöglichkeiten vermag pharmakologisch allein Riluzol in einer Dosis von 100 mg pro Tag das Überleben um gerade einmal 2 bis 3 Monate zu verlängern und wird daher auch in den deutschen Leitlinien für die Behandlung der ALS empfohlen (Miller et al. 2007; Andersen et al. 2007; Ludolph 2012). Riluzol, 2-amino-6-trifluoromethoxybenzothiazole, reduziert die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt durch Reduktion der präsynaptischen Freisetzung und Aktivierung der Aufnahme in Astrozyten und präsynaptische Nervenendigungen (siehe Abbildung 1) (Cifra et al. 2013). Eine der letzten kürzlich veröffentlichten klinischen Studien fand mit dem Dopamin-Agonisten Dexamipexol statt, welcher sich bereits in Tiermodellen als neuroprotektiv und daher erfolgsversprechend erwiesen hatte (Danzeisen et al. 2006; Corcia und Gordon 2012). Leider konnte auch dieses Medikament nach einer klinischen Phase-III-Studie, bei der man das Überleben, die Lungenfunktion, den Einfluss auf den ALS-Funktions-Score und die Kraftentwicklung untersucht hatte, keine statistisch signifikanten Vorteile für die Patienten erbringen (Cudkowicz et al. 2013). Daher besteht weiterhin eine dringende Notwendigkeit zur Entwicklung einer wirksamen Therapie für die Behandlung der ALS.

1.2 Das *High-copy-B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J*-Mausmodell

1.2.1 Genetischer Hintergrund

Transgene Mausmodelle wie das SOD1-G93A-Mausmodell entstehen durch die Microinjektion von transgener DNS in befruchtete Mauseizellen, welche anschließend in ein scheintragendes Weibchen implantiert werden. Die daraus entstehenden Nachkommen enthalten das transgene Zielgen in ihrem Genom und werden zur Erhaltung eines Mausstammes mit einer anderen Mauslinie verpaart. Das als Goldstandard empfohlene und am häufigsten verwendete Mausmodell in der präklinischen Therapie- und Grundlagenforschung der Amyotrophen Lateralsklerose ist aktuell das SOD1-G93A-Mausmodell (Turner und Talbot 2008; Ludolph et al. 2010). Das ursprünglich von Gurney et al. entwickelte Tiermodell trägt humane Genkopien der Superoxiddismutase mit einer Mutation von Glycin zu Alanin in Codon 93. Das Modell mit 18 Genkopien pro diploidem Genom (Linie G1)

entwickelte dabei die der humanen ALS ähnliche Symptomatik (Gurney et al. 1994). Das durch die Firma Jackson Labs vertriebene Mausmodell B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur, welches in dieser Arbeit Anwendung fand, basiert auf der G1-Linie von Gurney, wobei aber die Menge der transgenen Genkopien nochmals um 40 % auf 25 Kopien pro diploidem Genom (G1H bzw. 1Gur-Linie) erhöht wurde (Chiu et al. 1995; Tu et al. 1996). Auch der Mausstammhintergrund B6SJL von Jackson Laboratories unterscheidet sich hierbei von der ursprünglich benutzten Mauslinie C57BL/6J, welcher durch die Verpaarung von C57BL/6J transgenen Hemizygoten mit Tieren eines SJL/J Hintergrundes entstanden ist.

1.2.2 Klinisch-funktionelles und pathomorphologisches Erscheinungsbild

Klinisch lassen sich SOD1-G93A-transgene Tiere lange Zeit nicht von Wildtyp-Tieren unterscheiden. Insbesondere die Gewichtszunahme entwickelt sich bei beiden Gruppen zunächst unauffällig, erst etwa ab dem Lebenstag 108 stagniert diese und es sind signifikante Unterschiede zu Wildtyp-Tieren messbar (Smittkamp et al. 2008). Erst mit circa 91 Tagen zeigen sich die ersten klinischen Symptome in Form eines Tremors einer oder beider Hinterläufe. Im Verlauf nimmt dieser an Intensität zu und breitet sich auf alle Extremitäten aus. Durch passives Bewegen der betroffenen Extremität kann man einen erhöhten Widerstand, als Ausdruck einer Spastizität, wahrnehmen. Zudem sind bei leichtem Beklopfen der Knie oder Fußknöchel repetitive Reflexbewegungen als Zeichen einer Hyperreflexie oder ein Klonus auslösbar (Chiu et al. 1995). Nach Auftreten der ersten Symptome schreitet die Erkrankung kontinuierlich voran. Leistungsschwäche und Bewegungsstörungen können mit Hilfe von motorischen Verhaltenstests, wie zum Beispiel dem Drehwalzentest (*rotarod*) oder dem Gitterhängetest (*hanging wire*) nachgewiesen werden (Fischer et al. 2004; Smittkamp et al. 2008; Alves et al. 2011). Elektrophysiologische Untersuchungen am Nervus ischiadicus zeigen mit zunehmendem Alter eine Reduktion der MSAP und der motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten (mNLG) (Alves et al. 2011). Die Muskelatrophie betrifft zunächst vor allem die Hinterläufe und führt zu einer Umfangsverminderung im proximalen Bereich der unteren Extremitäten. Das normale Gangbild verwandelt sich in eine Art ‚Watschelangang‘. Mit zunehmender Muskelparese können die Tiere ihr Becken nicht mehr vom Untergrund abheben und ziehen sich mit den Vorderläufen vorwärts. Schlussendlich werden sie immer schwächer und sind nicht mehr in der Lage das Futter zu erreichen oder

sich selbstständig aus der Rücken-/Seitenlage in die Bauchlage zu drehen. In diesem Endstadium erleiden einige der Tiere Augeninfektionen in einem oder beiden Augen aufgrund reduzierter Fellpflege im Kopfbereich, vermutlich aufgrund sich manifestierender Schwäche in den Vorderläufen (Chiu et al. 1995). Unter Berücksichtigung von Tierversuchsabbruchkriterien erreichen die Tiere je nach Studie eine Lebenserwartung von durchschnittlich 130 bis 140 Tagen, mit einer Schwankungsbreite von 102 bis 166 Tagen (Chiu et al. 1995; Heiman-Patterson et al. 2005). Dabei treten Geschlechterunterschiede mit einer durchschnittlich höheren Lebenserwartung bei den Weibchen auf (Heiman-Patterson et al. 2005; Alves et al. 2011). Histomorphologisch lassen sich erste Veränderungen an den motorischen Endplatten der Wadenmuskulatur bereits an Tag 47 beschreiben, lange bevor klinische Symptome auftreten oder Motoneurone untergegangen sind. Ab Tag 80 wird ein Verlust großkalibriger Axone an den ventralen Nervenwurzeln sichtbar und erst ab 100 Tagen sinkt die Anzahl der großen Motoneurone im Vorderhorn signifikant (Fischer et al. 2004; Turner und Talbot 2008). Parallel zum Untergang der motorischen Bahnen nimmt die Anzahl von aktivierten Astrozyten und Mikroglia ab 100 Tagen deutlich zu (Hall et al. 1998). In Abbildung 2 werden die klinisch-pathologischen Veränderungen auf einem Zeitstrahl zusammengefasst (Turner and Talbot 2008).

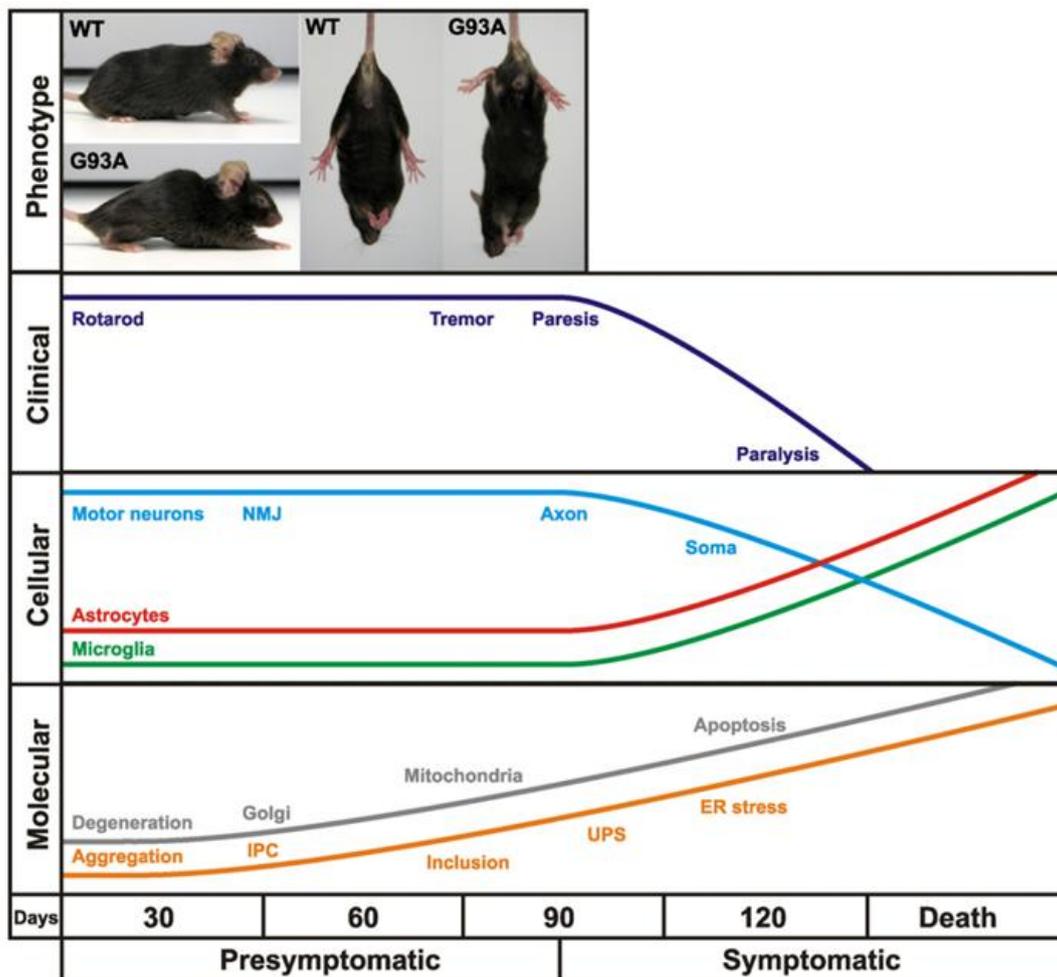


Abbildung 2 Zeitlicher Verlauf der klinischen und neuropathologischen Veränderungen im *high-copy-SOD1G93A*-Mausmodell

Klinisch entwickeln die Tiere nach circa 3 Monaten einen Tremor der Hinterläufe, gefolgt von Schwäche und Gangstörungen. Auf zellulärer Ebene geht der ersten klinischen Symptomatik eine progrediente Degeneration der motorischen Endplatten und der distalen Axone voraus. Nach circa einem weiteren Monat progredienter Erkrankung führt dies zu Muskelparesen bis hin zur vollständigen Lähmung der hinteren Extremitäten. Auf zellulärer Ebene geht dies mit dem zunehmenden Untergang der Motoneuronzellkörper und einem reaktiven Anstieg der Astrozyten sowie der Microglia, einher. Auf molekularer Ebene führt die Akkumulation von mutanter SOD1 zu *insoluble-protein-complexes* (IPC, unlösliche Proteinkomplexe), die zum Teil an *inclusions* (Einschlusskörperchen) erkennbar sind, zur Störung von Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien, UPS, ER und letztendlich zur Induktion von Apoptosemechanismen. Abbildung entnommen aus Turner und Talbot, 2008, Seite 99, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier.

1.3 ROCK-Inhibition – eine neue Therapiestrategie

1.3.1 Rho-Rock-Signalkaskade

G-Proteine sind Signaltransduktoren, die durch Wechsel von einer Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen inaktiven in eine Guanosintriphosphat (GTP)-gebundene aktive Form, eine hormonkodierte Informationsübertragung über die Zellmembran hinweg ermöglichen (Mueller et al. 2005; Rasso et al. 2006). Rho-GTPasen stellen hierbei eine eigenständige Subfamilie der Superfamilie der Ras-zugehörigen kleinen GTPasen (monomere G-Proteine) dar und kommen in allen eukaryoten Zellen vor (Jaffe und Hall 2005). Bekannt geworden sind die Ras-GTPasen durch ihr onkogenes Potential schon vor über 20 Jahren (Sahai und Marshall 2002). Die Aktivierung von Rho-GTPasen wird durch eine Vielzahl an Zelloberflächenrezeptoren wie Zytokinerezeptoren, Tyrosinkinase, Adhäsionsrezeptoren und *G-protein-coupled receptors* (GPCRs) stimuliert. *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und erhöhen damit die Rho-Aktivität. *GTPase activating proteins* (GAPs) stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität und *Guanine nucleotide dissociation inhibitors* (GDIs) unterdrücken den Austausch in die GTP-gebundene aktive Form und führen somit zu einer verminderten Rho-Aktivität (siehe Abbildung 3). Ist die Rho-GTPase aktiviert, beeinflusst diese über weitere Zielproteine eine Reihe an wichtigen Zellprozessen, wie die Aktin-Zytoskelett-Dynamik, Gentranskriptionsregulation, den Zellzyklus und ist damit in die Zellteilung, Adhäsion, Migration, Phagozytose, Neuritenwachstum, Zellmorphologie sowie Zellwachstum und Überleben eingebunden (Kjoller und Hall 1999; Rossman et al. 2005; Schmandke et al. 2007).

Rho-Kinasen (ROCK) sind AGC-Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 160 kDa, welche vor über 15 Jahren als direkte Effektoren der Rho-GTPasen erstmals beschrieben wurden (Matsui et al. 1996). AGC-Kinasen sind eine Subgruppe der Serin-Threonin-Proteinkinase und regulieren ihre spezifischen Proteinsubstrate durch Bindung einer Phosphatgruppe an Serin- oder Threoninaminosäurereste. Einen bekannten Vertreter der AGC-Gruppe stellt die Proteinkinase A dar, welche eine Schlüsselstellung im Glykogenstoffwechsel einnimmt (Pearce et al. 2010). Es werden zwei Isoformen der Rho-Kinasen (ROCK I/II) unterschieden, die anhand ihrer unterschiedlichen gewebespezifischen Verteilung differenzierte Funktionen *in vivo* vermuten lassen (Nakagawa et al. 1996). Während ROCK II vor allem im Hirngewebe und Rückenmark vorkommt, wird ROCK I zumeist in nicht

neuronaalem Gewebe wie Herz, Lunge und Skelettmuskulatur exprimiert (Mueller et al. 2005; Duffy et al. 2009). Bei Rindern wurden die höchsten Konzentrationen von ROCK II in Pyramidenzellen der Großhirnrinde und Hippocampus, sowie in den Purkinjezellen des Cerebellums gefunden. Zudem konnte man eine deutlich höhere Konzentration in der grauen im Vergleich zur weißen Substanz nachweisen (Hashimoto et al. 1999). Strukturell haben beide Kinasen eine katalytische Domäne am N-Terminus, gefolgt von einer *coiled-coil-region* und am C-Terminus des Proteins eine regulatorische Pleckstrin-homologe-Domäne (PH-Domäne) mit cysteinreichen *repeats*. Die *coiled-coil-region* dient der Interaktion mit anderen Proteinen und beinhaltet die *Rho-binding-domain* (RBD). Im inaktiven Zustand bindet die RBD und die PH-Domäne an die Kinase-Region des Proteins und bildet somit einen autoinhibitorischen *loop*. Erst durch Bindung der aktiven Rho-GTPase an die RBD wird die Schleife geöffnet und das Kinase-aktive Zentrum freigelegt. Andere Rho-unabhängige Aktivatoren stellen die Fettsäure Arachidonsäure oder die Apoptose-induzierende Caspase-3 dar (Riento und Ridley 2003). Inhibitoren der Rho-Kinasen sind Rad und Gem, die als Rad-Gem-Kir-Familie eine eigenständige Gruppe kleiner GTPasen darstellen (Ward 2002).

1.3.2 ROCK-Inhibitoren

Fasudil (HA1077) (1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)homopiperazine) und Y-27632 ((1)-(R)-trans-4-(1-aminoethyl)-N-(4-pyridyl)cyclohexanecarboxamidedihydrochloride) gehören zu den am häufigsten genutzten und untersuchten ROCK-Inhibitoren. Beide Substanzen inhibieren beide Isoformen (ROCK I und ROCK II), jedoch zusätzlich mit deutlich weniger Spezifität auch andere Kinasen wie z. B. Proteinkinase A und Lim-Kinase (Lingor et al. 2007). Y-27632 stellt im Gegensatz zu Fasudil einen selektiveren Inhibitor von ROCK II dar (Uehata et al. 1997). Fasudil, ein Isoquinolin-basierender Ligand, und Y-27632, eine Pyridinverbindung, unterscheiden sich in ihrer Struktur deutlich, jedoch erzielen sie ihre inhibitorische Wirkung gleichermaßen über eine kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle von ROCK (Ishizaki et al. 2000; Jacobs et al. 2006). Die Bioverfügbarkeit und die Überwindung der Blut-Hirnschranke von Fasudil und Y-27632 nach oraler Applikation wurde in verschiedenen Tierstudien bereits mehrfach nachgewiesen (Hattori et al. 2004; Li et al. 2009; Bowerman et al. 2010; Bowerman et al. 2012; Tönges et al. 2014). Anfänglich wurde Fasudil aufgrund seines ausgeprägten vasodilatatorischen Effektes durch die Aufhebung der über die *myosin*

light chain (MLC) gesteuerten Kontraktion der glatten Muskelzellen und der Kalzium-antagonisierenden Wirkung zur Verhinderung von cerebralen Ischämien durch Vasospasmen nach Subarachnoidalblutungen untersucht und ist bereits in Japan hierfür klinisch zugelassen (Zhao et al. 2006). Die bisher durchgeführten klinischen Studien stufen Fasudil für diese Indikation als ein sicheres Medikament ohne erwähnenswerte Nebenwirkungen ein (Zhao et al. 2011).

1.3.3 Neurophysiologische Rolle von ROCK und Hypothesen zur Neuroprotektion durch ROCK-Inhibitoren mit Bezug zur ALS

1.3.3.1 Axonale Plastizität und neurozelluläres Überleben

Eine Vielzahl an Effektorproteinen, die durch ROCK phosphoryliert und damit moduliert werden, sind in zahlreichen Publikationen bereits beschrieben. Viele dieser Effektoren regulieren die Zellmorphologie und Zellmotilität, andere sind in Zellzyklus oder Überlebenskaskaden eingebunden (Tönges et al. 2011). Eine der Hauptaufgaben von ROCK ist die Regulation der Aktin-Zytoskelett-Organisation, wodurch eine Reihe wichtiger Funktionen in glatten Gefäßmuskeln, Endothelzellen, hämatologisch-immunologischen Zellen, Neuronen und Gliazellen gesteuert werden (Shin et al. 2008). Einer der hierbei umfangreich studierten Signalwege führt über die Phosphorylierung der *myosin light chain phosphatase* (MLCP) durch ROCK II (Kimura et al. 1996). Die daraus folgende Reduktion der MLCP-Aktivität verhindert die Inaktivierung der aktiven Phosphat-gebundenen MLC. Parallel dazu ist ROCK II, ähnlich wie die *myosin light chain kinase* (MLCK), in der Lage die MLC zur aktiven Form zu phosphorylieren. Die aktive MLC interagiert mit Aktinfilamenten und führt zur Myosin-Aktin-Kontraktion (Amano et al. 1996). Ein anderer wichtiger Weg über den ROCK Einfluss auf das Zytoskelett nimmt, ist die Aktivierung der LIM-Kinase (LIMK). LIMK seinerseits phosphoryliert und inhibiert Cofilin (Maekawa 1999). Cofilin wiederum spielt eine entscheidende Rolle in der Abspaltung von Aktinfilamenten sowie der Depolymerisierung von Aktin und ist somit essentiell für das axonale Wachstum (Ng und Luo 2004). Adducin und ERM-Proteine (Ezrin, Radixin, Moesin), die das Aktinzytoskelett maßgeblich beeinflussen und damit an der Regulation von Zellmotilität und axonalem Wachstum beteiligt sind, stellen weitere Substrate von ROCK dar (Kimura 1998; Matsui et al. 1998). Mikrotubulin-assoziierte-Proteine

wie Tau oder MAP2 verringern ihre Mikrotubuli-Polymerisationsfunktion nach Phosphorylierung durch ROCK. *Collapsin response mediator protein-2* (CRMP2), ein durch ROCK aktiviertes spezifisch neuronales Protein, induziert einen Zusammenfall des axonalen Wachstumskegels und beschränkt somit die Regenerationsfähigkeit des Hirngewebes (Mueller et al. 2005; Schmandke et al. 2007). Darüber hinaus gibt es eine Reihe weiterer ROCK-Substrate, die an der Limitierung axonal-neuronalen Wachstums beteiligt sind. Bei der extrazellulären Initiierung der axonalen Wachstumsrestriktion ist das Myelin ein entscheidender Mediator. Myelingebundene Moleküle wie Nogo-A, *myelin-associated glycoprotein* (MAG), und *oligodendrocyte myelin glycoprotein* (OMgp) vermitteln eine Inhibition von axonalem Auswachsen auch über die Rho-ROCK-Signalkaskade (Mueller et al. 2005; Schmandke et al. 2007; Tönges et al. 2011). Insbesondere für Nogo-A ist die Beteiligung am Zusammenbruch des neuronalen Wachstumskegels, dem *growth cone collapse*, und damit an der Unterbindung des Axonwachstums, nachgewiesen (Prinjha et al. 2000; Fournier et al. 2001; Pernet und Schwab 2012). Hypothetische Therapiekonzepte zur Stimulation axonaler Regeneration durch ROCK-Inhibitoren wurden bereits formuliert und werden intensiv erforscht (siehe Abbildung 3) (Kubo et al. 2008; Tan et al. 2011). Erhöhte Konzentrationen von Nogo-A konnten in der Skelettmuskulatur von ALS-Patienten und in einem SOD1-transgenen Mausmodell nachgewiesen werden (Dupuis et al. 2002). Zudem war eine signifikante Korrelation zwischen Höhe der Nogo-A-Konzentration und der Schwere der Erkrankung erkennbar (Jokic et al. 2005). Die Beteiligung der Nogo-A-vermittelten Unterminierung der axonalen Regeneration konnte in einem kombinierten SOD1-transgenen Mausmodell mit *Nogo-A-knock-out* gezeigt werden. Hiernach zeigte sich ein signifikant längeres Überleben und eine Reduktion der Muskeldenergie. Darüber hinaus konnte durch Überexpression von Nogo-A in Wildtyp-Tieren ein Schwund der Postsynapse und eine Retraktion der terminalen Axone in der Muskulatur beobachtet werden (Jokic et al. 2006). Zudem demonstrieren Experimente in transfizierten neuronalen Zellkulturen mit humaner, mutierter (G93A) SOD1 im Vergleich zur Kontrolle mit humaner Wildtyp-SOD1 ein deutlich reduziertes Neuriten-Auswachsen und eine erhöhte Rate an Zelltod (Takeuchi et al. 2002). In dem unter Kapitel 1.1.5 bereits erwähnten Artikel zur fALS durch Profilin-1-Mutation wird die zugrundeliegende Ursache zum Teil in einer durch Profilin-Mutation-bedingten axonalen Wachstumshemmung gesehen (Wu et al. 2012). Profilin-1 ist unter anderem für seine

Funktion in der Aktin-Polymerisation und damit für seinen Einfluss auf das axonale Auswachsen bekannt (Suetsugu 1998; Wills et al. 1999). In primären Motoneuronzellkulturen, in denen das mutierte Profilin-1-Gen exprimiert wurde, konnte eine deutliche Hemmung des axonalen Wachstums nachgewiesen werden (Wu et al. 2012). ROCK I wiederum scheint direkt über Phosphorylierung von Profilin-1 dessen Funktion zu unterbinden (Shao et al. 2008b).

ROCK ist nicht nur in die axonale Plastizität, sondern auch in das neuronale Überleben eingebunden. Einer der entscheidenden Signalwege führt dabei über die direkte Aktivierung des bekannten Tumorsuppressors *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) durch ROCK (Li et al. 2005; Meili et al. 2005). PTEN unterdrückt über eine Inaktivierung von Akt die Aktivität von mTOR (*mammalian target of rapamycin*), welches selbst einer der bekanntesten Stimulatoren von Proteinbiosynthese und Zellwachstum darstellt (Shi und Wei 2007; Park et al. 2010; Tönges et al. 2011). Darüber hinaus wird dieser durch ROCK stimulierten Kaskade nicht nur der Einfluss auf das neuronale Überleben zugeschrieben, sondern auch eine durch limitierte Proteinsynthese mit konsekutivem Fehlen notwendiger Proteine bedingte Hemmung axonalen Wachstums (Park et al. 2008). Im Zusammenhang mit ALS fand eine andere Arbeitsgruppe heraus, dass bei Suppression von BTBD10, einem Akt-Aktivator, der Untergang von kultivierten Motoneuronen induziert werden kann. Interessanterweise fand man in Motoneuronen von sALS-Patienten und im SOD1-G93A-Mausmodell eine reduzierte Expression von BTBD10 (Nawa et al. 2012). Möglicherweise könnte durch Stimulation von Akt über die ROCK-Inhibition auch in der Pathologie der ALS dem Sterben der Motoneurone entgegen gewirkt werden. Eine weitere, kürzlich erschienene Veröffentlichung untersuchte eine Reihe an Regulatorproteinen im Muskelgewebe von sALS-Patienten und fand heraus, dass eine hohe Konzentration von Akt mit einem längeren Überleben der Patienten positiv korreliert ist (Yin et al. 2012).

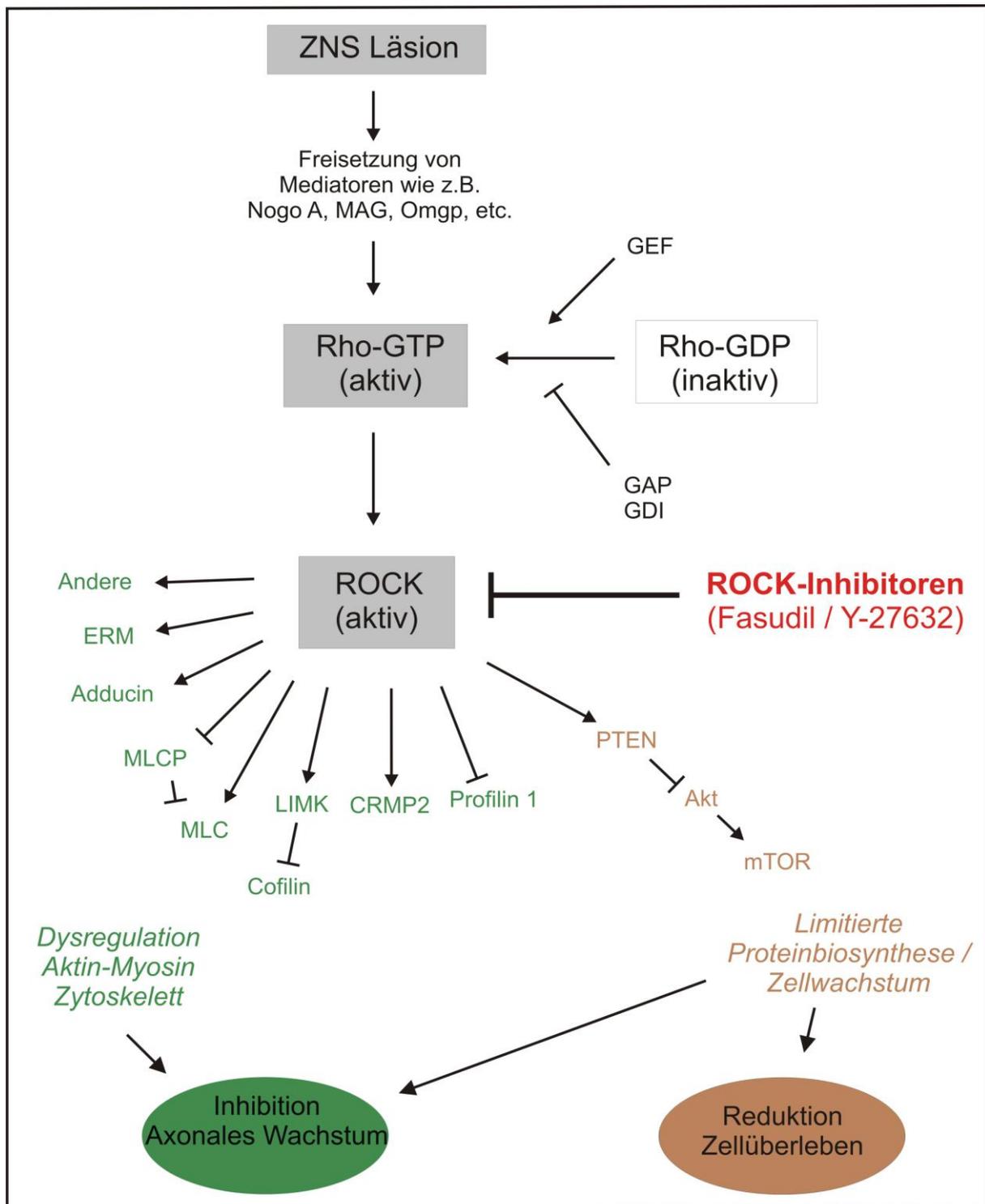


Abbildung 3 Aktivierung des Rho-ROCK-Signalweges mit Folge einer Unterdrückung des axonalen Wachstums und des Zellüberlebens

In Folge einer Schädigung des ZNS werden Mediatoren wie z. B. Nogo A, MAG, Omgp etc. freigesetzt, was zu einer Aktivierung der Rho-GTPase führt und konsekutiv auch zur Aktivierung von ROCK. Die Aktivität der Rho-GTPase ist darüber hinaus durch Regulatoren wie GEFs, GDIs und GAPs reguliert. Die aktivierte ROCK wiederum führt einerseits über viele Signalwege zur Dysregulation des Aktin-Myosin-Zytoskeletts und dadurch zur Inhibition des axonalen Wachstums. Andererseits führt diese zur Limitierung der Proteinbiosynthese und des Zellwachstums, was sich negativ auf das Zellüberleben auswirkt. ROCK-Inhibitoren, wie Fasudil und Y-27632, vermögen eine Unterdrückung der ROCK-Aktivität und können somit in diesen Signalweg eingreifen. Abbildung modifiziert nach Tan et al., 2011, Seite 655 mit freundlicher Genehmigung von International Journal of Ophthalmology.

Aufgrund der genannten Funktionen für axonales Wachstum und neuronales Überleben sieht man in der Inhibition von ROCK ein vielversprechendes therapeutisches Ziel. Das Potential zur Stimulation von Neuritenwachstum und neuronalem Überleben durch ROCK-Inhibitoren konnte *in vitro* anhand von Zellkulturen und *in vivo* in einem Sehnerv-Schädigungs-Modell detailliert belegt werden (Lingor et al. 2007; Bermel et al. 2009). Zahlreiche Studien belegten einen Aktivitätsanstieg des ROCK-Signalweges in Tiermodellen mit Rückenmarkverletzungen. Die hierbei gesetzten Läsionen führen zu einer konsekutiven motorischen Funktionseinschränkung der hinteren Extremität. Durch Inhibition der ROCK-Kaskade konnte eine signifikante Verbesserung der motorischen Fähigkeiten nachgewiesen werden (Hara et al. 2000; Dergham et al. 2002; Sung et al. 2003). Hara et al. konnten mit der Behandlung durch ROCK-Inhibitoren im Rückenmarkläsions-Tiermodell sogar eine bessere Funktionswiederherstellung im Vergleich zum derzeit aktuellen medikamentösen Standard mit Methylprednisolon erreichen (Hara et al. 2000). Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie unserer Arbeitsgruppe untersuchte ROCK-Inhibition in einem *in vitro* 1-Methyl-4-Phenylpyridin-Zellkulturmodell und in einem subchronischen *in vivo* 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP)-Mausmodell der neurodegenerativen Parkinson'schen Erkrankung. Die Behandlung mit Fasudil konnte in beiden Modellen den Untergang der dopaminergen Neurone und deren neuronaler Fortsätze abmildern. Zudem konnte in motorischen Verhaltenstestungen eine deutliche Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit nach Fasudilbehandlung gezeigt werden (Tönges et al. 2012).

SMA, eine der ALS verwandte Erkrankung, führt zum Motoneuronuntergang im Rückenmark aufgrund einer *loss of function*-Mutation im *survival of motoneuron (SMN)-1*-Gen mit dem Verlust an SMN-Protein. Das Fehlen von SMN führt über definierte Mechanismen zu einer gesteigerten Aktivierung der ROCK-Signalkaskade mit einer konsekutiven Hemmung axonalen Auswachstums. Durch Applikation von ROCK-Inhibitoren in Zellkulturversuchen, konnte dieser Dynamik entgegen gesteuert werden (Bowerman et al. 2007; Nolle et al. 2011). Funktionell konnte *in vivo* durch eine orale Behandlung mit Fasudil und Y-27632 in einem SMA-Mausmodell das Überleben der Tiere deutlich verlängert werden (Bowerman et al. 2010; Bowerman et al. 2012). Die Erfolge der Behandlung mit ROCK-Inhibitoren in einem Tiermodell der spinalen Muskelatrophie lassen grundsätzlich auch auf Erfolge in der Behandlung der ALS hoffen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Aktivierung der

ROCK-Signalkaskade und dem Pathomechanismus der Erkrankung ließ sich jedoch bisher nur bei der SMA herstellen. Die regulierende Bindung des Profilin-Proteins durch das SMN-Protein verhindert eine überschießende freie Konzentration an Profilin IIa. Dieses wiederum stellt einen bedeutenden Aktivator der Rho-ROCK-Signalkaskade dar. Der Verlust an SMN durch die Mutationen im Gen der SMA führt teilweise über diesen Pathomechanismus zu einem verminderten neuronalen Auswuchs und Differenzierung der Motoneurone (Bowerman et al. 2007).

1.3.3.2 Proteinaggregation

In der ALS ist die Proteinaggregation fehlgefalteter Proteine eine der markantesten histomorphologischen Erscheinungen. In SOD1-G93A-transfizierten Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die SOD1-Mutante über die Protein-Degradationssysteme UPS und Makroautophagie abgebaut wird und dass es durch Hemmung dieser Abbauege zur Akkumulation der Proteine kommt (Kabuta et al. 2006). Im SOD1-G93A-Mausmodell konnte zudem gezeigt werden, dass die Aktivität von UPS im lumbalen Rückenmark deutlich reduziert ist. Interessanterweise sogar, bevor die ersten histopathologischen Veränderungen auftreten (Kabashi et al. 2004). ROCK kann die Aktivität der Protein-Degradationssysteme wie zum Beispiel das UPS regulieren. Der genaue Signalweg ist bisher nicht verstanden, aber basierend auf Zellkultur-Versuchen weiß man, dass durch *knock-out* von ROCK-1 und ROCK-2, die Aktivität des UPS deutlich gesteigert werden kann. Durch Applikation des ROCK-Inhibitors Y-27632 konnte gezeigt werden, dass in einem *in vitro* Huntington-Modell durch Aktivierung der Protein-Degradationssysteme die erzeugten Huntingtin-Proteinaggregate reduziert werden können (Bauer et al. 2009). Weitere Studien wiesen der ROCK-Kaskade ein *downstream-target* mit antiaggregativen Eigenschaften, das Profilin-1, zu (Shao et al. 2008b). Profilin kommt hauptsächlich in zwei aktiven Isoformen vor. Profilin-1 ist in allen Zellen vorhanden und Profilin-2 kommt vor allem in neuronalen Zellen vor. Über einen bisher unbekanntem Mechanismus scheint Profilin-1 antiaggregative Eigenschaften aufzuweisen. Interessant ist, dass ROCK durch Phosphorylierung von Profilin-1 selbiges hemmt. Eine Inhibition durch ROCK-Inhibitoren konnte in einem *in vitro* Huntington-Modell eine Aktivierung von Profilin-1 bewirken, was wiederum zur Reduktion von Huntingtin-Aggregaten geführt hat (Shao et al. 2008b). In einem Tiermodell der Proteinopathie Chorea

Huntington konnte nach Behandlung mit Y-27632 eine Verbesserung der motorischen Leistung und eine Reduktion des mutierten Proteins Huntingtin nachgewiesen werden, ein Überlebensvorteil blieb jedoch aus (Li et al. 2009). Zudem konnte in einer weiteren Studie durch intravitreale Injektion von ROCK-Inhibitoren die Sehfähigkeit in einem Huntington-Mausmodell verbessert werden (Li et al. 2013).

Wie bereits in Kapitel 1.1.5 und Kapitel 1.3.3.1 erwähnt, konnten Mutationen im Profilin-1-Gen kürzlich als eine weitere Ursache bisher unklarer fALS entdeckt werden. In den hierbei untersuchten transfizierten Zellkulturen mit einer Profilin-1-Mutante ist im Vergleich zum Wildtyp-Profilin-1 eine deutliche Ausbildung von Aggregaten vor allem nach Inhibition des UPS zu sehen. Interessanterweise finden sich in den erzeugten Aggregaten auch TDP-43-Proteinaggregate. Hierdurch wird impliziert, dass nicht die Mutation allein, sondern auch eine Funktionseinschränkung des UPS die Aggregation von Proteinen begünstigt (Wu et al. 2012).

Allgemein scheinen die zellulären Proteinabbau-Mechanismen, wie UPS und Autophagie durch ROCK-Inhibition aktiviert zu werden (Pollitt et al. 2003; Shao et al. 2008a; Bauer et al. 2009). Bisher sind keine Veröffentlichungen zur Beeinflussung von Aggregation durch ROCK-Inhibition in der ALS bekannt, jedoch weisen die genannten wissenschaftlichen Untersuchungen auf eine starke Beteiligung der UPS-Funktion und anderer Degradationssysteme in der Pathogenese der ALS hin. Wie die Chorea Huntington gehört auch die ALS zu den Proteinopathien. Hypothetisch könnte man daher auf Grundlage der genannten Therapieerfolge im Huntington-Modell durch Stimulation der UPS-Funktion mit Hilfe von ROCK-Inhibitoren, ebenfalls auf eine erfolgreiche Beeinflussung der Aggregation in der ALS hoffen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Unter Leitung von Prof. Dr. Paul Lingor und dem Projektleiter PD Dr. Lars Tönges konnten wir bereits in einer präsymptomatischen Studie mit oraler Fasudil-Behandlung im SOD1-G93A-Mausmodell eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine Verbesserung der motorischen Leistung zeigen (Tönges et al. 2014) (siehe Abbildung 4). Hierbei wurde der ROCK-Inhibitor in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag und 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag ab Lebenstag 50 getestet. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben in der Fasudil-30mg/kg/Körpergewicht-Behandlungsgruppe mit einem mittleren Überlebensvorteil von 10 Tagen. Zudem konnten die Tiere durch Behandlung mit Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht in einer motorischen Leistungsfähigkeitsprüfung auf einer *rotarod*-Testapparatur im Zeitraum von Tag 107 bis 113 signifikant längere Laufzeiten im Vergleich zur Wasser-behandelten Kontrollgruppe erreichen. Ein solcher präsymptomatischer Behandlungserfolg in einem ALS-Mausmodell ist ein bedeutender Erfolg für die weitere Erforschung therapeutischer Behandlungsmöglichkeiten durch ROCK-Inhibition in der Amyotrophen Lateralsklerose.

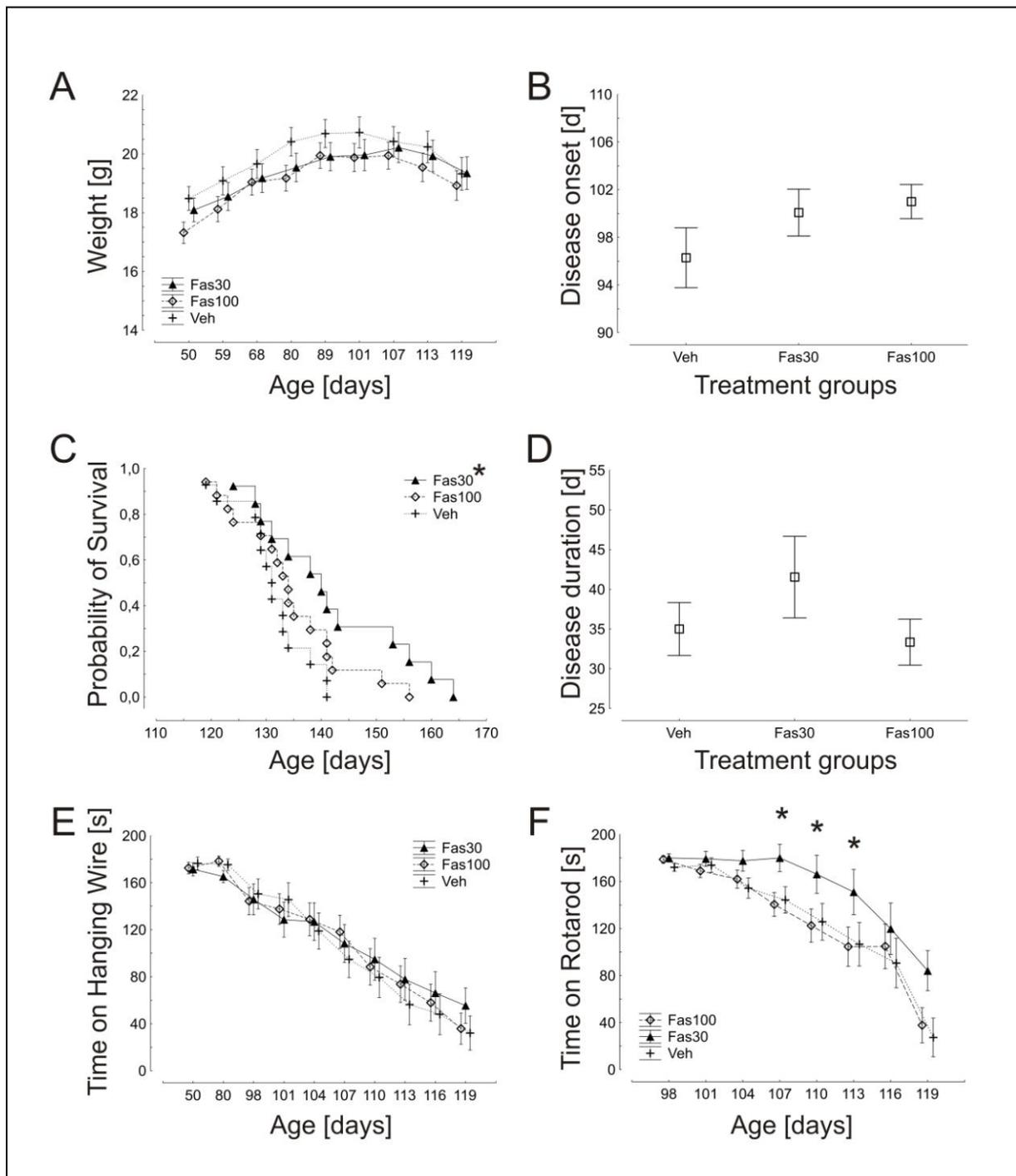


Abbildung 4 ROCK-Inhibition verlängert das Überleben und verbessert die motorischen Fähigkeiten nach prä-symptomatischer Behandlung mit Fasudil

Dargestellt sind die Untersuchungsergebnisse aus einer mit Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht behandelten (Fas30), einer mit Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht behandelten (Fas100) und einer unbehandelten (Veh) Gruppe aus SOD1-G93A-transgenen Weibchen. Dargestellt ist das Körpergewicht (A), der Krankheitsbeginn (B), das Überleben (C), die Krankheitsdauer (D) sowie die motorischen Verhaltenstestungen *hanging wire* (E) und *rotarod* (F). Signifikante Unterschiede bei $p < 0,05$ sind mit (*) gekennzeichnet. Abbildung entnommen aus Tönges et al., 2014, Seite 6, mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit

1. die Entschlüsselung der zugrundeliegenden neurobiologischen Effekte des Erfolgs der ROCK-Inhibitionstherapie in einer Querschnittstudie an 100 Tage alten SOD1-G93A-transgenen Mäusen. Wesentliche Bestandteile sind dabei die Evaluation der histologisch nachweisbaren Degeneration der zweiten Motoneurone im lumbalen Rückenmark, deren Axone im Nervus ischiadicus und deren terminale Enden auf der Ebene der motorischen Endplatten im Musculus gastrocnemius. Zudem stellt die elektro-physiologische Untersuchung am Nervus ischiadicus einen weiteren zu untersuchenden Parameter der Funktionalität jener Motoneuronaxone dar.
2. die Evaluation einer Therapie mit einem alternativen und spezifischeren ROCK-Inhibitor, der Substanz Y-27632, im SOD1-G93A-Mausmodell. Hierbei werden das Überleben, die motorischen Fähigkeiten und die klinische Verlaufsanalyse nach präsymptomatischer Behandlung über das Trinkwasser mit Beginn von 50 Lebens-tagen untersucht.
3. die Evaluation einer symptomatischen Therapie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil. Diese soll erst bei Auftreten der ersten klinischen Symptome des SOD1-G93A-Mausmodells an Lebenstag 80 initiiert werden und untersuchen, ob damit auch noch eine Lebensverlängerung und/oder funktionelle motorische Verbesserung erzielt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Standardmaterialien

In der nachfolgenden Tabelle sind die Materialien aufgelistet, die in der Mehrzahl der Versuche zum Einsatz kamen (sog. Standardmaterialien).

Geräte	Bezugsquelle / Hersteller
Axioplan Fluoreszenzmikroskop	Axioplan 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Axioplankamera	AxioCam HRm, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Reinstwasseranlage	Elga Purelab Plus UV/UF PL5124, ELGA LabWater, Celle, Deutschland
Eismaschine	AF 100, Scotsman Ice Systems, Milano, Italien
Feinwaage bis 0,01 g	LE6202S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Feinwaage bis 0,1 mg	BL210S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Gefrierschnittmaschine (Kryostat)	CM-3050-S, Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	Forma, ThermoQuest Analytische Systeme GmbH, Egelsbach, Deutschland
Inkubationsschrank (37 °C)	Heraeus B20, Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Kühlschrank (5 °C)	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer	Ikamag RH, IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Mikrowelle	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München, Deutschland
pH-Meter	pH-Meter PD20, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Pipetten 0,2-2 µl, 1-10 µl, 2-20 µl, 20-100 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl	Pipetman Classic P2, P10, P20, P100, P200, P1000; Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Schwenktisch	Stuart 3D gyratory rockers - SSM3, Bibby Scientific Limited, Stone, Vereinigtes Königreich
Vortex Reagenzglasrührer	7-2020, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	3043, Köttermann GmbH & Co KG, Hänigsen, Deutschland
Verbrauchsmaterialien/ allgemeine Chemikalien	Bezugsquelle / Hersteller
Deckgläschen	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig Deutschland
Gefriermatrix	Shandon Cyromatrix, Thermo Fisher Scientific Inc, Kalamazoo, Michigan, USA
Objektträger	ThermoScientific Superfrost Plus, Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co KG, Braunschweig Deutschland
Paraformaldehyd	A3813, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Phosphate buffered solution</i>	A0964, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Reagenzröhre (25 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
<i>Safe-Lock</i> -Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 1 Standardmaterialien

2.2 Experimentdesign

Die Planung und Darstellung der Experimente sowie deren Methoden und Ergebnisse werden nach den Empfehlungen des *CONSORT Statement* dargelegt (Moher et al. 2010). Das SOD1-G93A-Mausmodell ist nach den aktuellen *Guidelines* für präklinische Studien zur ALS der Goldstandard und stellt daher auch in dieser Arbeit die Grundlage der Experimente dar (Ludolph et al. 2010). Die Basis für diese Experimente bildet ein doppelt-verblindetes und Placebo-kontrolliertes Parallelgruppendesign. Zur Reduktion von Gruppeneffekten werden die Tiere entsprechend Geschlecht und Alter getrennt. Des Weiteren werden Wurfgeschwister in den verschiedenen Parallelgruppen randomisiert verteilt, sodass zur besseren Vergleichbarkeit im besten Fall Geschwister auf alle Gruppen gleichmäßig verteilt sind. Die weiterführenden Details der Experimente sind in den folgenden Kapiteln näher erläutert. Alle Tierexperimente wurden zudem nach den Empfehlungen und Regeln des Tierschutzgesetzes durchgeführt (Genehmigungsbescheid der Tierversuche Aktenzeichen: 33.14.42502-04-092/09 und Aktenzeichen: 33.9-42502-04-12/0938).

2.3 Tierzucht und Tierhaltung

Der genetische Hintergrund der transgenen Tiere entspricht dem ursprünglich von Gurney et al. entwickelten High-copy B6SJL-Tg(SOD1-G93A)1Gur/J Genotyp (Jackson Labs, Bar Harbor, USA) (Gurney et al. 1994). In der Zentralen Tiereinheit (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen wurden zu Beginn der Zucht die von Jackson Lab geordneten transgenen Böcke mit B6SJL F1/J-Wildtyp-Weibchen (Jackson Lab, Bar Harbor, USA) verpaart. In Folge des rapiden Krankheitsverlaufes war es nicht möglich, eine andauernde Zucht mit diesen transgenen männlichen Elterntieren weiter fortzuführen. Daher wurden zur Erhaltung der Kolonie die transgenen Böcke der F1-Generation mit den weiblichen Wildtyp-Tieren der Eltern-generation weiter verpaart. Hierbei wurde akribisch darauf geachtet, dass die Verpaarungsböcke nicht mit den Verpaarungsweibchen verwandt sind. Aufgrund der Verpaarung eines Wildtypen und eines heterozygoten Genotypes sind nur zu etwa 50 % transgene Nachkommen zu erwarten. Daher werden zwischen zwei und drei Wochen nach Geburt

Schwanzspitzen mit einer Länge von circa 0,4 cm biopsiert und der Genabschnitt mit der Mutation wie in der im folgenden beschriebenen Polymerasekettenreaktion amplifiziert und mittels Gelelektrophorese genotypisiert.

Im Alter von 35 bis 45 Tagen werden die Tiere von der ZTE in die experimentelle Einrichtung (Neurobiologisches Labor Prof. Bähr, Waldweg 33, Göttingen, Deutschland) transferiert. Die Haltung und Pflege der Tiere in speziellen Käfigen (IVC - *individually ventilated cage*) wurde von Mitarbeitern der ZTE durchgeführt. Durch die separate Käfigventilation ist eine konstant gehaltene Luftfeuchtigkeit und Temperatur möglich. Der Versuchsraum selbst ist auch stets bei konstanter Luftfeuchtigkeit von 60 % und 23 °C Raumtemperatur gehalten. Die Futterzufuhr erfolgt über eine vollwertige Alleinfuttermischung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland), die den Tieren unbegrenzt als Trockenpellets durch die Gitterabdeckungen erreichbar zur Verfügung steht. Die Flüssigkeitszufuhr wird über Trinkbehälter an den Käfigen ermöglicht, wobei diese durch die therapeutische Behandlung über das Trinkwasser regelmäßig vom Untersucher selbst kontrolliert wird. Im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf werden die Pellets mit Wasser zu Brei aufgeweicht und in einer Plastikschaale am Käfigboden platziert, um den durch Lähmung funktionell beeinträchtigten Tieren die Nahrungs- und Flüssigkeitszufuhr zu erleichtern. Um bestmögliche experimentelle Bedingungen zu schaffen, werden die Tiere, noch bevor die Testungen beginnen, an einen umgekehrten Tag-Nachtrhythmus gewöhnt. Hierbei bestand eine Dunkel/Nachtphase von 9 bis 21 Uhr, sodass bei der späteren Tiertestung die Tiere nicht in ihrer Ruhephase gestört werden und die maximale Aktivitätsphase am Tage in Dunkelheit erreicht wird. Zur Vermeidung von Tageslicht-bedingten Rhythmusstörungen während der motorischen Testungen wurde stets eine Rotlichtlampe verwendet.

2.4 Genotypisierung der SOD1-G93A-Punktmutation

Zur Freisetzung der DNA aus den Schwanzspitzenbiopsien werden diese zunächst mit je 160 µl DirectPCR-Lyse-Reagenz (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und je 3 µl Proteinase K (10 mM in Tris, pH 8, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) über 12 Stunden bei 55 °C inkubiert. Um die Proteinaseaktivität zu stoppen, werden die Proben abschließend für

45 Minuten bei 85 °C denaturiert. Nachdem diese abgekühlt sind, werden jeweils 2 µl des Gewebelysates in 0,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu jedem Lysat werden 18 µl eines Mastermix hinzugegeben, der sich aus folgenden Reagenzien zusammensetzt: 2 µl dNTP (Desoxynukleosid-Triphosphat-Mixlösung, 2 mM/dNTP; Biolab GmbH, München, Deutschland), 2 µl eines zehnfachen PCR-Reaktionspuffers (Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland), 0,5 µl eines Vorwärts-Primers mit der Sequenz 5'-CATCAGCCCTAATCCATCTGA-3' (100 µM, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 0,5 µl eines Rückwärts-Primer mit der Sequenz 5'-CGCGATTAACAATCAAAGTGA-3' (100 µM, Sigma-Aldrich, München), 0,3 µl Taq-Polymerase (Rekombinante DNA-Polymerase, interne Laborherstellung) in 12,7 µl sterilem Wasser. Das Gemisch aus Lysat und Mastermix wird im PCR-Gerät (Cyclone 25, Peqlab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) nach folgendem Schema amplifiziert: Das Gerät wird auf 110 °C vorgeheizt; Initialisierung der DNA-Denaturierung für 5 Minuten bei 94 °C; Schleife für 30 Durchläufe mit jeweils 30 min bei 94 °C, dann 30 min bei 55 °C für Anlagerung der Primer an die entsprechende Region der Einzelstrang-DNA, dann 30 min bei 72 °C für die Transkription des spezifischen DNA-Abschnittes, erneuter Beginn der Reaktionsschleife; Beendigung der Amplifikation bei 72 °C für 5 min, abschließend Abkühlung auf 4 °C. Die Reaktionsgefäße werden nun mit 3 µl Ladepuffer (15 % Ficoll 400 DL, 100 mM LiCl, 100 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), 0,05 % Bromphenol, in 50 ml H₂O) versetzt und ca. 15 µl jeder Probe auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Für die Herstellung des Gels werden 1,2 g Agarose (AppliChem GmbH, Darmstadt) in 60 ml einfacher TBE-Lösung (Tris-Base-EDTA-Puffer, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einem Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle durch kurzes Sieden gelöst und anschließend 1,2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hinzugegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Das flüssige Gel wird nun in einen Gelschlitten (BioRad Laboratories, München, Deutschland) gegossen und zwei passende Kämmen (BioRad Laboratories, München, Deutschland) zur Taschenformung eingetaucht. Nach circa einer Stunde ist das flüssige Gel in einen festen Aggregatzustand übergegangen und wird in eine Gelelektrophoresekammer mit TBE-Pufferlösung (BioRad Laboratories, München, Deutschland) überführt. Nachdem sich die Taschen mit Pufferflüssigkeit gefüllt haben, können diese mit dem Probenreagenz gefüllt werden. Die Gelelektrophorese wird für ca. 40 Minuten bei 80 Volt durchgeführt. Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente elektrophoretisch

nach ihrer Länge aufgetrennt. Durch das Anlegen einer Spannung an das Gel, wandert die negativ geladene DNA zur positiven Elektrode. Die Gelmatrix dient dabei als mikroskopisch kleines Porennetzwerk, durch das die DNA-Fragmente je nach Größe langsamer oder schneller wandern. Mit Hilfe einer mitlaufenden DNA-Leiter (100 ng/ μ l, Dianova, Hamburg, Deutschland) werden im Gel die Orte markiert, bei denen sich DNA-Fragmente bestimmter DNA-Länge befinden. Durch die Bindung von Ethidiumbromid an die DNA kann das zu bestimmende DNA-Molekül unter UV-Licht und mit Hilfe eines an eine Kamera angeschlossenen Computers und dem Computerprogramm Quantity-One 4.2.2 (BioRad Laboratories, München, Deutschland) detektiert werden. Das Genprodukt einer SOD1-G93A-Mutante wird anhand einer DNA-Bande im Bereich von 236 Kilobasen identifiziert, während bei WT-Proben an dieser Stelle keine Bande erscheint (siehe Abbildung 5).

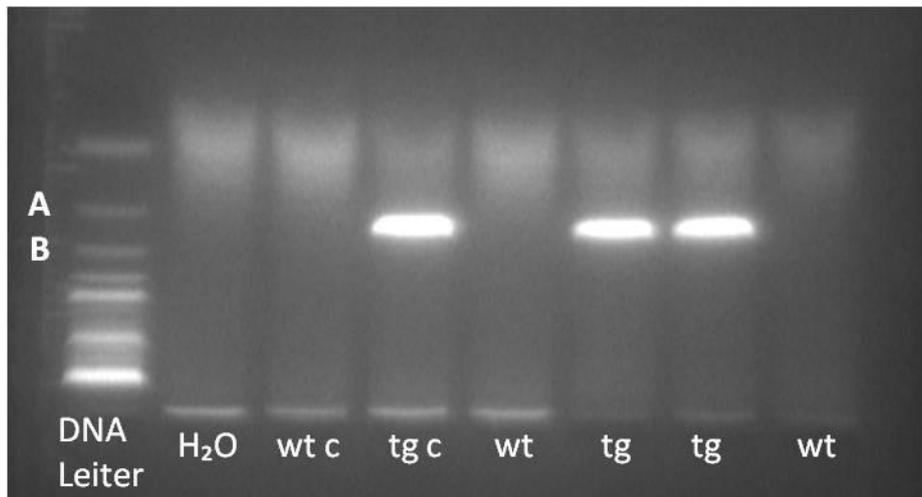


Abbildung 5 Genotypisierung der SOD1-G93A-transgenen Tiere

DNA Leiter mit A (300 Kilobasen) und B (200 Kilobasen), Kontrollproben Wasser (H₂O), Wildtypkontrolle (wtc), Transgenkontrolle (tgc) und zwei Proben transgener Tiere (tg) und eine Probe eines Wildtyptiers (wt). Bande bei 236 Kilobasen für Genprodukt mit SOD1-G93A-Punktmutation.

2.5 Versuchsgruppen

2.5.1 Therapeutische Behandlung und Versuchsgruppenübersicht

In den unter Kapitel 1.4 genannten Vorversuchen wurden bereits die Trinkmengen der Tiere mit 4 ml/Tag bestimmt. Je nach Experiment wird den Behandlungsgruppen 30 mg/kg Körpergewicht/Tag Fasudil („F-4660“, LC Labs, Woburn, Massachusetts, USA), 100 mg/kg Körpergewicht/Tag Fasudil oder 30 mg/kg Körpergewicht/Tag Y-27632 (Tocris Bioscience,

Bristol, Vereinigtes Königreich) in das Trinkwasser verabreicht. Die genannten Substanzen werden in Pulverform geliefert und gelagert. Diese werden mit sterilem Wasser (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) in einer Konzentration von 15 mg/ml für die Behandlungsgruppen mit 30 mg/kg Körpergewicht/Tag und mit 50 mg/ml für die Behandlungsgruppen mit 100 mg/kg Körpergewicht/Tag in 1 ml *Safe-Lock*-Reaktionsgefäßen aliquotiert und mit Buchstaben- und Zahlencodes für den Testdurchführer verblindet und bei -20 °C gelagert. Ein *Safe-Lock*-Reaktionsgefäß mit 1 ml wird dann auf 100 ml Leitungswasser verdünnt und den Tieren in entsprechenden Trinkbehältern zur Verfügung gestellt. In der Literatur wurde die Penetration von Y-27632 und Fasudil über die Blut-Hirn-Schranke nach oraler Applikation bereits mehrfach belegt (siehe Kapitel 1.3.1). In unserer Arbeitsgruppe konnte dies exemplarisch für Fasudil ebenfalls nachgewiesen werden (Tönges et al. 2014). Die Wasser-behandelten Kontrollgruppen werden ausschließlich mit isotonischem Trinkwasser behandelt. Die Versuchsgruppen sind in den folgenden Kapiteln einzeln aufgeführt und in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt.

Experiment	Versuchsgruppen			Behandlungszeitraum Beginn / Ende
Querschnittstudie Fasudil	SOD1 ^{G93A} Veh – Wasser	SOD1 ^{G93A} Fas30 – 30 mg/kg KG/Tag Fasudil	SOD1 ^{Wt}	Tag 50 / Tag 100
Präsymptomatische Studie mit Y-27632	H ₂ O – Wasser	Y-27632 – 30 mg/kg KG/Tag Y-27632		Tag 50 / bis Abbruchkriterien erfüllt
Symptomatische Studie mit Fasudil	H ₂ O – Wasser	Fas30 – 30 mg/kg KG/Tag Fasudil	Fas100 – 100 mg/kg KG/Tag Fasudil	Tag 80 / bis Abbruchkriterien erfüllt

Tabelle 2 Experiment- und Versuchsgruppenübersicht

2.5.2 Versuchsgruppen in einer Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil

Für die Evaluation der histomorphologischen und elektrophysiologischen Veränderungen nach präsymptomatischer Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil werden 22 weibliche SOD1-G93A-transgene Mäuse ab dem 50. Lebenstag in eine mit Wasser behandelte Gruppe (SOD1^{G93A}Veh, 11 Weibchen) und eine mit 30 mg/kg Körpergewicht/Tag Fasudil behandelte Gruppe (SOD1^{G93A}Fas30, 11 Weibchen) aufgeteilt. Um eine möglichst optimale Vergleichbarkeit für die Analyse zu erreichen, werden diese Tiere zum Lebenszeitpunkt von 100 Lebenstagen elektrophysiologisch untersucht und anschließend getötet. Hieran schließen sich die unter Kapitel 2.7 genannten Prozeduren zur Entnahme und histomorphologischen Analyse verschiedener Gewebe an. Zudem werden zusätzlich 10 weibliche Wildtyp-Tiere (SOD1^{Wt}) ohne Fasudil Behandlung mit 100 Lebenstagen als Wildtyp-Referenzgruppe analysiert.

2.5.3 Versuchsgruppen der präsymptomatischen Behandlung mit Y-27632

Für das Experiment der präsymptomatischen Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 werden 16 männliche und 25 weibliche SOD1-G93A-transgene Mäuse ab dem 50. Lebenstag in eine mit Wasser behandelte Gruppe (H₂O, 12 Weibchen, 8 Männchen) und eine mit 30 mg/kg Körpergewicht/Tag Y-27632 behandelte Gruppe (Y-27632, 13 Weibchen, 8 Männchen) aufgeteilt. Diese Tiere werden ab dem 50. Lebenstag, wie in Kapitel 2.6 beschrieben, klinisch getestet und zum Lebensende nach Tierversuchsabbruchkriterien getötet.

2.5.4 Versuchsgruppen der symptomatischen Behandlung mit Fasudil

Für das Experiment der symptomatischen Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil, werden 35 männliche und 43 weibliche SOD1-G93A-transgene Mäuse ab dem 80. Lebenstag in eine mit Wasser behandelte Gruppe (H₂O, 14 Weibchen, 12 Männchen), eine mit 30 mg/kg Körpergewicht/Tag Fasudil behandelte Gruppe (Fas30, 14 Weibchen, 11 Männchen) und eine mit 100 mg/kg Körpergewicht/Tag Fasudil behandelte Gruppe (Fas100, 15 Weibchen, 12 Männchen) aufgeteilt. Diese Tiere werden ab dem 80. Lebenstag, wie in

Kapitel 2.6 beschrieben, klinisch getestet und zum Lebensende nach Tierversuchsabbruchkriterien getötet.

2.5.5 Versuchstiere zur Methodenetablierung

Zur Etablierung der elektrophysiologischen Untersuchungen werden an Lebenstag 70 je drei weibliche unbehandelte SOD1-G93A-transgene ($SOD1^{G93A}$) und drei weibliche Wildtyp-Tiere ($SOD1^{Wt}$) sowie an Lebenstag 100 je sechs weibliche unbehandelte $SOD1^{G93A}$ und sechs weibliche $SOD1^{Wt}$ -Tiere untersucht. Um die Quantifizierung der axonalen Degeneration im Nervus ischiadicus im SOD1-G93A-Mausmodell zu etablieren, wurden die Ischiadicusnerven zweier Wildtyp-Weibchen ($SOD1^{Wt}$) und je zwei Weibchen mit 110 Tagen im symptomatischen Stadium ($SOD1^{G93A}$ d110) sowie mit 140 Tagen im Endstadium ($SOD1^{G93A}$ d140) in einer Voruntersuchung aufgearbeitet.

2.6 Klinische Analyse des SOD1-G93A-Mausmodells

2.6.1 Analyse des Krankheitsverlaufs, Versuchsabbruch und Überlebensanalyse

Ein klinisch-neurologischer Score, modifiziert nach Weydt et al. (2003), wird jeden dritten Tag ab Behandlungsbeginn erhoben (Weydt et al. 2003). Ab Erreichen des Punktwertes 1 wird eine tägliche Begutachtung durchgeführt, um die genaue Überlebenszeit zu erfassen. Hierbei wird nach folgendem Punktbewertungsverfahren eingeteilt:

4 - keinerlei neurologische Defizite, Wildtyp-ähnliche Verhaltensweise, vollständige Beinstreckung/Spreizung weg von der lateralen Mittellinie, während die Maus kopfüber am Schwanz gehalten wird

3 - Tremor der Hinterläufe und/oder Einschränkung/Abbruch der spontanen Beinstreckung weg von der lateralen Mittellinie, während die Maus kopfüber am Schwanz gehalten wird

2 - Gestörtes Gangbild im Sinne eines „Watschelgang“, Gang auf allen vier Extremitäten noch möglich; *

1 - Lähmung mindestens einer hinteren Extremität, wobei diese beim Laufen hinterhergezogen wird. Die Vorderläufe sind nicht betroffen. Das Tier ist in der Lage, selbstständig Futter zu erreichen und aufzunehmen. Das Tier dreht sich innerhalb 30 Sekunden selbstständig von der Rücken- in die Bauchlage

0 - Unfähigkeit des Tieres, sich selbstständig in weniger als 30 Sekunden aus der Rücken- in die Bauchlage zu drehen oder es sind Lähmungserscheinungen in mehr als zwei Extremitäten sichtbar oder das Tier ist nicht in der Lage, selbstständig Futter oder Wasser zu sich zu nehmen oder das Tier hat mehr als 25 % des Maximalgewichtes verloren oder das Tier hat über 48 Stunden einen Gewichtsverlust von über 20 % des Maximalgewichtes ohne, dass in dieser Zeit eine erneute Gewichtszunahme erreicht werden konnte.

* ab dem Punktwert 2 werden Futterpellets mit Wasser zu Brei aufgeweicht und in einer Plastikschale am Käfigboden platziert

Nach zuvor beschriebenem Punktschema des neurologischen Scores wird bei Erreichen des Punktwertes 0 eine sofortige Kohlendioxid-Insufflation und damit die Euthanasie durchgeführt. Der Tag der Tötung wird als Überlebenszeit in die statistische Auswertung eingehen und stellt damit die erreichte Überlebenszeit des Tieres dar. Der Tag des erstmaligen Auftretens des Scores 3 wird als Krankheitsbeginn gewertet. Die Krankheitsdauer wird daher als Zeitraum zwischen erstmaligem Auftreten des Scores 3 und dem durch Versuchsabbruchkriterien festgelegten Todeszeitpunkt (Score 0) eines Tieres bestimmt.

2.6.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht ist ein wichtiger und sehr sensibler Parameter für die Detektion von Futteraufnahme- oder Ernährungsstörungen und damit einhergehend mit dem Gesundheitszustand des Tieres. Rascher Krankheitsfortschritt im Sinne der SOD1-G93A-Mausmodel-induzierten Amyotrophen Lateralsklerose, anderweitiges Krankheitsgeschehen oder

Therapieunverträglichkeiten können somit erkannt werden. Die Körpergewichtsmessungen werden ab Behandlungsbeginn in einem dreitägigen Rhythmus durchgeführt. Es muss darauf geachtet werden, dass die Bestimmung möglichst zur gleichen Tageszeit und vor den Verhaltenstestungen durchgeführt wird.

2.6.3 Motorische Verhaltenstestungen

Der Krankheitsverlauf des SOD1-G93A-Mausmodels ist wie in der Einleitung beschrieben durch zunächst eine Abnahme und später den Verlust der motorischen Fähigkeiten gekennzeichnet. Mit Hilfe der motorischen Verhaltenstestungen Gitterhängeversuch und Drehwalzentest ist es möglich, den Beginn sowie das Fortschreiten dieser zu erkennen und zu dokumentieren. Eine Woche bevor die Testungen in einem Rhythmus von drei Tagen beginnen, werden die Mäuse in einer zweizeitigen Trainingseinheit im Abstand von drei Tagen auf die Testung vorbereitet. Die Tests werden nach immer gleichen Bedingungen und immer zur selben Tageszeit durchgeführt.

2.6.3.1 Gitterhängeversuch (*hanging wire*)

Im Gitterhängeversuch wird vor allem die Kraftausdauer, aber auch die Koordination der Mäuse geprüft. Die Testapparaturen wurden in Kooperation mit der wissenschaftlichen Werkstatt der Georg-August-Universität Göttingen (Humboldtallee 23, 37075 Göttingen) hergestellt (siehe Abbildung 6). Hierbei handelt es sich um eine 55 cm hohe Plastikkiste mit allseits verschlossenen glatten Wänden, ohne Vorsprünge oder anderweitige Absätze, an denen sich die Tiere abstützen könnten. Der Grund wird mit Holzspänen gepolstert, um beim Herunterfallen der Mäuse keine Verletzungen zu verursachen. Auf die Box wird ein abnehmbares Gitter mit 0,5 mal 1 cm großen Maschen gelegt. Zu Versuchsbeginn wird eine Maus auf dem Gitter platziert und anschließend zügig kopfüber auf der Box abgelegt. Durch die Begrenzung der Kistenseitenwände kann sich die Maus nur am Gitter entlang hangeln. Die Höhe vermittelt der Maus eine nicht einschätzbare Verletzungsgefahr, sodass diese in der Regel nicht einfach zu Boden springt. Nun ist das Tier dazu angehalten, sich solange an dem Gitter zu halten, wie die muskuläre Kraft es zulässt (Günther et al. 2012). Direkt nachdem das Gitter abgelegt ist, wird ein Timer mit 180 Sekunden gestartet (Miana-Mena et

al. 2005; Alves et al. 2011). Sobald das Tier vor Erreichen der Dauer von 180 Sekunden vom Gitter herunterfällt, wird der Timer gestoppt und die Zeit notiert. Falls das Tier im ersten Lauf 180 Sekunden erreicht, ist der Versuch damit erfolgreich beendet. Wenn die 180 Sekunden nicht erreicht werden, wird der Versuch mit einer Pausenzeit von 10 Minuten maximal zweimal wiederholt. Es werden insgesamt maximal drei Testläufe durchgeführt. Wenn das Tier im ersten Lauf 180 Sekunden auf der Apparatur ohne herunterzufallen durchgehalten hat, ist davon auszugehen, dass die beiden anderen Testläufe auch mit 180 Sekunden erreicht werden. Daher wird nach Erreichen eines 180-Sekunden-Laufes auf die weiteren Testläufe verzichtet.

2.6.3.2 Drehwalzentest (*rotarod*)

Im Drehwalzentest wird vor allem die Koordinationsfähigkeit und Balance getestet. Bei der Testapparatur handelt es sich um eine um die eigene Achse rotierende Walze (*Rota-Rod for mice* 47600, UGO BASILE, Comerio Italien), auf der bis zu fünf Mäuse gleichzeitig getestet werden können (siehe Abbildung 6). Trennwände verhindern hierbei den Kontakt untereinander. Die Walze ist senkrecht zur Laufrichtung mit feinen Riefen ausgestattet, an denen die Maus beim Laufen Halt findet. Am Fuße befindet sich eine Taste, die betätigt wird, wenn die Maus von der Walze fällt (Günther et al. 2012). Ein zuvor gestarteter Timer wird dabei gestoppt. In Anlehnung an die in der Quelle angegebenen Veröffentlichungen, wird eine konstante Drehgeschwindigkeit von 15 Drehungen pro Minute eingestellt (Fischer et al. 2004; Miana-Mena et al. 2005; Alves et al. 2011). Je eine Maus pro Laufkammer wird auf dem Gerät platziert und sofort der Timer mit 180 Sekunden gestartet. Der Test gilt als beendet, sobald das Tier 180 Sekunden auf dem Gerät durchgehalten hat. Im Falle des vorzeitigen Herunterfallens wird die erreichte Zeit dokumentiert und der Versuch nach einer Pause von 10 Minuten erneut durchgeführt. Es werden insgesamt maximal drei Testläufe durchgeführt. Wenn das Tier im ersten Lauf über 180 Sekunden auf der Apparatur ohne herunterzufallen durchgehalten hat, ist davon auszugehen, dass die beiden anderen Testläufe auch mit 180 Sekunden erreicht werden. Daher wird nach Erreichen eines 180-Sekunden-Laufes auf die weiteren Testläufe verzichtet.

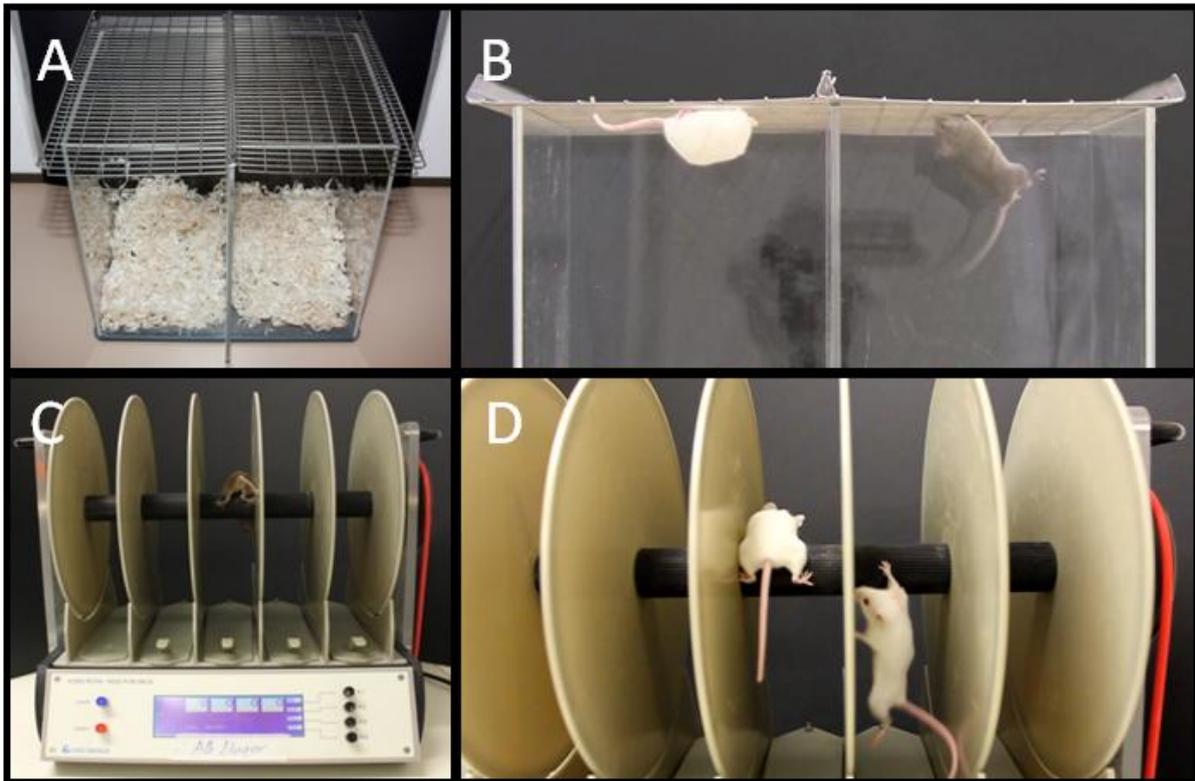


Abbildung 6 Testapparaturen

hanging wire-Testapparatur von oben (A), von vorn mit einem SOD1-Wildtyp-Tier links und einem SOD1-G93A-transgenen Tier rechts (B); *rotarod*-Testapparatur von vorn (C) und im Detail mit einem SOD1-Wildtyp-Tier links und einem SOD1-G93A-transgenen Tier rechts (D).

2.6.4 Statistische Auswertung der klinischen Parameter

Die klinisch erhobenen Daten werden mit der Statistica-10-Software (StatSoft GmbH, Hamburg, Deutschland) ausgewertet und auf signifikante Unterschiede geprüft. Die Mittelwerte, aus den in den motorischen Testungen gewonnenen Messungen eines Verhaltenstesttages, werden in die statistische Analyse eingebunden. Die statistische Auswertung der motorischen Verhaltenstestungen und der Gewichtsanalysen erfolgt mit Hilfe einer ANOVA mit Messwiederholungen und wird im Falle von signifikanten Unterschieden mit dem Fisher's-Least-Significant-Difference-Test (Fisher-LSD-Test) vervollständigt. Die entsprechende graphische Darstellung wird mit Hilfe von Mittelwert-Plots ermöglicht. Abweichungen vom Mittelwert werden als Standardfehler (Stdf) berechnet und als entsprechende Fehlerbalken graphisch dargestellt. In diese statistische Analyse werden nur die Daten einbezogen, an denen keines der Tiere das Versuchsabbruchkriterium erfüllt hat. Im Vergleich der letzten 10 Gewichtsmesszeitpunkte werden von jedem Tier die letzten 10 Gewichtsmessungen einbezogen und analysiert. Des Weiteren wurden die Gewichtsentwicklungen im Verhältnis zum Startgewicht, je nach Experiment entspricht dies dem Ausgangsgewicht Tag 50 oder Tag 80, untersucht. Hierbei wird jede Messung in ein prozentuales Verhältnis zum Startgewicht gesetzt. Bei der Überlebensanalyse werden die Lebensendpunkte der Tiere mit Hilfe von Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und durch einen log-Rank-Test auf signifikante Unterschiede geprüft. Der neurologische Score wird mit Mittelwert-Plots dargestellt und mit Hilfe einer einfaktoriellen ANOVA auf signifikante Unterschiede geprüft. Die im Ergebnisteil im fortlaufenden Text aufgeführten Werte sind als Mittelwert \pm Stdf zu verstehen.

2.7 Histomorphologische und elektrophysiologische Evaluation nach präsymptomatischer Behandlung mit Fasudil

Für die histomorphologische und elektrophysiologische Evaluation im SOD1-G93A-Mausmodell war es notwendig, einige der bis dato in unserem Labor nicht angewandten Methoden zu testen und zu etablieren. Für die histomorphologischen Auswertungen in den einzelnen Kompartimenten der Motoneuron-Axon-Endplatten-Einheit wurden randomisiert Tiere aus der Gesamtgruppe der unter Kapitel 2.5.2 genannten Behandlungsgruppe ausgewählt und analysiert.

2.7.1 Perfusion der Versuchstiere

Die Mäuse werden mit Kohlendioxid in einem entsprechenden Käfig euthanasiert. Jedes Tier wird gründlich inspiziert, um den Atemstillstand festzustellen und zudem mit Schmerzreizen auf eine ausreichende Kohlendioxid-Narkose untersucht. Anschließend werden die Tiere auf einem Perfusionstisch fixiert und für die anschließende Perfusion vorbereitet. Mit einer Schere mit gerader Spitze („Cohan-Vannas Spring Scissors“, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) wird der Brustkorb, ohne das Herz zu verletzen, eröffnet. Nun wird das noch schlagende Herz vorsichtig aus dem umliegenden Bindegewebe freigelegt und mit einer feinen Kanüle die linke Herzkammer punktiert. Die Punktionskanüle wird mit einem Schlauchsystem verbunden, welches mit Hilfe eines Infusiomaten 100 ml einer 4 °C kalten *Phosphat-Buffer-Solution* (PBS) langsam in das Blut-Kreislaufsystem des Tieres infundiert. Um den nun steigenden Druck im Kreislauf zu entlasten, wird die anschwellende Leber mit der Schere eingeschnitten. Im Anschluss werden nach gleicher Systematik 100 ml einer 4 °C kalten 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) zur Fixierung des Tierkörpers verwendet. Eine gute Fixierung mit Paraformaldehyd ist an einer Bewegung des Schwanzes während der Perfusion zu erkennen. Im Anschluss sollte der perfundierte Tierkörper starr sein.

2.7.2 Allgemeines Procedere der Gewebepräparation

Zunächst wird das Tier in Bauchlage an allen Extremitäten mit Nadeln auf einer geeigneten Styroporplatte fixiert. Mit einem scharfen Skalpell („Präzisa Plus“, Dahlhausen, Köln,

Deutschland) wird die Haut vom Hinterhaupt über die gesamte Wirbelsäule bis über beide untere Extremitäten eröffnet und zu allen Seiten von der Körperfaszie abgelöst. Anschließend wird die Körperfaszie entlang der genannten Strukturen eingeschnitten und an den unteren Extremitäten vom darunterliegenden Muskelgewebe entfernt.

2.7.3 Darstellung und Analyse der axonalen Strukturen im Nervus ischiadicus

2.7.3.1 Präparation des Nervus ischiadicus

Unter Vorsicht wird die ischiocrurale Muskulatur inzidiert und präpariert, bis die hellweiße Struktur des Nervus ischiadicus zu sehen ist. Nun kann der Nerv vom umliegenden Gewebe stumpf frei gelegt werden. Zwischen der Incisura ischiadica major und dem Eintritt in den Musculus gastrocnemius wird ein circa 5 cm langes freiliegendes Nervenstück entnommen (siehe Abbildung 7), zügig in ein *Safe-Lock*-Reaktionsgefäß mit 4 %igen PFA-Lösung transferiert, nach einer Stunde in eine reine PBS-Lösung bei 4 °C eingelegt und bis zum Beginn der weiteren Einbettung darin aufbewahrt.

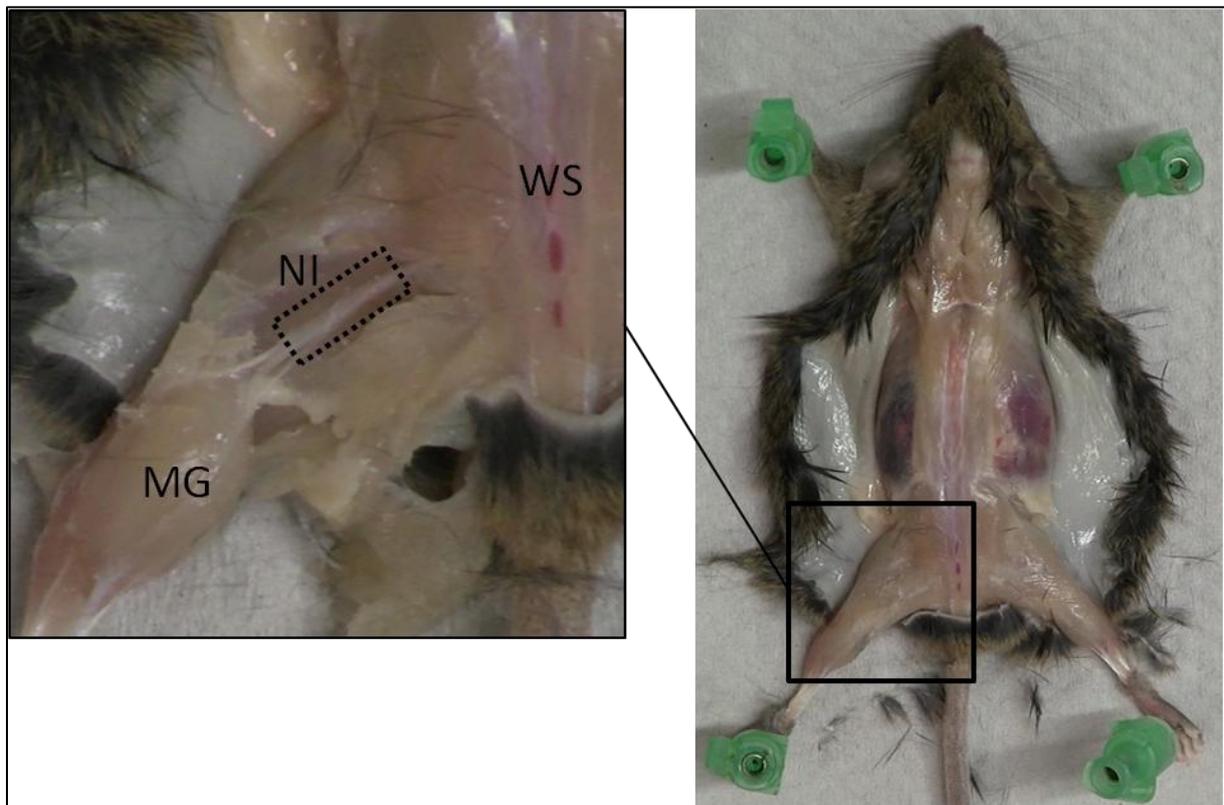


Abbildung 7 Präparation des Nervus ischiadicus

Die Abbildung veranschaulicht die Lage des Nervus ischiadicus (NI) *in situ*, nachdem das umliegende Gewebe frei präpariert wurde. MG Musculus gastrocnemius, WS Wirbelsäule.

2.7.3.2 Fixierung und Einbettung des Nervus-ischiadicus-Gewebepräparates

Die Einbettung, Färbung und Gewebeschnitanfertigung der Nervenpräparate wurde durch Frau Bianca Bönigk ermöglicht und durchgeführt. Die Nervengewebepräparate werden nach folgendem Schema (Tabelle 3) zunächst fixiert, anschließend entwässert und schließlich in Araldit eingebettet.

Verfahren	Chemikalien	Dauer, Besonderheiten
1. Fixierung	3 % Glutaraldehyd in PBS	3 h bei 4 °C
2. Nachfixierung	1 % Osmiumoxid in PBS	1 h bei 4 °C
3. Waschen	PBS	2 x 5 min
4. Dehydrierung	50 % Ethanol	1 x 10 min
	0,5 % Uranylacetat in 70 % Ethanol	1 h bei 4 °C
	80 % Ethanol	1 x 10 min
	96 % Ethanol	1 x 10 min
	100 % Ethanol	2 x 15 min
	Propylenoxid	2 x 20 min
5. Einbettung	Araldit und Propylenoxid 1:1	1 x 35 min
	Araldit und Propylenoxid 2:1	1 x 35 min
	Araldit, Propylenoxid entweichen lassen	1 h unter dem Abzug
	In Flachförmchen	Bei 48-50 °C trocknen lassen, dann bei 60 °C 2-3 d aus- härten

Tabelle 3 Übersicht Einbettung des Nervus-ischiadicus-Gewebepräparates

2.7.3.3 Nervus ischiadicus – Gewebeaufbereitung und Myelinscheidenfärbung

Aus der Mitte der Aralditblöcke mit den eingebetteten Nerven werden mit Hilfe eines Microtoms (Leica mircosystems, Wetzlar, Deutschland) Querschnitte mit einer Dicke von 380 nm angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Um die Axone der Nervenquerschnitte sichtbar zu machen, wird mit Richardson-Färbelösung gearbeitet. Diese enthält 2 Teile einer 1 %igen Azur2-Lösung, 1 Teil einer 2 %igen Methylblaulösung und 1 Teil einer 1-prozentigen Borax-Lösung (Di-Natriumtetraborat-10-hydrat). Die Gewebeschnitte werden zunächst mit dieser Lösung benetzt, nach einigen Minuten Inkubationszeit mit destilliertem

Wasser abgespült und zum Trocknen auf eine Wärmeplatte abgelegt. Abschließend werden die getrockneten Nervenschnitte mit Depex eingedeckelt.

2.7.3.4 Mikroskopie und Auswertung der histomorphologischen Analyse im Nervus ischiadicus

Ziel der histomorphologischen Auswertung des Nervus-ischiadicus-Querschnittes ist es, die Querschnittfläche, die Gesamtanzahl der Axone und deren Relation zum axoplasmalen Durchmesser sowie die Anzahl degenerierter Axone zu bestimmen. Für die Auswertung der Querschnittfläche, der Gesamtanzahl der Axone und der degenerierten Axone werden die rechten Nerven von 4 Wildtyp-Tieren aus der SOD1^{Wt}-Gruppe, 6 Tiere aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe sowie von 7 Tieren der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe untersucht. Zur Bestimmung der axoplasmalen Durchmesser werden beide Nerven von 3 SOD1^{Wt}-Tieren und je 4 Tiere aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe und der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe ausgewertet. Zunächst werden mit einem Durchlichtfilter (DIC) eines AXIOPLAN Fluoreszenzmikroskopes und einer installierten Kamera die Nervenquerschnitte bei 20-facher Vergrößerung in Teilbildern vollständig abfotografiert. Anschließend werden diese mit Hilfe des Programms CorelDraw-Graphics-Suite-X3 (Corel, Ottawa, Kanada) wieder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Für die Analyse der degenerierten Axone werden zudem je 5 immer gleich verteilte Regionen pro Nervenquerschnitt bei 63-facher Vergrößerung abfotografiert.

Aufgrund der großen Anzahl der Axone wird das frei verfügbare Programm Image J (*public domain*) unterstützend für die Auswertung verwendet. Mit der Funktion *free-hand-tool* wird zunächst die Fläche des Querschnittes in den zusammengesetzten Bildern in 20-facher Vergrößerung vollständig umrandet. Nun kann mit der Funktion *analyze-measure* die Fläche bestimmt werden. Bei der Auszählung der Gesamtzahl der Axone und der degenerierten Axone wird mit Hilfe der *cell-counter*-Funktion gearbeitet. Ein Axon kann hierdurch markiert werden, man verhindert dadurch das mehrfache Zählen derselben Axone. In den zusammengesetzten Bildern bei 20-facher Vergrößerung werden alle Axone, das heißt Axone mit klarem, ungefärbtem Axoplasma markiert und die Gesamtzahl dokumentiert.

Bei der Auszählung der degenerierten Axone werden bei 63-facher Vergrößerung zunächst alle Axone gezählt. Danach werden separat die Axone mit akkumuliertem Neurofilament, das heißt mit einem deutlich dunkel gefärbten Axoplasma markiert und die Gesamtzahl

dokumentiert. Im Gegensatz zu vitalen Axonen lässt sich in den degenerierten Axonen kein helles ungefärbtes Axoplasma von einem dunkel gefärbten Myelinscheidenring abgrenzen. Anschließend wird hieraus für jede abfotografierte Region in 63-facher Vergrößerung der prozentuale Anteil degenerierter Axone von allen Axonen gebildet. In die Auswertung geht dann der über alle 5 abfotografierten Regionen des Nervenquerschnittes eines Tieres gemittelte Wert ein.

Um ein Verhältnis zwischen Axonanzahl und axoplasmalen Durchmesser zu bestimmen, kommt auch die Image J Software zum Einsatz. Jedes Bild wird zunächst durch Reduktion des Hintergrundes, Kontrastanhebung und Entfernung aller nicht zum Nerv gehöriger Gewebeteile einheitlich bearbeitet. Anschließend werden mit einer Schwellenwertfunktion des Programmes alle Bildpunkte ab einer definierten Schwelle von 106 für schwarze Farben mit der Farbe Weiß belegt und alle Areale mit einem darunterliegenden Schwellenwert mit schwarzer Farbe. Daraus ergibt sich, dass alle Myelinscheiden als weißer Ring und das innerhalb liegende kreisflächenförmige Axoplasma schwarz dargestellt wird (siehe Abbildung 8). Nun können unter Anwendung der *analyze-particles*-Funktion alle schwarzen Areale mit einer festgelegten Rundung von 0,6 (Programm-definierter Bezug auf einen Kreis) und ab einer Größe von 50 Quadratbildpunkten ausgemessen werden. Anschließend werden alle Flächen nach Größe geordnet. Von jeder ausgegebenen Fläche wird mit Hilfe der Formel zur Berechnung einer Kreisfläche ($A = \frac{1}{4}\pi d^2$) der Durchmesser ermittelt. Diese werden durch Umrechnung der in Bildpunkten ausgegebenen Werte und Einbeziehung der Bildaufnahme bei 20-facher Vergrößerung in der Einheit μm angegeben (1 μm entsprechen 2,4 Bildpunkte Image J bei Aufnahme mit 20-facher Vergrößerung). Anschließend werden alle Axone mit einem Durchmesser zwischen größer 3,5 und bis einschließlich 5,5 μm , größer 5,5 und bis einschließlich 7,5 μm sowie größer 7,5 μm zusammengefasst und dargestellt. Da nicht alle Axone mit einem Durchmesser kleiner 3,5 μm mit dieser Methode erfasst werden, werden anteilig die manuell ausgezählten Axone hinzu addiert.

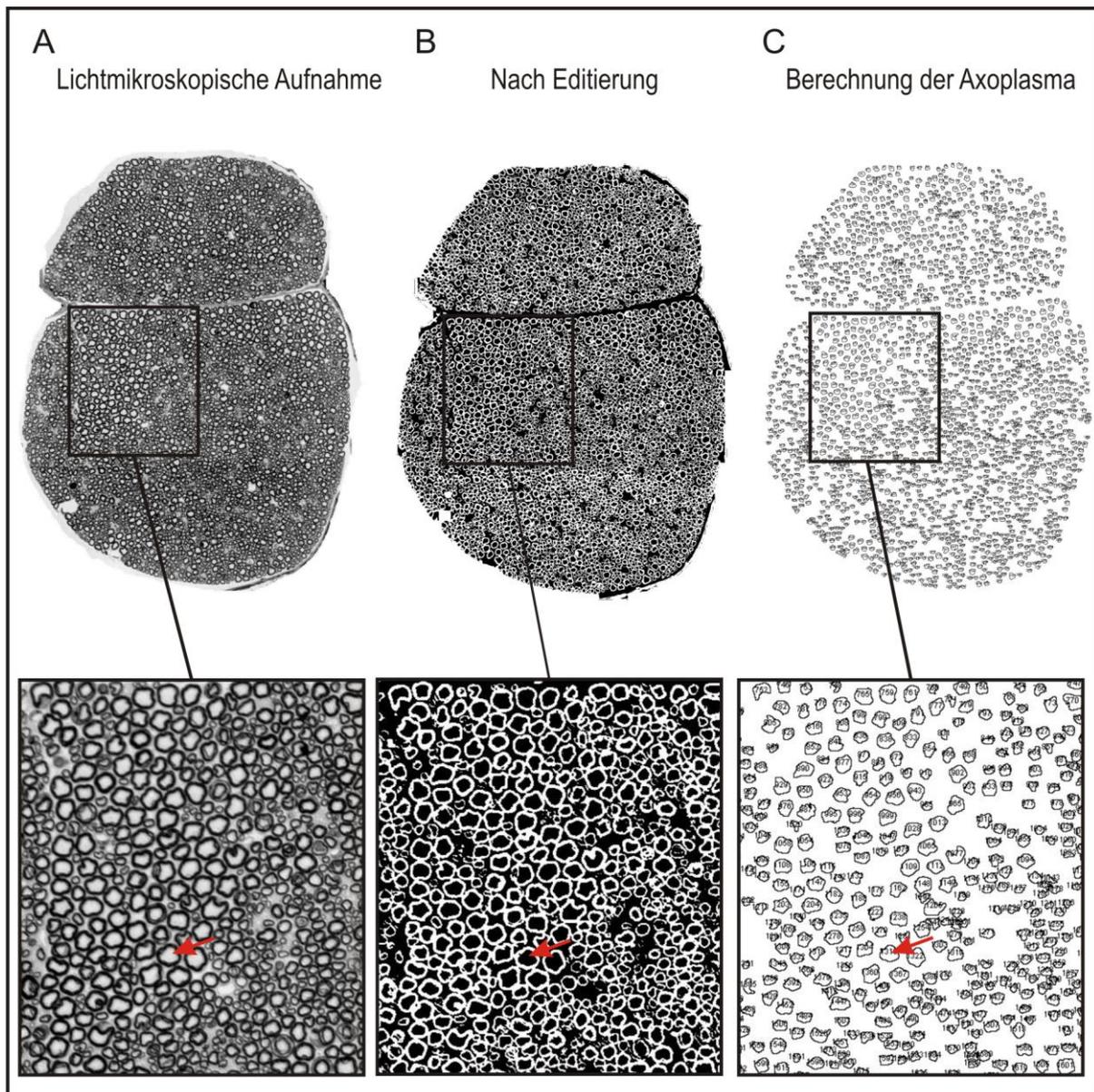


Abbildung 8 Automatisierte Auswahl und Berechnung der Axoplasma-Fläche mit dem Image-J-Programm

Beispielhafte Darstellung erfolgt anhand eines Wildtyp-Präparates. Von der lichtmikroskopischen Aufnahme (A) über die Editierung in schwarze Axoplasma (roter Pfeil) und die umliegenden weißen Myelinscheiden (B) zur Berechnung der axoplasmalen Flächen mit der *analyze-particles*-Funktion (C).

2.7.4 Analyse der motorischen Endplatten und die Bestimmung der Muskelatrophie im *Musculus gastrocnemius*

2.7.4.1 Präparation des *Musculus gastrocnemius*

Die vorbereitende Präparation der Haut und Körperfaszie wird, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, durchgeführt. Der *Musculus gastrocnemius* wird beginnend mit der Durchtrennung der Achillessehne vom darunterliegenden Gewebe abgehoben und an

seinem Ursprung am Oberschenkel abgetrennt. In einem geeigneten Becherglas erfolgt eine 1-stündige Nachfixierung in 4 %iger PFA-Lösung bei 4 °C. Anschließend wird das Muskelgewebe in einer 30%-Saccharoselösung (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) über Nacht dehydriert. Als Zeichen der ausreichenden Dehydrierung ist darauf zu achten, dass die zunächst an der Oberfläche der Lösung schwimmenden Gewebeproben bei ausreichender Dehydrierung zu Boden abgesunken sind. Anschließend wird das Gewebe in Alufolie verpackt und bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.7.4.2 Bestimmung der Muskelatrophie anhand des Musculus gastrocnemius

Zur Bestimmung der Muskelatrophie wurden das Muskelgewicht und das Körpergewicht des rechten Musculus Gastrocnemius von 10 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe und 10 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe, sowie 9 Wildtyp-Weibchen aus der SOD1^{Wt}-Gruppe mit einer Feinwaage bestimmt. Das Muskelgewicht wird dann in ein prozentuales Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt, um ein an das Körpergewicht adaptiertes Muskelgewicht zu errechnen.

2.7.4.3 Gewebeaufbereitung und Darstellung der motorischen Endplatten

Zur Anfertigung von Gefrierschnitten werden zunächst alle Musculus-gastrocnemius-Gewebeproben in eine Gefriermatrix eingebettet. Beginnend von der Bauchseite des Muskels werden 35 µm dünne, zum Muskelverlauf horizontale Schnitte angefertigt und nach einem definierten Schema auf Objektträger übertragen. Hierbei werden die ersten vier Gewebeschnitte chronologisch auf die jeweiligen von eins bis vier nummerierten Objektträger verteilt. Die darauffolgend gewonnenen Schnitte werden in gleicher Weise nacheinander auf den ersten bis vierten Objektträger weiter aufgetragen, solange bis vier Schnitte mit einem Gewebeabstand von je 140 µm auf einem Objektträger sind. Anschließend werden nach dieser Systematik weitere Objektträger bestückt. Bis zur weiteren Bearbeitung werden diese bei -20 °C aufbewahrt. Um eine möglichst vergleichbare Höhe zu analysieren, werden die Objektträger der verschiedenen Tiergruppen mit der gleichen Nummerierung zur weiteren Färbung verwendet. Zunächst wird der zu färbende Objektträger mit den Gewebeschnitten für 30 Minuten in einem Inkubationsschrank

getrocknet und anschließend in einer mit PBS gefüllten Küvette für 30 Minuten auf einem Schwenktisch rehydriert. Um in den nachfolgenden Schritten ein Verlaufen der Lösungen zu vermeiden, werden die Gewebeproben auf dem Objektträger mit einem Konturstift (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) umrandet. Um eine unspezifische Färbung des Gewebes zu unterbinden und die Eiweißbindungsstellen freizulegen, wird eine Lösung aus 5 % *Bovine Serum Albumin* (BSA; Zusatz: IgG free, Protease free, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Suffolk, England), 0,5 % TritonX100 (Artikelnummer: T-8787, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) in PBS, aufgetragen. Für die spezifische Färbung der präsynaptischen Anteile der Endplatte werden die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit den beiden ersten Antikörpern, Anti-Neurofilament M (NF-M; Herkunft: Hase, Artikelnummer AB1987, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts USA) und Anti-*vesicular acetylcholine Transporter* (VAcHT; Herkunft: Hase, Artikelnummer: V5387, Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri USA) in einer Verdünnung von 1:1000 in einer PBS-Lösung mit 1 % BSA und 0,25 % Triton X-100 bei 4 °C über Nacht inkubiert. Das Protein Neurofilament M kommt vor allem in den terminalen axonalen Strukturen vor und das Vesicular-Acetylcholine-Transporter-Protein hauptsächlich in der Präsynapse. Die Objektträger werden nun in einer Küvette mit Phosphatpufferlösung für je 3 mal 10 Minuten auf einem Schwenktisch gewaschen. Darauf folgt die Inkubation mit dem fluoreszierenden zweiten Antikörper Alexa fluor 488 anti-*rabbit* (Herkunft: Ziege, Artikelnummer: A11034, Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, Kalifornien USA) in einer Verdünnung von 1:300. Dieser fluoreszierende Antikörper markiert die spezifisch gebundenen, nicht fluoreszierenden primären Antikörper an den präsynaptischen Anteilen der Endplatte. Zur Darstellung der postsynaptischen Anteile der Endplatte wird zum Ansatz des zweiten Antikörpers das autofluoreszierende Toxin, α -bungarotoxin, Alexa Fluor 594 conjugate (α -BTX; Artikelnummer: B13423, Invitrogen Molecular Probes, Carlsbad, Kalifornien, USA) in einer Verdünnung von 1:1000 gegeben. Das α -bungarotoxin ist Bestandteil eines starken neurotoxischen Schlangengiftes der Bungarus-Schlange, die zur Gattung der Giftnattern gehört. Das Toxin entfaltet seine muskellähmende Wirkung durch Hemmung der Signalübertragung von der Prä- auf die Postsynapse, indem es spezifisch an die nikotinischen Acetylcholinrezeptoren bindet und diese blockiert. Das hierbei verwendete Konjugat ist mit einem fluoreszierenden Stoff verbunden und wird daher als spezifischer Marker der postsynaptischen Membranen verwendet. Der sekundäre Antikörper und das Toxin werden

zusammen in einer Phosphatpufferlösung mit 1 % BSA angesetzt und bei Raumtemperatur für 1,5 Stunden auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Danach werden die Objektträger erneut 5 mal 5 Minuten in PBS und 1 Mal kurz in destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend werden diese in Mowiol (Hoechst, Frankfurt, Deutschland) mit einem Deckgläschen eingedeckelt. Die immunhistochemische Darstellung der prä- und postsynaptischen Anteile der motorischen Endplatte ist in Abbildung 9 beispielhaft abgebildet.

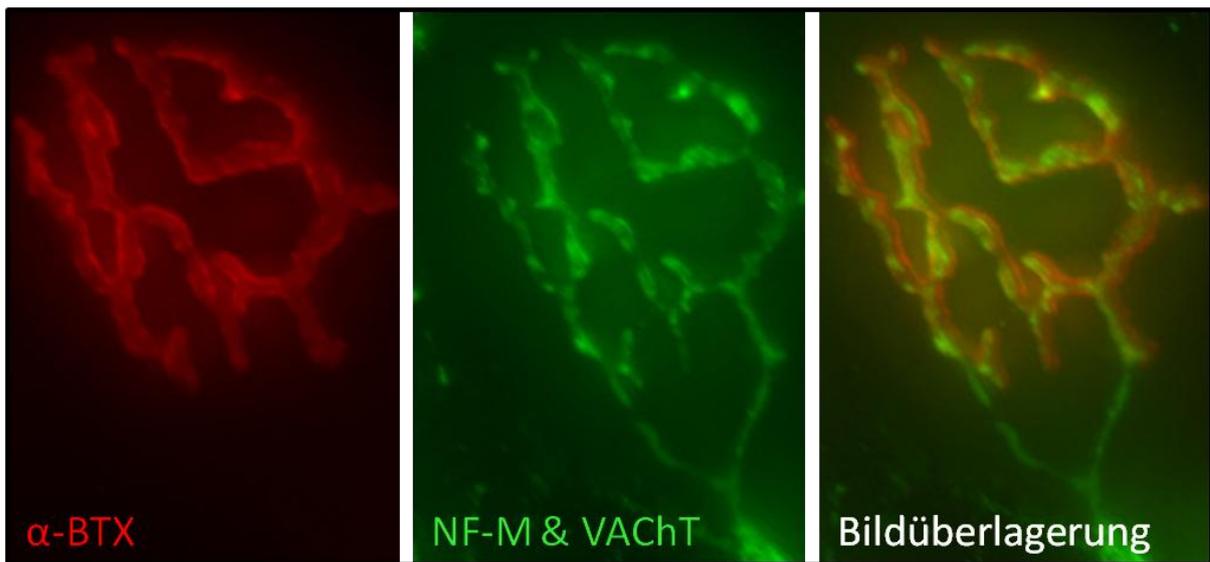


Abbildung 9 Immunhistochemische Darstellung der motorischen Endplatte

Beispielhafte Darstellung einer motorischen Endplatte eines Wildtyp-Tieres. Bildaufnahme mit Axioplan Fluoreszenzmikroskop in 40-facher Vergrößerung. Links: Färbung der postsynaptischen Anteile der motorischen Endplatte mit α -bungarotoxin (α -BTX), Mitte: Färbung der präsynaptischen Anteile der motorischen Endplatte mit Antikörper gegen Neurofilament M (NF-M) und Vesicular-Acetylcholine-Transporter (VACHT), Rechts: Bildüberlagerung von Prä- und Postsynapsenfärbung

2.7.4.4 Mikroskopie und Analyse der motorischen Endplatteninnervation

Für die Analyse der Innervationsprofile der motorischen Endplatten werden die rechten Gastrocnemiusmuskeln von 9 Weibchen aus der $SOD1^{G93A}$ Veh und 10 Weibchen aus der $SOD1^{G93A}$ Fas30-Gruppe sowie exemplarisch ein Tier aus der $SOD1^{Wt}$ -Gruppe ausgewertet. Zur Analyse des Innervationsprofils der motorischen Endplatten wird ein Axioplan Fluoreszenzmikroskop verwendet. Für die Darstellung der Präsynaptischen Anteile wird der FITC Filter (grün), für die der postsynaptischen Anteile der Cy3 Filter (rot) verwendet. Für die Auswertung wird pro Tier je ein Objektträger mit je vier horizontalen Gewebeschnitten bei 40-facher Vergrößerung analysiert. Ein Gewebeschnitt wird in einen proximalen, einen mittleren und einen distalen Bereich unterteilt. Der distale Bereich ist der Achillessehne und

der proximale dem Muskelursprung zugewandt. In jedem Bereich werden 10 Endplatten inspiziert, sodass pro Gewebeschnitt 30 und insgesamt pro Musculus-gastrocnemius-Gewebepräparat 120 Endplatten untersucht werden. Die Innervation einer Endplatte wird Anhand der Überlagerung von Prä- und Postsynapse beurteilt, dabei wird eine vollständige Innervation (>90 % Überlagerung) von einer partiellen Innervation (>25 % bis 90 % Überlagerung) und einer vollständigen Denervation (\leq 25 % Überlagerung) unterschieden. Aus allen ausgewerteten Endplatten jedes Tieres wird dann ein prozentuales Innervationsprofil erstellt.

2.7.5 Darstellung und Analyse der α -Motoneurone im Rückenmarkspräparat

2.7.5.1 Rückenmarkspräparation

Die vorbereitende Präparation der Haut und der Körperfaszie wird, wie in Kapitel 2.7.2 beschrieben, durchgeführt. Mit dem Skalpell wird die autochthone Rückenmuskulatur entfernt, bis die Wirbelbögen und Rippen zu sehen sind. Im Sinne einer beidseitigen Laminektomie wird beginnend am ersten Wirbelbogen selbiger links und rechts des Dornfortsatzes mit einer Schere mit abgewinkelter Spitze (*Iris - angled to side*, Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) durchtrennt. Behutsam wird nun mit einer abgewinkelten Pinzette (HWC 111-10, Hammacher, Solingen, Deutschland) das Knochenfragment vom Durasack abgehoben. Dieser Schritt wird bis in den Bereich des Kreuzbeines fortgesetzt, sodass das gesamte Rückenmark freigelegt wird (siehe Abbildung 10). Überstehende Reste der Wirbelbögen werden mit der Pinzette zur Seite weggebrochen. Anschließend werden die Spinalnerven abgetrennt und das gesamte Rückenmark kann vorsichtig mit einer Pinzette herausgehoben werden (Günther et al. 2012). Die Nachfixierung, Dehydrierung und Aufbewahrung wird in gleicher Systematik, wie zuvor in Kapitel 2.7.4.1 bei der Behandlung des Muskelgewebes beschrieben, durchgeführt.

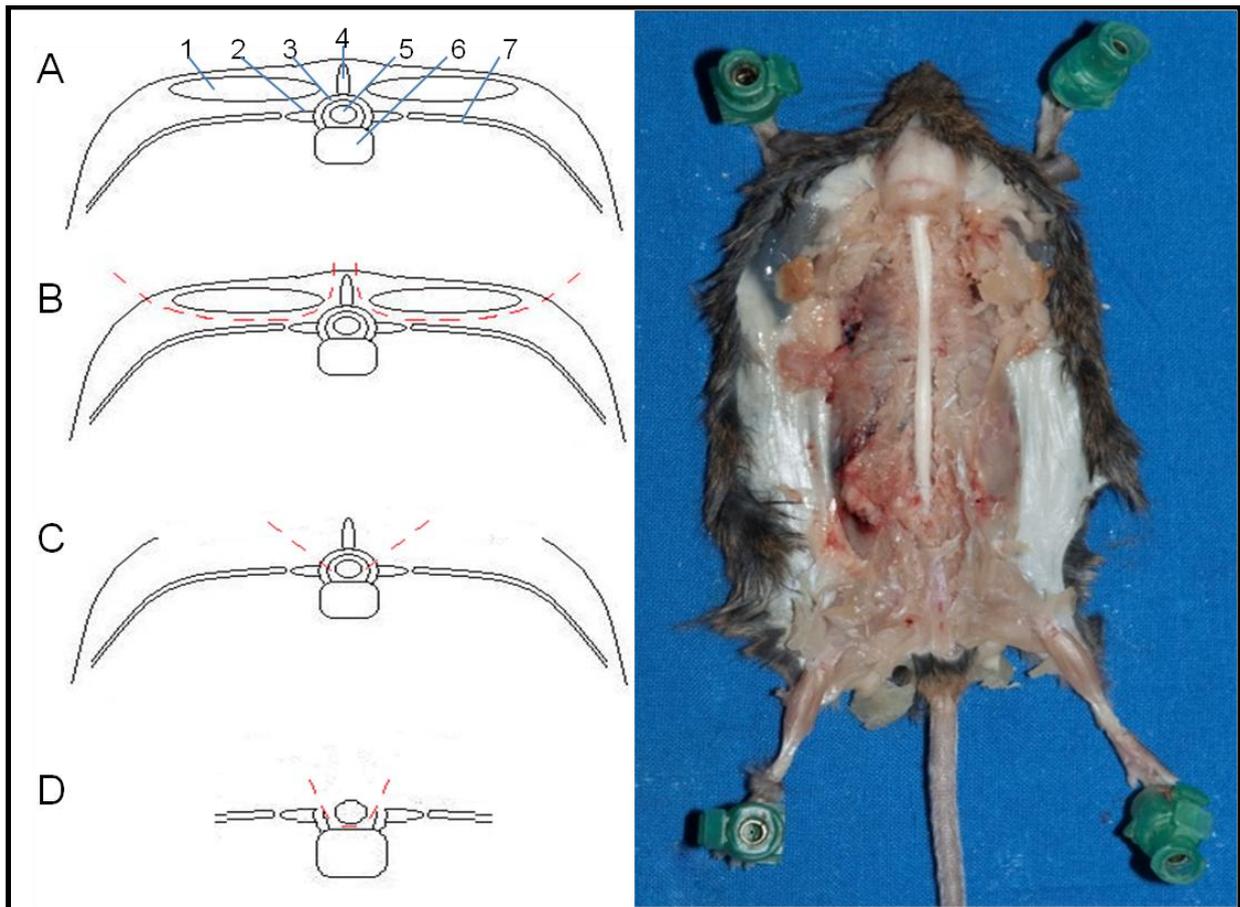


Abbildung 10 Präparation des Rückenmarks

Querschnittsskizze mit den Präparationsschritten (A-D), Schnittführung (rote Stichlinie), autochthone Rückenmuskulatur (1), Processus transversus (2), Arcus vertebrae (3), Processus spinosus (4), Rückenmark (5), Corpus vertebrae (6), Rippenbogen (7)

2.7.5.2 Gewebeaufbereitung und Darstellung der α -Motoneurone

Zunächst wird auf Höhe der unteren Intumescencia lumbalis (L3-L6) ein circa 0,3 cm langes Stück mit einem Skalpell aus dem Rückenmarkspräparat herausgeschnitten und in eine Kryomatrix eingebettet. Von caudal beginnend werden mit Hilfe eines Kryostat 20 μ m dünne transversale Gefrierschnitte angefertigt. Nach folgender Systematik werden diese auf Objektträger aufgetragen. Die ersten fünf Gewebeschnitte werden chronologisch auf die entsprechend von eins bis fünf nummerierten Objektträgern verteilt. Die darauffolgend gewonnenen Schnitte werden in gleicher Weise nacheinander wieder auf den ersten bis fünften Objektträger weiter aufgetragen, solange bis fünf Schnitte mit einem Gewebeabstand von je 100 μ m auf einem Objektträger sind. Anschließend werden nach diesem Schema weitere Objektträger bestückt. Bis zur weiteren Bearbeitung werden diese bei -20 °C aufbewahrt.

Um eine möglichst vergleichbare Höhe im Rückenmark zwischen den Tieren zu erreichen, werden die Objektträger der zugehörigen Tiere mit der gleichen Nummerierung für die nachfolgende Färbung verwendet. Zunächst wird der zu färbende Objektträger mit den Gewebeschnitten für 30 Minuten in einem Inkubationsschrank getrocknet und anschließend in einer mit Phosphatpufferlösung gefüllten Küvette für 30 Minuten auf einem Schwenktisch rehydriert. Damit möglichst viele der gewünschten Proteinbindungsstellen für die Antikörperbindung frei liegen, werden die Objektträger zunächst in einem sogenannten „Retrieval“ mit einer 10 mM Zitronensäurelösung befüllten Plastikkuvette in einem 80 °C heißem Wasserbad für 30 Minuten behandelt. Anschließend werden die Objektträger in der Küvette auf Raumtemperatur abgekühlt und danach in eine mit Phosphatpufferlösung befüllten Glasküvette für 5 Minuten auf einem Schwenktisch gewaschen. Um in den nachfolgenden Schritten ein Verlaufen der Lösungen zu vermeiden, werden die Gewebeproben auf dem Objektträger mit einem Konturstift umrandet. Um eine unspezifische Färbung des Gewebes zu unterbinden und die Eiweißbindungsstellen weiter freizulegen, wird bei Raumtemperatur für 1 Stunde eine Phosphatpufferlösung mit 5 % NDS (*Normal Donkey Serum*, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) und 0,2 % TritonX100 (T-8787, Lot 46H2616, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) aufgetragen. Im nächsten Schritt wird die vorher verwendete Lösung durch eine Phosphatpufferlösung mit dem Primärantikörper Anti-ChAT (Choline Acetyltransferase, goat, AB144 P, Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) in einer Verdünnung von 1:100 ersetzt und über Nacht bei 4 °C in einer Plastikbox abgedeckt inkubiert. Acetylcholin ist ein typischer Neurotransmitter präganglionärer Neurone des vegetativen Nervensystems, postganglionärer parasymphatischer Neurone und vor allem von Motoneuronen. Die Synthese von Acetylcholin wird durch das Enzym Cholin-Acetyltransferase (ChAT) und der Abbau durch die Acetylcholinesterase ermöglicht. Signifikante Mengen an ChAT scheinen nur in cholinergen Neuronen vorhanden und stellen damit einen geeigneten Marker für Motoneurone dar. Nach Inkubation des primären Antikörpers werden die Objektträger für 3 mal 15 Minuten in einer mit Phosphatpufferlösung gefüllten Glasküvette auf einem Schwenktische gewaschen. Danach wird eine Phosphatpufferlösung mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper Cy3 (donkey anti goat, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:300 auf die Gewebeschnitte aufgetragen und in einer abgedunkelten Plastikbox für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt

erneut ein wie zuvor beschriebener Waschschrift für 3 mal 15 Minuten. Für eine spätere eindeutige Identifikation von Zellen wird nun eine DAPI-Lösung mit einer Verdünnung von 1:5000 (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zur Färbung von Zellkernen für 10 Minuten aufgebracht. Danach wird diese in einem Waschschrift von 3 mal 5 Minuten wieder abgespült. Abschließend werden die Objektträger mit Mowiol (Hoechst, Frankfurt, Germany) mit einem Deckgläschen eingedeckelt.

2.7.5.3 Mikroskopie und Auswertung der Motoneurone

Für die Analyse der Motoneurone im Rückenmarksvorderhorn wurden je 5 Tiere aus der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe und der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe, sowie zweier nicht erkrankter Tiere aus der SOD1^{Wt}-Gruppe analysiert. Ausgewertet wurde die Gesamtanzahl der Motoneurone im Rückenmarksvorderhorn, die Anzahl in Relation zur Motoneurongröße und die kumulative Fläche der Motoneurone. Zur Quantifizierung der Motoneurone wird ein Axioplan Fluoreszenzmikroskop verwendet. Für die Darstellung der immunhistochemisch gefärbten motorischen Neurone wird ein Cy3 Filter (rot) und für die Zellkerne ein DAPI Filter (blau) verwendet. Von jedem Tier wird je ein Objektträger mit 5 Rückenmarksquerschnitten in 10-facher Vergrößerung ausgewertet. Beide Vorderhörner eines Querschnittes gehen in die Auswertung ein. Als α -Motoneurone werden alle ChAT-positiven Zellen mit einem eindeutig im Zellkörper liegenden großen Zellkern definiert und manuell ausgezählt (siehe Abbildung 11). Die Anzahl der Motoneurone wird zunächst pro Vorderhorn ausgezählt und dann später für alle ausgewerteten Vorderhörner pro Tier gemittelt. Für die Bestimmung der Zellgröße werden die definierten α -Motoneurone mit Hilfe der Axioplan Software Werkzeugfunktion „Kontur“ umrandet und deren Fläche berechnet. Dabei entspricht ein Bildpunkt einer Fläche von 0,42 μm^2 . Die kumulative Fläche der Motoneurone eines Tieres ergibt sich aus den addierten Flächen der Motoneurone pro Rückenmarksvorderhorn, gemittelt über alle Vorderhörner eines Tieres.

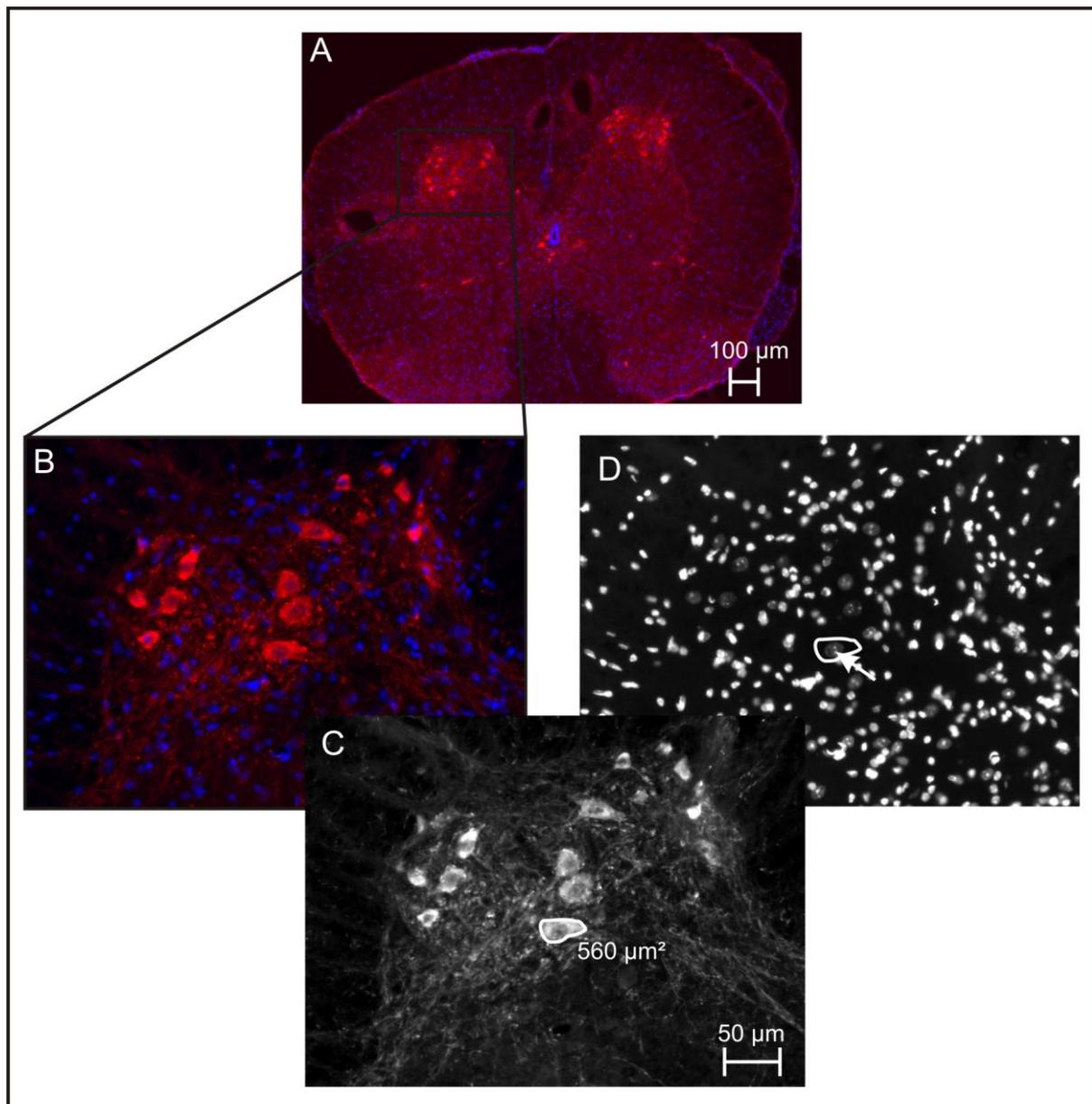


Abbildung 11 Auswertung der ChAT-Färbung.

(A) Übersichtsdarstellung eines mit ChAT (rot) und DAPI (blau) gefärbten Rückenmarksquerschnitt, (B) Ausschnitt des Vorderhorns, (C) Darstellung der ChAT-Fluoreszenz ohne Farbhinterlegung zur Ausmessung der Motoneurongröße mit der Axioplan Software, (D) DAPI-Fluoreszenz ohne Farbhinterlegung zur Darstellung der großen neuronalen Zellkerne (weißer Pfeil)

2.7.6 Elektrophysiologische Untersuchungen am SOD1-G93A-Mausmodell

Die Durchführung und Erhebung von elektrophysiologischen Daten am SOD1-G93A-Mausmodell wurde in Kooperation mit Tobias Nientiedt aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Sereda (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) durchgeführt. Hierzu wurden die unter Kapitel 2.5.2 und 2.5.5 genannten Tiere untersucht und ausgewertet.

2.7.6.1 Anästhesie

Zunächst werden die Tiere mit einer intraperitoneal applizierten Injektionslösung aus Ketamin-hydrochloride / Xylazinhydrochloride (100 mg/kg und 8 mg/kg Körpergewicht) anaesthetisiert. Dabei wird die Injektionskanüle (Braun, Melsungen, Deutschland) nach den Vorgaben und Empfehlungen des Tierversuchskurses in senkrechter Injektionstechnik in den unteren, lateral der Mittellinie gelegenen Bauchbereich eingestochen und die Medikation appliziert. Mit Hilfe von Schmerzreizen, zum Beispiel durch Kneifen in die Zehenzwischenräume, wird eine ausreichende Narkosetiefe kontrolliert. Nach circa 10 Minuten sind die Tiere unter normal regelmäßiger Atmung ohne jegliche Bewegung der Skelettmuskulatur ausreichend analgosediert. Es wird darauf geachtet, dass die Augen mit Kochsalz-Lösung vor dem Austrocknen geschützt werden.

2.7.6.2 Ablauf der elektrophysiologischen Untersuchung

Für die proximale elektrische Stimulation des Nervus ischiadicus wird ein Paar Nadelelektroden (Schuler Medizintechnik, Freiburg, Deutschland) subkutan entlang der Incisura ischiadica major platziert. Des Weiteren werden zur distalen Stimulation ein Paar Nadelelektroden oberhalb des Fußknöchels entlang des Nervus tibialis subkutan eingestochen. Um die motorischen Summenaktionspotentiale zu detektieren wird ein weiteres Paar Nadelelektroden in die Fußmuskulatur eingebracht. Nun werden mit einem Stimulator (Toennies Neuroscreen, Jaeger, Hoechsberg, Deutschland) zunächst über die proximalen Nadelelektroden supramaximale Stromimpulse (100 ms Rechteckimpulse) abgegeben, welche über den Nerven bis in die Fußmuskulatur weitergeleitet werden und hier schließlich zur Muskelkontraktion führen. Diese werden in Form von Muskelsummenaktionspotentialen

(MSAP) über die hier platzierten Nadelelektroden aufgefangen und als Welle graphisch dargestellt. Im Anschluss wird nach selben Verfahren über die distalen Nadelelektroden stimuliert. Die hierbei durch supramaximale Stimulation gewonnenen Amplituden der proximalen und distalen MSAP sowie die distal motorischen Latenzen (dmL) beider Seiten werden dokumentiert. Der Abstand zwischen beiden Stimulationspunkten wird mit Hilfe eines Maßbandes bei vollständig gestrecktem Bein gemessen und für die Berechnung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit (mNLG) in die Software des Stimulators eingegeben und berechnet.

2.7.7 Statistische Auswertung der histomorphologisch und elektrophysiologisch erhobenen Daten

Für die statistische Auswertung der histomorphologisch und elektrophysiologisch erhobenen Daten werden Tabellen und Säulendiagramme mit der Microsoft Excel Version 2007 erstellt. Gruppenunterschiede werden mit Hilfe eines zweiseitigen Student t-test auf statistische Signifikanz geprüft. Abweichungen vom Mittelwert werden als Stdf berechnet und als Fehlerbalken im Säulendiagramm dargestellt. Alle im Ergebnisteil aufgeführten Werte werden als Mittelwerte \pm Stdf angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil

Ziel der histomorphologischen und elektroneurographischen Querschnittanalyse war es, die bereits in Kapitel 1.4 dargestellten Behandlungserfolge mit Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht im SOD1-G93A-transgenen Mausmodell genauer zu untersuchen. Hierfür wurden eine neue Versuchsgruppe von SOD1-G93A-transgenen Weibchen mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) und Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) ab dem 50. Lebenstag behandelt und an Lebenstag 100 untersucht. Als Referenz wurden im gleichen Alter befindliche, unbehandelte Wildtyp-Weibchen (SOD1^{Wt}) analysiert. Die Wahl des Analysezeitpunktes von 100 Lebenstagen basiert auf den Ergebnissen der elektroneurographischen Voruntersuchungen (siehe Kapitel 3.1.4.1) und der Literaturrecherche für einen geeigneten Zeitpunkt, an dem bereits ausreichende histopathologische Veränderungen zu detektieren sind (Fischer et al. 2004).

3.1.1 Degenerative Veränderungen der Motoneurone im Rückenmarksvorderhorn

Für die Analyse der Motoneuronanzahl an Tag 100 wurden je 5 Tiere aus der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe und der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe sowie zwei nicht erkrankte Tiere aus der SOD1^{Wt}-Gruppe analysiert. Die Gesamtanzahl der Motoneurone an Tag 100 ist im unbehandelten transgenen Tier im Vergleich zum Wildtyp-Tier nur gering vermindert (nicht signifikant) (SOD1^{Wt}: 13,34 ± 1,46 Motoneurone; SOD1^{G93A}Veh: 10,54 ± 1,02 Motoneurone) und somit auch in der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe (12,54 ± 0,88 Motoneurone) im Vergleich zur SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ohne signifikante Änderung. Die Differenzierung der Motoneurone in unterschiedliche Flächengrößen mit Fläche < 450 µm² (SOD1^{G93A}Veh 3,52 ± 0,68 Motoneurone; SOD1^{G93A}Fas30 4,54 ± 0,42 Motoneurone) und > 450 µm² (SOD1^{G93A}Veh 7,01 ± 0,64 Motoneurone; SOD1^{G93A}Fas30 8,00 ± 0,66 Motoneurone) zeigt zwischen Wildtyp und SOD1-G93A-transgenem Tier sowie zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Erst bei einer Motoneuronfläche von > 650 µm² (SOD1^{Wt}: 6,91 ± 0,31 Motoneurone; SOD1^{G93A}Veh 3,79 ± 0,56 Motoneurone; SOD1^{G93A}Fas30 4,49 ± 0,53 Motoneurone) werden

signifikant weniger Zellen in den transgenen Gruppen im Vergleich zum Wildtyp gezählt. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen sind nicht festzustellen. Bei der Betrachtung der kumulativen Motoneuronfläche hebt sich die SOD1^{Wt}-Gruppe ($9081,37 \pm 323,97 \mu\text{m}^2$) von der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ($6193,88 \pm 601,49 \mu\text{m}^2$) deutlich und signifikant ab. Die SOD1^{G93A}Fas30 Gruppe ($7440,98 \pm 550,35 \mu\text{m}^2$) ist dagegen nicht signifikant schlechter im Vergleich zur SOD1^{Wt}-Gruppe (siehe Abbildung 12).

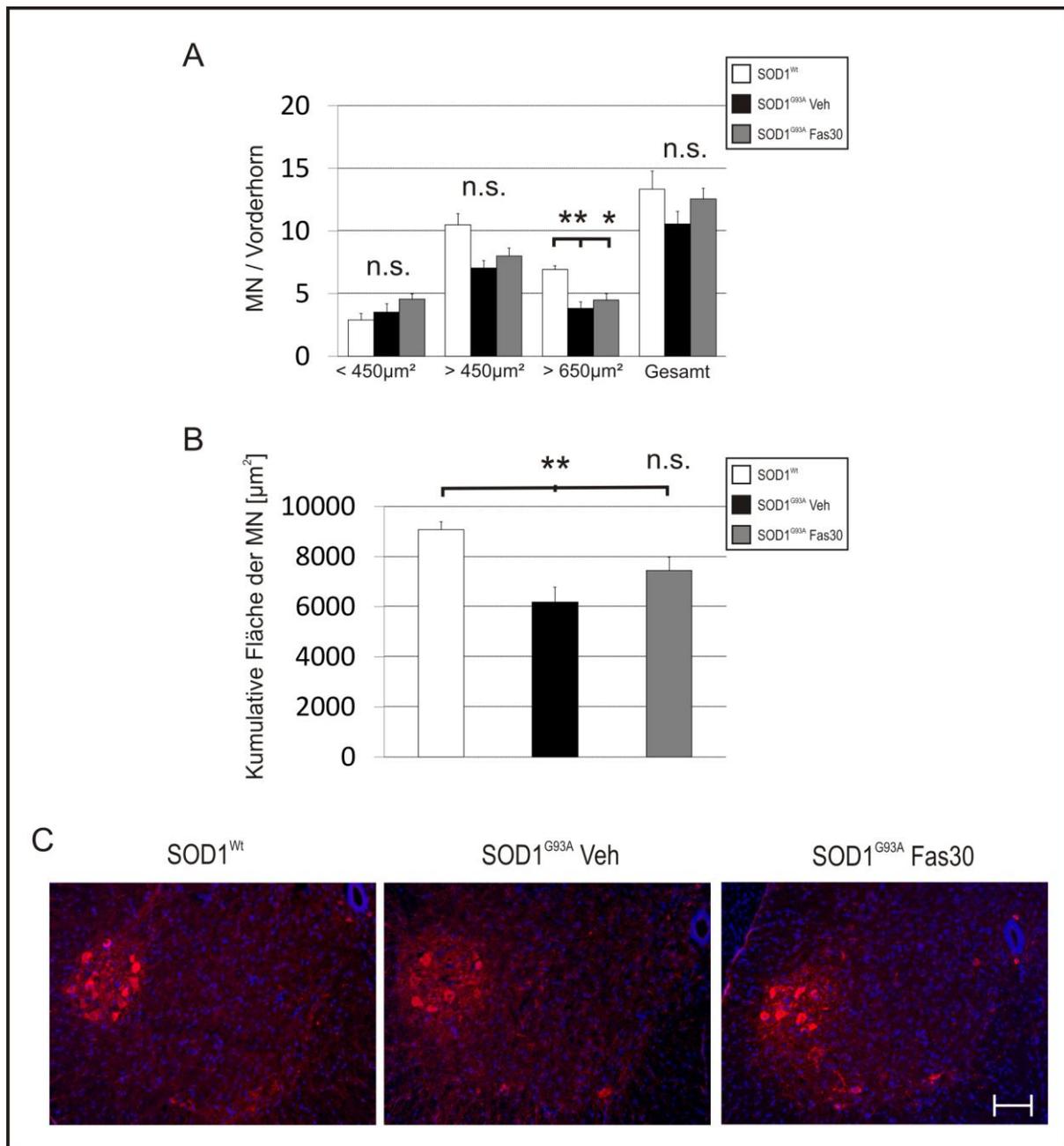


Abbildung 12 Degenerative Veränderungen der Motoneurone in der Querschnittanalyse

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Weibchen, welche mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) oder Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) behandelt wurden. Zudem wurde eine Gruppe aus SOD1-Wildtyp-Weibchen (SOD1^{WT}) als Kontrolle untersucht. In (C) werden exemplarisch die immunhistochemisch gefärbten Vorderhörner der untersuchten Gruppen dargestellt (anti-ChAT/Cy3 (rot) und DAPI (blau)). Unter (A) dargestellt ist die Anzahl der Motoneurone (MN) in Abhängigkeit der Zellfläche und die Gesamtanzahl. Unter (B) wird die kumulative Fläche der Motoneurone (MN) gegenüber gestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,05$ mit (*) und bei $p < 0,01$ mit (**) gekennzeichnet. n.s. nicht signifikant, Maßstabballen 100 µm

3.1.2 Muskelatrophie und Innervationsprofil der motorischen Endplatten

Für die Analyse der Muskelatrophie im Musculus gastrocnemius wurden 10 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe und 10 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe sowie 9 Wildtyp-Weibchen aus der SOD1^{Wt}-Gruppe an Lebenstag 100 miteinander verglichen (siehe Abbildung 13). Um die Abhängigkeit des Muskelgewichtes vom Körpergesamtwicht zu entkoppeln, wurde das gemessene Muskelgewicht in ein prozentuales Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt. Es ergeben sich signifikante Unterschiede zwischen SOD1^{Wt} (Mittelwert 0,74 ± 0,01 %) und SOD1^{G93A}Veh (0,65 ± 0,03 %). Zwischen den transgenen Gruppen SOD1^{G93A}Veh und SOD1^{G93A}Fas30 (0,64 ± 0,04 %) ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

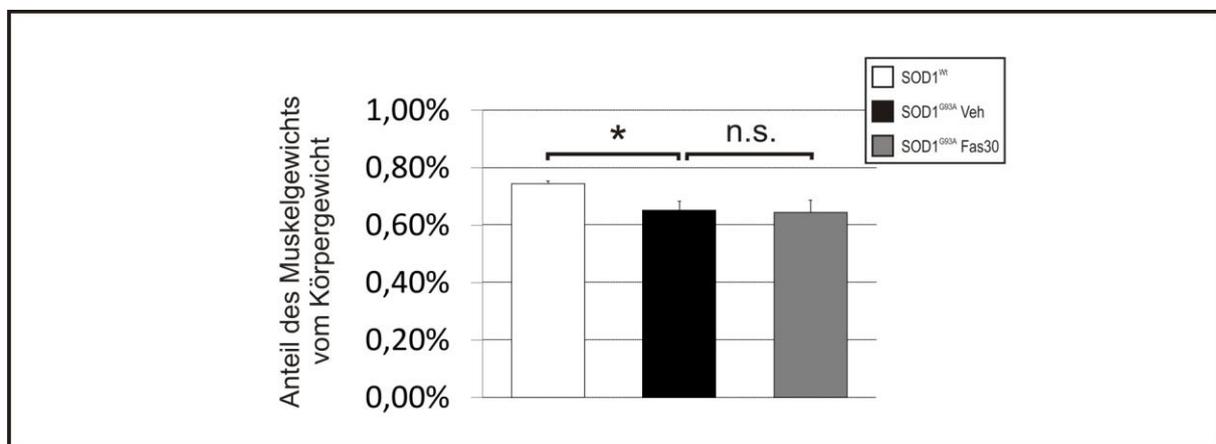


Abbildung 13 Muskelatrophie im Musculus gastrocnemius in der Querschnittanalyse

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Weibchen, welche mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) oder Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) behandelt wurden, sowie SOD1-Wildtyp-Weibchen (SOD1^{Wt}) als Kontrolle. Dargestellt ist das Muskelgewicht des Musculus gastrocnemius im Verhältnis zum Körpergewicht. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,05$ mit (*) gekennzeichnet. n.s. nicht signifikant

Die Innervationsprofile der motorischen Endplatten wurden jeweils aus den rechten Gastrocnemiusmuskeln von 9 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Veh und 10 Weibchen aus der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe erstellt (siehe Abbildung 14 Grafik A und B). Die Auswertung des Innervationsprofils umfasst die Aufteilung in vollständig innervierte (SOD1^{G93A}Veh 48,06 ± 7,08 %; SOD1^{G93A}Fas30 47,25 ± 7,31 %), partiell innervierte (SOD1^{G93A}Veh 12,5 ± 1,40 %; SOD1^{G93A}Fas30 11,67 ± 2,2 %) und denervierte Endplatten (SOD1^{G93A}Veh 39,35 ± 7,33 %; SOD1^{G93A}Fas30 40,75 ± 6,48 %). Deutliche Unterschiede ergaben sich zwischen SOD1^{Wt} und SOD1^{G93A}Veh, jedoch nicht zwischen den transgenen Gruppen.

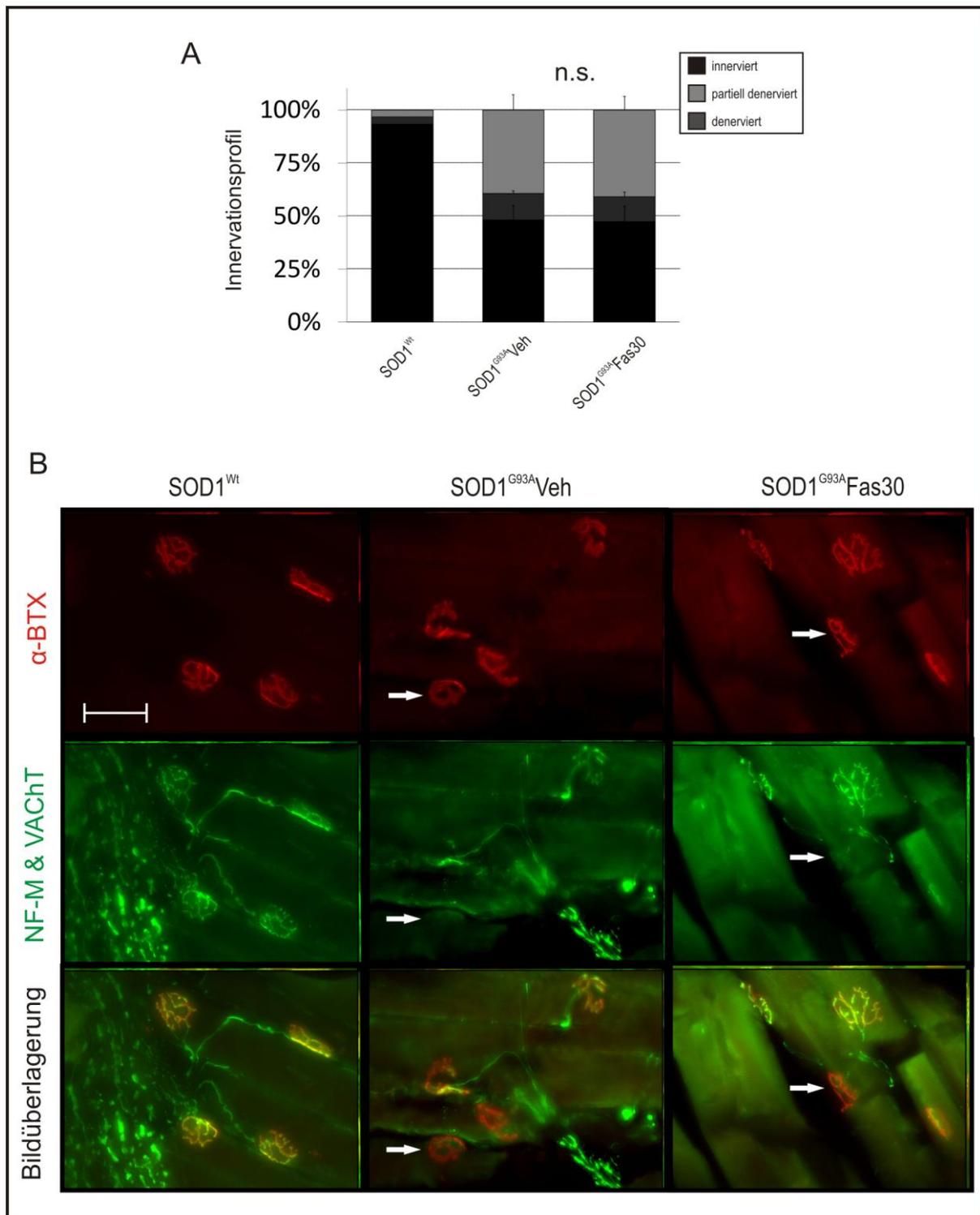


Abbildung 14 Innervationsprofil im Musculus gastrocnemius in der Querschnittsanalyse

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Weibchen, welche mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) oder Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) behandelt wurden sowie SOD1-Wildtyp-Weibchen (SOD1^{Wt}) als Kontrolle. Auswertungen des Innervationsprofils der motorischen Endplatten in vollständig innerviert, partiell denerviert und vollständig denerviert (A). In (B) sind die Innervationsprofile der motorischen Endplatten exemplarisch aus den genannten Gruppen dargestellt (rot: α -bungarotoxin (α BTX) zur Darstellung der postsynaptischen Membran; grün: Neurofilament-M (NF-M) und *Anti-vesicular acetylcholine Transporter* (VAcHT) zur Darstellung der präsynaptischen Anteile der motorischen Endplatte). Vollständig denervierte Endplatten sind mit einem weißen Pfeil markiert. Maßstab Balken 50 μ m, n.s. nicht signifikant

3.1.3 Degenerative Veränderungen im Nervus ischiadicus

3.1.3.1 Progredienter Verlust der Axonanzahl im SOD1-G93A-Mausmodell

Um die axonale Degeneration des Nervus ischiadicus im SOD1-G93A-Mausmodell zu objektivieren, wurden die Ischiadicusnerven zweier Wildtyp-Weibchen ($SOD1^{Wt}$) und je zwei Weibchen mit 110 Tagen im symptomatischen Stadium ($SOD1^{G93A}d110$) sowie mit 140 Tagen im Endstadium ($SOD1^{G93A}d140$) in einer Voruntersuchung evaluiert. Bei dieser Analyse wurde zunächst nur die Anzahl der vorhandenen vitalen Axone ausgezählt. Histologisch deutlich erkennbar ist der degenerativ veränderte Nervenquerschnitt mit bereits im symptomatischen Stadium auffälligen degenerierten Axonen (siehe Abbildung 15). Die Gesamtanzahl der Axone im symptomatischen Stadium ist deutlich vermindert und im Endstadium um über ein Drittel reduziert ($SOD1^{Wt}$: 3759 ± 24 Axone; $SOD1^{G93A}d110$: 3439 ± 44 Axone; $SOD1^{G93A}d140$: $2286,5 \pm 66,5$ Axone).

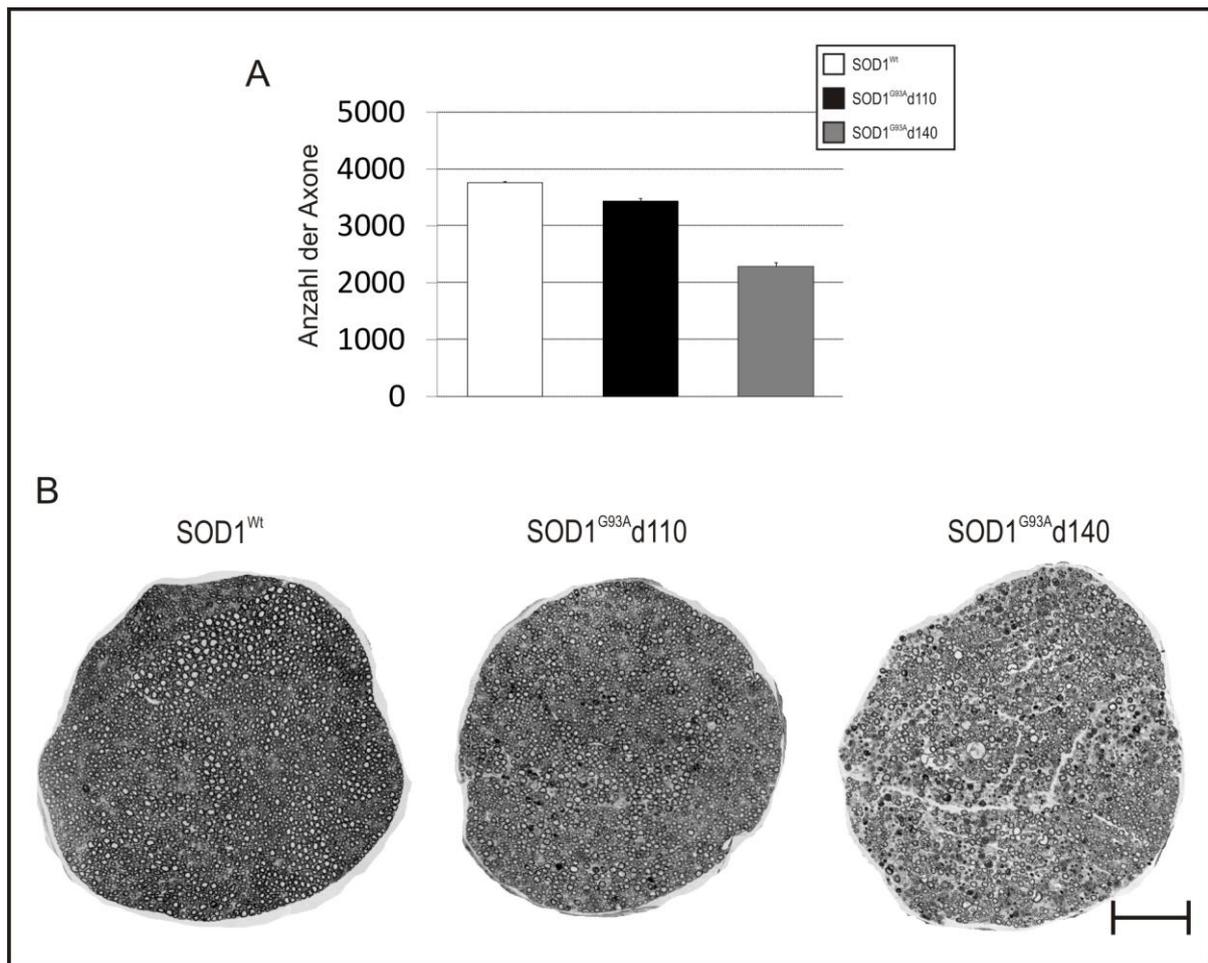


Abbildung 15 Progredienter Verlust der Axonanzahl im SOD1-G93A-Mausmodell

In (A) ist die Anzahl der Axone im Nervus-ischiadicus-Querschnitt im SOD1-Wildtyp (SOD1^{wt}) und SOD1-transgenen Tier mit 110 Tagen im symptomatischen Stadium (SOD1^{G93A}d110) und mit 140 Tagen im Endstadium (SOD1^{G93A}d140) grafisch dargestellt. Unter (B) sind exemplarisch die Nervenquerschnitte nach Myelinscheidenfärbung in lichtmikroskopischer Darstellung abgebildet. Maßstab balken 100μm

3.1.3.2 Histomorphologische Analyse des Nervus ischiadicus in der Querschnittstudie

Die histomorphologische Struktur des Ischiadicus-Querschnitts nach Fasudil-Behandlung wurde in der Querschnittsanalyse an Lebenstag 100 detaillierter untersucht. Für die Querschnittsfläche und die Axonanzahl wurden die rechten Nerven von 4 Wildtyp-Tieren aus der SOD1^{wt}-Gruppe, 6 Tiere aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe sowie von 7 Tieren der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe untersucht. Für die Analyse der Axonanzahl in Relation zum axoplasmalen Durchmesser wurden beide Nerven von 3 SOD1^{wt}-Tieren und je 4 Tieren aus der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe und der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe evaluiert. Für eine detaillierte Analyse der degenerierten Axone mussten dieselben Nervenquerschnitte aus der

Betrachtung der Axonanzahl und Querschnittfläche in einer 63-fachen Vergrößerung erneut ausgewertet werden.

In der Analyse der Querschnittfläche ergibt sich ein signifikant verminderter Querschnitt in der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ($0,13 \pm 0,0065 \text{ mm}^2$) im Vergleich zur SOD1^{Wt}-Gruppe ($0,16 \pm 0,0053 \text{ mm}^2$). Die im Vergleich zur SOD1^{G93A}Veh Gruppe höheren Werte der Querschnittfläche in der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe ($0,14 \pm 0,0092 \text{ mm}^2$) erreichen nach statistischer Prüfung keine Signifikanz (siehe Abbildung 16 Graphik A). Allerdings ist die Querschnittfläche von SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe zu SOD1^{Wt}-Gruppe nicht signifikant vermindert.

Die Anzahl der Axone (siehe Abbildung 16 Graphik B) in der Wildtyp-Kontrollgruppe ($3908,50 \pm 44,47$ Axone) sind mit $p < 0,001$ signifikant höher als in der SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ($3333,00 \pm 84,90$ Axone). Die SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe ($3311,30 \pm 89,50$ Axone) zeigt im Vergleich zur SOD1^{G93A}Veh-Gruppe hier keine signifikanten Unterschiede. In der Analyse der Axone mit deutlichen Zeichen der Degeneration (siehe Methodenteil Kapitel 2.7.3.4) erreicht die SOD1^{Wt}-Gruppe ($4,22 \pm 0,29 \%$) im Vergleich zur SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ($11,94 \pm 0,99 \%$) deutlich höhere Werte. Die Werte der SOD1^{G93A}Fas30-Gruppe ($11,33 \pm 0,47 \%$) weisen gegenüber der SOD1^{G93A}Veh Gruppe keine signifikanten Unterschiede auf (siehe Abbildung 16 Graphik C). Die Betrachtung der Axonanzahl differenziert nach axoplasmalem Durchmesser (siehe Abbildung 16 Graphik D) zeigt, dass vorwiegend die großkalibrigen Axone im transgenen Tier degenerieren. Unterschiede zwischen SOD1^{Wt}-Gruppe ($2012,50 \pm 43,00$ Axone) und SOD1^{G93A}Veh-Gruppe ($2065,00 \pm 77,61$ Axone) sind bei einem Durchmesser kleiner $3,5 \mu\text{m}$ nicht zu erkennen. Ab einem Durchmesser von $3,5 \mu\text{m}$ sind deutlich weniger Axone zählbar (SOD1^{Wt} bei $3,5\text{-}5,5 \mu\text{m}$: $1343,67 \pm 68,19$ Axone und bei $5,5\text{-}7,5 \mu\text{m}$: $450,5 \pm 2,75$ Axone; SOD1^{G93A}Veh-Gruppe bei $3,5\text{-}5,5 \mu\text{m}$: $970,5 \pm 15,67$ Axone und bei $5,5\text{-}7,5 \mu\text{m}$: $230,75 \pm 52,85$ Axone). Die Anzahl der wenigen Axone über $7,5 \mu\text{m}$ Durchmesser unterscheiden sich in allen Gruppen nicht signifikant. Zwischen den beiden transgenen Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (SOD1^{G93A}Fas30 bei $< 3,5 \mu\text{m}$: $2082,13 \pm 82,06$ Axone, bei $3,5\text{-}5,5 \mu\text{m}$: $925,38 \pm 46,61$ Axone und bei $5,5\text{-}7,5 \mu\text{m}$: $218,38 \pm 63,94$ Axone).

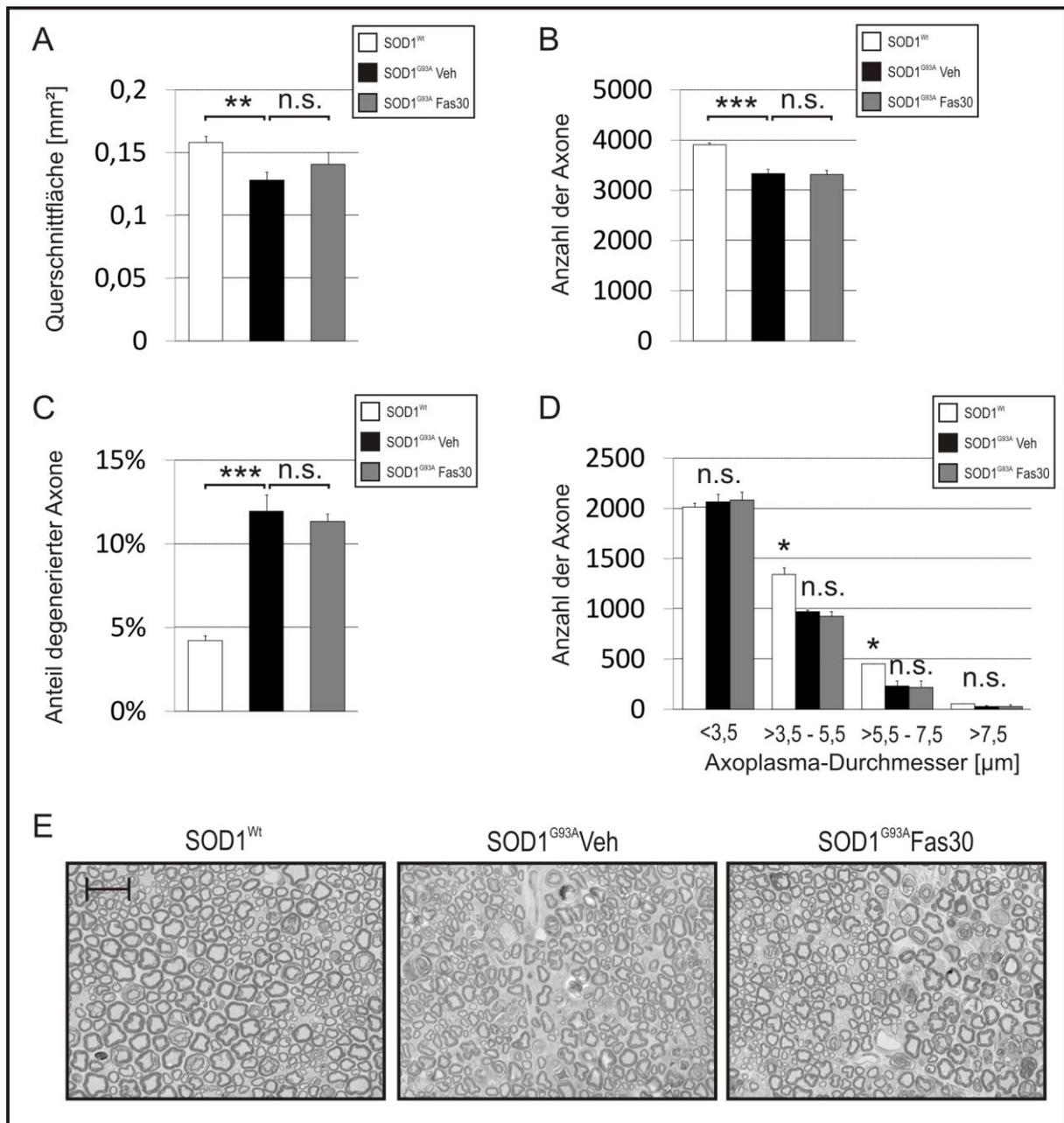


Abbildung 16 Histomorphologische Analyse des Nervus ischiadicus in der Querschnittsanalyse

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Weibchen, welche mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) oder Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) behandelt wurden. Zudem wurde eine Gruppe aus SOD1-Wildtyp-Weibchen (SOD1^{Wt}) als Kontrolle untersucht. Dargestellt sind die Auswertungen aus Querschnittsfläche (A), Anzahl der Axone (B), Anteil degenerierter Axone (C) und der Axonanzahl in Relation zum axoplasmalen Durchmesser (D). Unter (E) ist das histologische Querschnittsmuster der drei Gruppen abgebildet. Maßstababaken 25 μm. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,05$ mit (*), bei $p < 0,1$ mit (**), und bei $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet. n.s. nicht signifikant

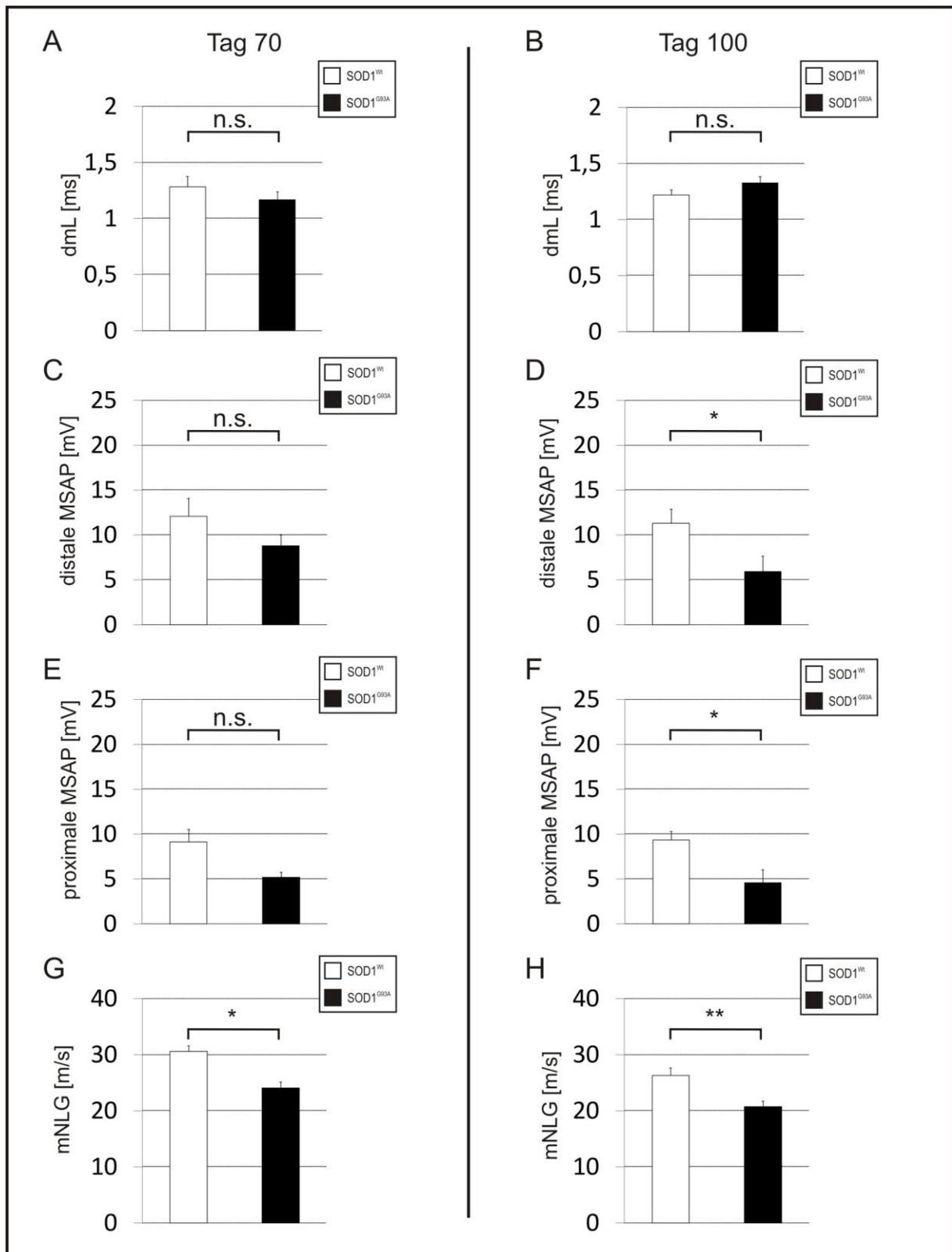
3.1.4 Elektroneurographische Untersuchung

Für die Etablierung der elektrophysiologischen Untersuchung im SOD1-G93A-Mausmodell und die Festlegung eines geeigneten Zeitpunktes für die Querschnittstudie, wurde zunächst an Lebenstag 70 und anschließend an Lebenstag 100 die elektrophysiologische Messung, wie sie in Kapitel 2.7.6 beschrieben wird, erprobt.

3.1.4.1 Elektroneurographische Vorversuche

An Lebenstag 70 wurden je drei weibliche unbehandelte SOD1-G93A-transgene ($SOD1^{G93A}$) und drei weibliche Wildtyp-Tiere ($SOD1^{Wt}$) untersucht. Wie in Abbildung 17 dargestellt sind die dmL der $SOD1^{Wt}$ -Tiere ($1,28 \pm 0,09$ ms) und der $SOD1^{G93A}$ -Tiere ($1,17 \pm 0,07$ ms) ohne wesentliche Unterschiede. Die Amplituden der distalen MSAP der Wildtyp-Tiere ($12,10 \pm 1,98$ mV) sind im Vergleich zur transgenen Gruppe ($8,78 \pm 1,23$ mV) größer, aber nach statistischer Prüfung nicht signifikant. Die Amplituden der proximalen MSAP ergeben in der $SOD1^{Wt}$ -Gruppe ($9,10 \pm 1,44$ mV) höhere Werte im Vergleich zur $SOD1^{G93A}$ -Gruppe ($5,17 \pm 0,57$ mV), die mit einem Trend von $p=0,097$ belegt werden. Die mNLG zeigen bereits an Tag 70 mit einem $p < 0,01$ signifikant höhere Werte in der $SOD1^{Wt}$ -Gruppe ($SOD1^{Wt}$: $30,63 \pm 0,95$ m/s; $SOD1^{G93A}$: $24,07 \pm 1,10$ m/s).

An Lebenstag 100 wurden je sechs weibliche unbehandelte $SOD1^{G93A}$ - und sechs weibliche $SOD1^{Wt}$ -Tiere untersucht. Wie auch an Lebenstag 70 sind auch die dmL der $SOD1^{Wt}$ -Tiere ($1,22 \pm 0,05$ ms) und der $SOD1^{G93A}$ -Tiere ($1,33 \pm 0,06$ ms) an Lebenstag 100 ohne wesentliche Unterschiede. Die distalen MSAP der $SOD1^{Wt}$ -Tiere ($11,30 \pm 1,61$ mV) sind im Vergleich zur $SOD1^{G93A}$ -Gruppe ($5,91 \pm 1,73$ mV) zum späteren Untersuchungszeitpunkt allerdings signifikant höher. Auch die proximalen Amplituden ergeben in der $SOD1^{Wt}$ -Gruppe ($9,35 \pm 0,93$ mV) signifikant höhere Werte im Vergleich zur $SOD1^{G93A}$ -Gruppe ($4,58 \pm 1,45$ mV). Die mNLG zeigen wie bereits an Tag 70 deutlich signifikant höhere Werte in der $SOD1^{Wt}$ -Gruppe ($SOD1^{Wt}$: $26,31 \pm 1,33$ m/s; $SOD1^{G93A}$: $20,72 \pm 0,98$ m/s).



3.1.4.2 Elektroneurographische Ergebnisse in der Querschnittstudie

Für die elektroneurographischen Untersuchungen in der Querschnittstudie wurden 10 SOD1^{Wt}-Weibchen und je 11 Weibchen aus den Behandlungsgruppen SOD1^{G93A}Veh und SOD1^{G93A}Fas30 am Lebenstag 100 untersucht. Auf Grundlage der Voruntersuchungsergebnisse (siehe Kapitel 3.1.4.1) ohne Unterschiede der dmL zwischen SOD1-Wildtyp und SOD1-G93A-transgenen Tieren und gleichwertigen Aussagen bei den proximalen und distalen MSAP wurden die zu untersuchenden Parameter in der Querschnittanalyse auf die Bestimmung und Analyse der mNLG und der proximalen MSAP reduziert. Die Voruntersuchungen bestätigend erreichten die SOD1^{Wt} in den proximalen MSAP ($14,74 \pm 1,21$ mV) und in den mNLG ($29,25 \pm 0,97$ m/s) signifikant höhere Werte im Vergleich zur SOD1^{G93A}Veh Gruppe (Amplituden der proximalen MSAP: $7,20 \pm 1,26$ mV; mNLG: $23,04 \pm 0,99$ m/s). Zwischen den Behandlungsgruppen SOD1^{G93A}Veh und SOD1^{G93A}Fas30 ($4,35 \pm 0,61$ mV) wurden keine signifikanten Unterschiede in den proximalen MSAP gemessen. Die erhobenen mNLG in den SOD1^{G93A}Fas30-Tieren ($21,20 \pm 1,00$ m/s) und den SOD1^{G93A}Veh-Tieren zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 18).

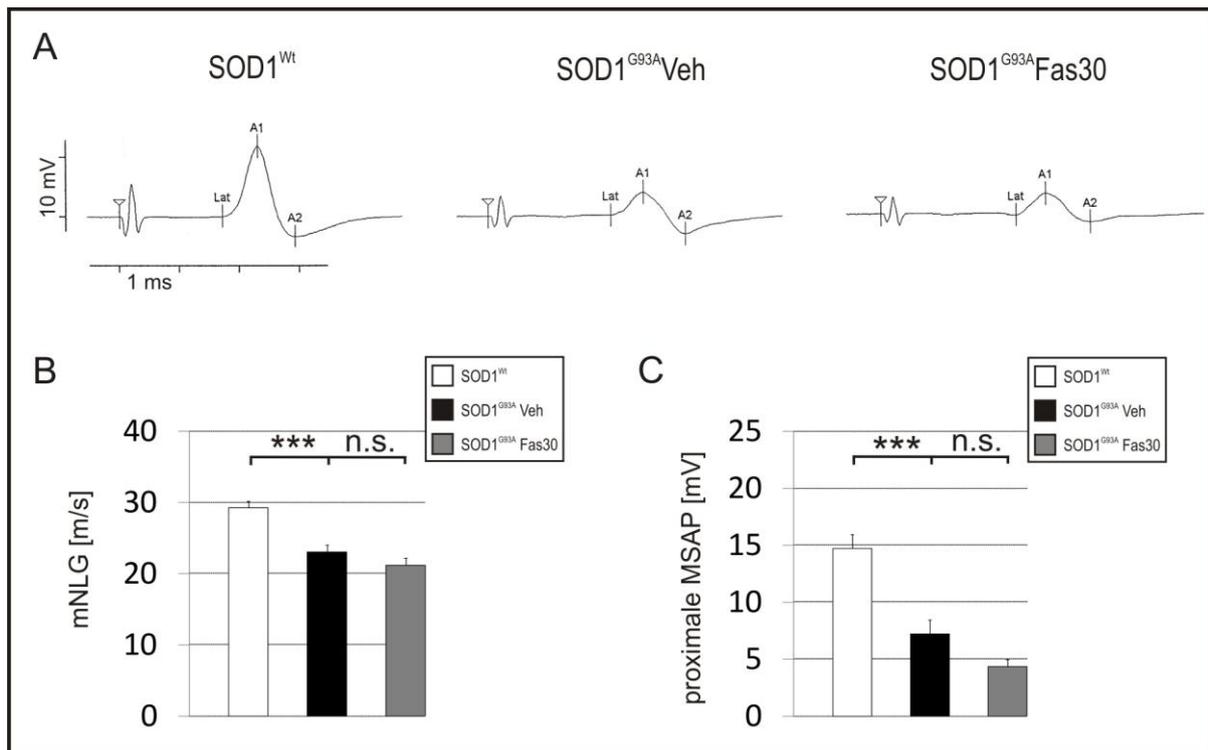


Abbildung 18 Elektroneurographische Untersuchung in der Querschnittstudie

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Weibchen, welche mit Wasser (SOD1^{G93A}Veh) oder Fasudil 30 mg/kg/Körpergewicht (SOD1^{G93A}Fas30) behandelt wurden. Zudem wurde eine Gruppe aus SOD1-Wildtyp-Weibchen (SOD1^{Wt}) als Kontrolle untersucht. Unter (A) ist die elektroneurographische Messung exemplarisch anhand der proximalen Stimulation dargestellt. In (B) sind die motorischen Nervenleitgeschwindigkeiten (mNLG), in (C) die proximalen motorische Summenaktionspotentiale (MSAP) dargestellt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,001$ mit (***) gekennzeichnet. n.s. nicht signifikant

3.2 Präsymptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632

Neben Fasudil wurden weitere ROCK-Inhibitoren mit zum Teil deutlich selektiverer Wirksamkeit zur ROCK II, wie der Substanz Y-27632, entwickelt (siehe Kapitel 1.3.2). Y-27632 stellt damit eine Alternative im Therapieansatz der pharmakologischen Inhibition der Rho-Kinasen im Mausmodell der Amyotrophen Lateralsklerose dar. Die präsymptomatische Studie mit Y-27632 soll klären, ob hiermit ähnliche Erfolge wie in der präsymptomatischen Studie mit Fasudil zu erzielen sind. Im Rahmen dieses Experimentes wurden insgesamt 16 männliche und 25 weibliche SOD1-G93A-transgene Mäuse ab dem 50. Lebensstag behandelt und mit den unter Kapitel 2.6 genannten Analysemethoden untersucht. Hiervon wurden 12 weibliche und 8 männliche Tiere mit Trinkwasser (H₂O) als Kontrolle behandelt. Der andere Teil, 13 weibliche und 8 männliche Tiere, wurden mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) über das Trinkwasser behandelt.

3.2.1 Gewichtsanalyse

3.2.1.1 Gewichtsanalyse der Weibchen

Damit alle Tiere in die Analyse einbezogen werden konnten, wurde der Gewichtsverlauf von Tag 50 bis Tag 122 begrenzt. Um den Gewichtsverlust in den letzten Versuchstagen beurteilen zu können, wurde zudem eine Analyse der letzten 10 Messzeitpunkte durchgeführt. In der Analyse der absoluten Messwerte zeigt sich ein mittleres Gewichtsmaximum in der H₂O-Gruppe an Tag 107 ($20,38 \pm 0,33$ g) und in der Y-27632-Gruppe bereits an Tag 86 ($20,65 \pm 0,43$ g). Dies entspricht einer mittleren maximalen Gewichtszunahme in der H₂O-Gruppe von 12,69 % und in der Y-27632-Gruppe von 14,61 %. In der Auswertung mit Hilfe der ANOVA mit Messwiederholungen ergaben sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 19). Der kontinuierliche Gewichtsverlust begann für beide Gruppen ab 113 Tagen. Der Verlauf des Gewichtsverlustes ergab zwischen beiden Gruppen in der ANOVA mit Messwiederholungen sowohl in Bezug auf die absoluten Werte als auch die prozentual zum Ausgangsgewicht ermittelten Werte keine signifikanten Unterschiede. Ein signifikant höheres prozentuales Gewicht gemittelt über die letzten 10

Messzeitpunkte ($p=0,031$) wurde in der Y-27632-Gruppe mit $105,97 \pm 1,26$ % im Vergleich zur H₂O-Gruppe mit $101,80 \pm 1,31$ % erreicht.

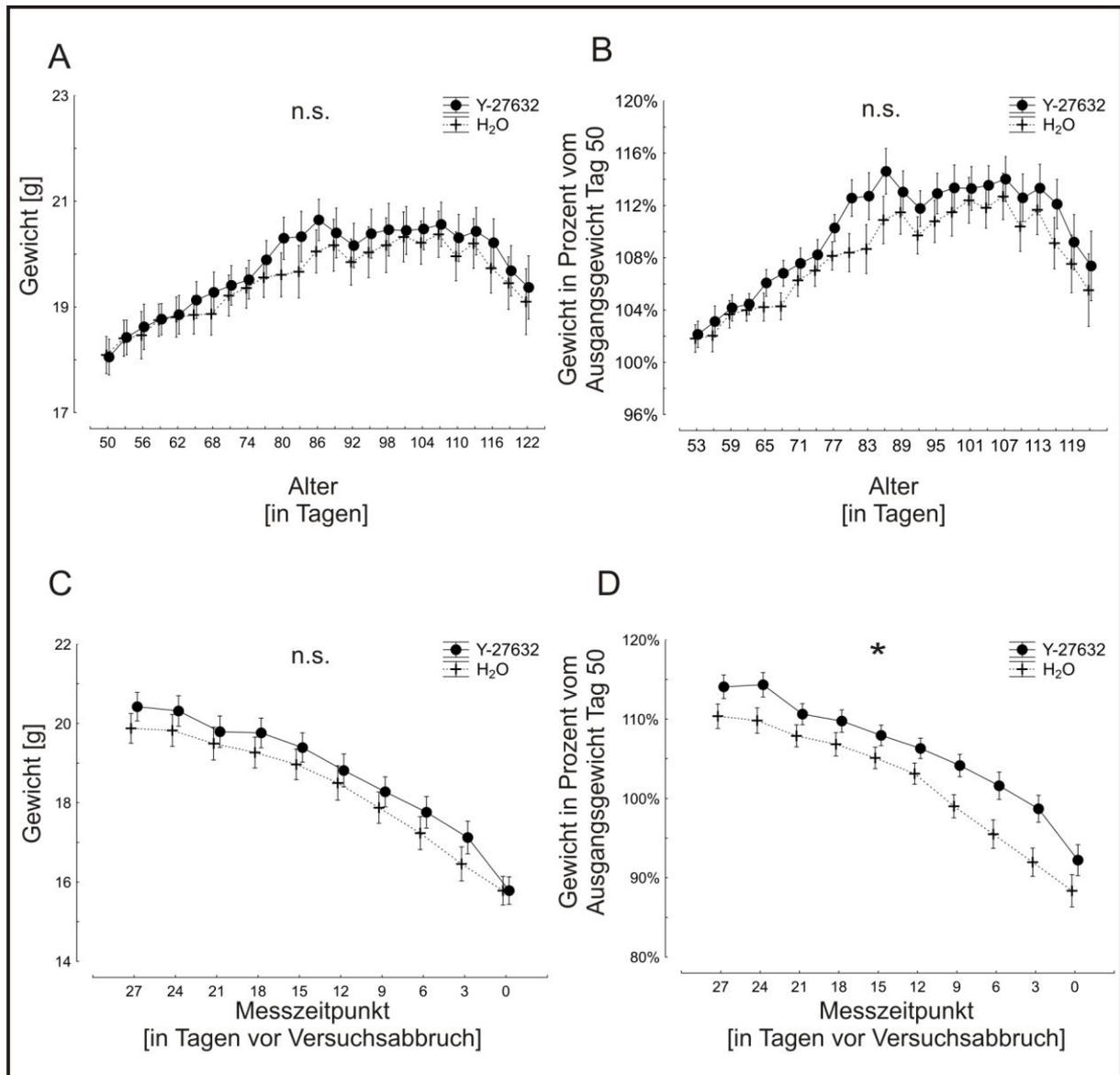


Abbildung 19 Gewichtsanalyse der Weibchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots des Gewichtsverlauf der absoluten Werte (A) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (B); der Gewichtsverlust über die letzten 10 Messzeitpunkte mit den absoluten Werten (C) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (D). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,05$ mit (*) angegeben. n.s. nicht signifikant

3.2.1.2 Gewichtsanalyse der Männchen

Wie bei der Untersuchung der weiblichen Tiere wurde eine zeitliche Begrenzung für die Gewichtsanalyse festgelegt, damit alle männlichen Tiere einbezogen werden können. Aufgrund des insgesamt schnelleren Krankheitsverlaufs der männlichen Tiere lag diese mit 116 Tagen vor der der Weibchen. Um den Gewichtsverlust in den letzten Versuchstagen beurteilen zu können, wurde auch hier eine Analyse der letzten 10 Messzeitpunkte durchgeführt. In der Analyse der absoluten Messwerte zeigte sich ein mittleres Gewichtsmaximum in der H₂O-Gruppe an Tag 98 ($24,71 \pm 0,69$ g) und in der Y-27632-Gruppe bereits an Tag 80 ($26,18 \pm 0,84$ g). Dies entspricht einer mittleren maximalen Gewichtszunahme in der H₂O-Gruppe von 6,05 % und in der Y-27632-Gruppe von 8,58 %. Die Tiere der Y-27632 behandelten Gruppe nahmen im Mittel etwas schneller und stärker an Gewicht zu, jedoch ergeben sich in der Auswertung mit Hilfe der ANOVA mit Messwiederholungen im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 20). Der Verlauf des Gewichtsverlustes ergab zwischen beiden Gruppen in der ANOVA mit Messwiederholungen sowohl in Bezug auf die absoluten Werte als auch die prozentual zum Ausgangsgewicht ermittelten Werte keine signifikanten Unterschiede. Jedoch verliert die Y-27632-Gruppe im Endstadium tendenziell etwas schneller an Gewicht, ohne hier eine statistische Signifikanz zu erreichen.

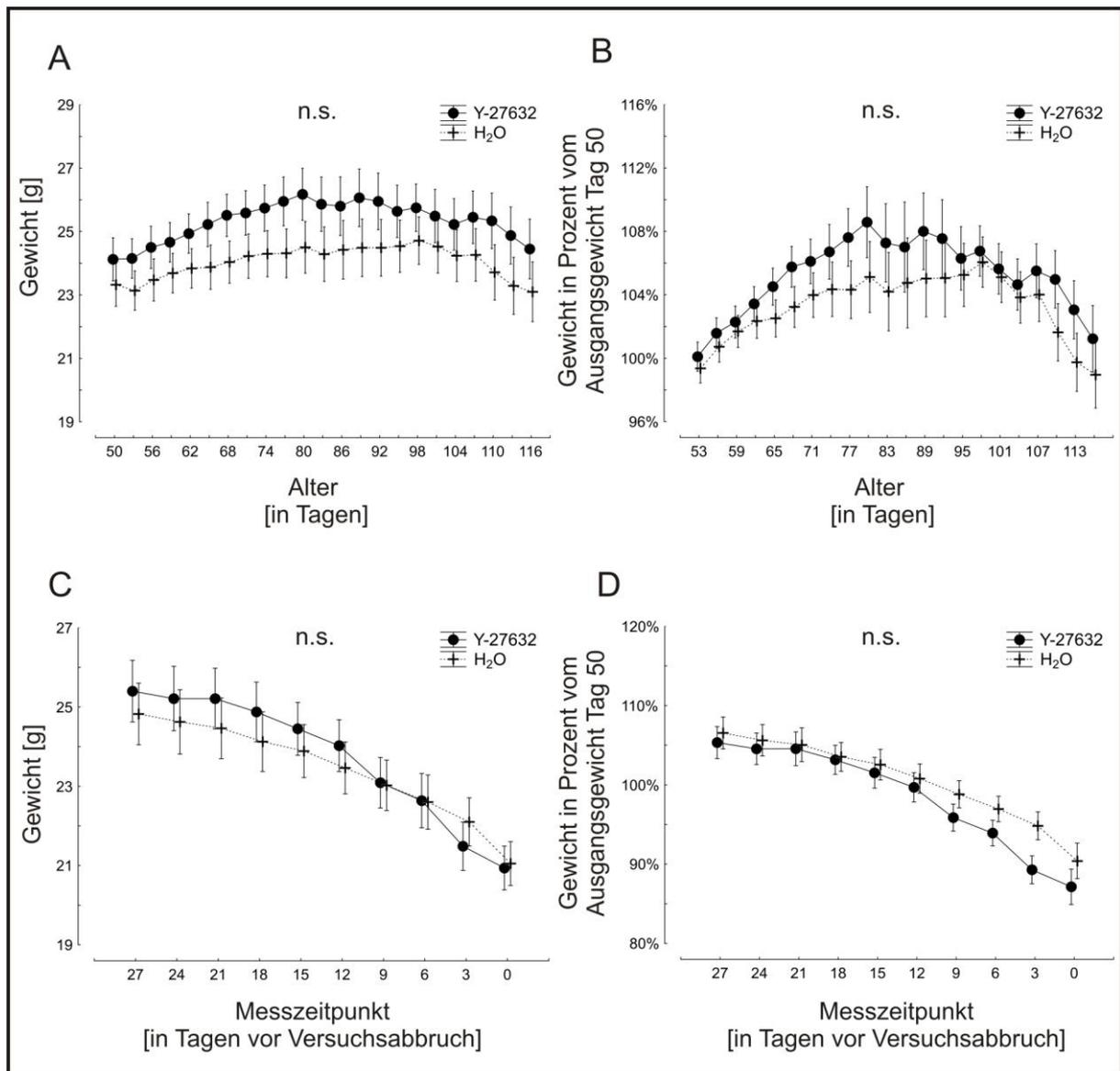


Abbildung 20 Gewichtsanalyse der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots des Gewichtsverlauf der absoluten Werten (A) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (B); der Gewichtsverlust über die letzten 10 Messzeitpunkte mit den absoluten Werten (C) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (D). n.s. nicht signifikant

3.2.2 Motorische Verhaltensanalyse

3.2.2.1 Motorische Verhaltensanalyse der Weibchen

Um eine Auswertung der weiblichen Gesamtgruppe durchführen zu können, wurde wie in der Analyse des Gewichtes die Auswertung bis einschließlich 122 Tage durchgeführt. Wie in der graphischen Darstellung in Abbildung 21 der *rotarod*-Testung zu erkennen ist, liegen die Mittelwerte der Y-27632-Gruppe ab dem Tag 89 bis Tag 122 zum Teil deutlich über denen in der H₂O-Gruppe. Die maximale Differenz zwischen den beiden Gruppen liegt an Tag 113 bei 35 Sekunden. Die statistische Auswertung in der ANOVA mit Messwiederholungen ergab jedoch zwischen der H₂O-Gruppe und der Y-27632-Gruppe keine signifikanten Unterschiede. Die Auswertung der *hanging wire*-Testung zeigt einen fast linearen Leistungsverlust auf der Testapparatur schon mit Beginn der Testung an Tag 50 in beiden Gruppen. Nach 110 Lebenstagen ist die Leistungsfähigkeit im Mittel bereits um die Hälfte gesunken. Auch hier werden nach statistischer Analyse keine signifikanten Unterschiede gefunden.

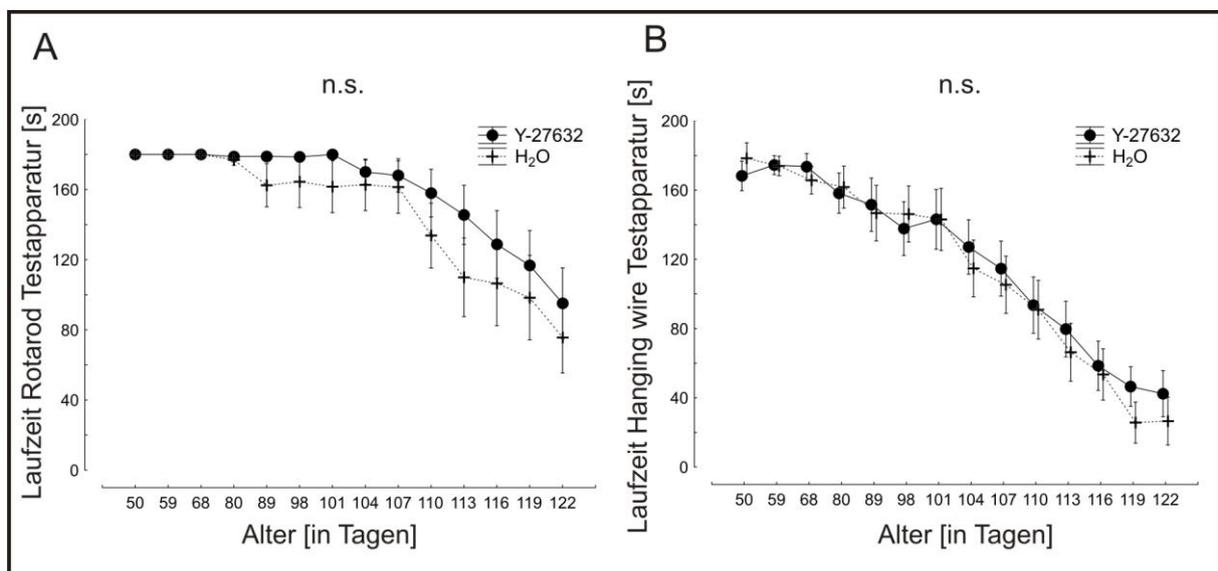


Abbildung 21 Motorische Verhaltensanalyse der Weibchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots der erreichten Zeiten im *rotarod* (A) und *hanging wire* (B) Test. n.s. nicht signifikant

3.2.2.2 Motorische Verhaltensanalyse der Männchen

Um alle männlichen Tiere in die Analyse der motorischen Verhaltenstestungen einbeziehen zu können, wurde der Zeitraum Tag 50 bis Tag 116 festgelegt. Nach statistischer Analyse über den gesamten Untersuchungszeitraum ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. In der statistischen Detailanalyse von Tag 80 bis Tag 113 erreicht die Y-27632-Gruppe im Vergleich zur Wasser-behandelten Kontrollgruppe jedoch signifikant längere Laufzeiten auf der *rotarod*-Testapparatur (siehe Abbildung 22). An Tag 110 liegen die Mittelwerte der beiden Gruppen sogar 75 s auseinander (H_2O $70,67 \pm 22,90$ s; Y-27632 $145,79 \pm 16,97$ s). Auch an den Tagen 104 (H_2O $114,04 \pm 30,24$ s; Y-27632 $168,17 \pm 11,83$ s), 107 (H_2O $117,13 \pm 26,94$ s; Y-27632 $173,31 \pm 6,69$ s) und 113 (H_2O $50,29 \pm 21,19$ s; Y-27632 $105,56 \pm 20,31$ s) erreicht die Y-27632-Gruppe über 50 s längere Laufzeiten. In der Post-hoc-Analyse werden diese Unterschiede an den Tagen 104, 107, 110 und 113 signifikant. Die Auswertung der *hanging wire*-Testung zeigt wie in der weiblichen Versuchsgruppe einen fast linearen Leistungsverlust auf der Testapparatur schon mit Beginn der Testung an Tag 50 in beiden Gruppen. Nach 101 Lebenstagen ist in der H_2O -Gruppe die Leistungsfähigkeit bereits auf die Hälfte der Ausgangsleistung abgefallen, in der Y-27632-Gruppe erst nach 110 Tagen. Nach statistischer Auswertung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

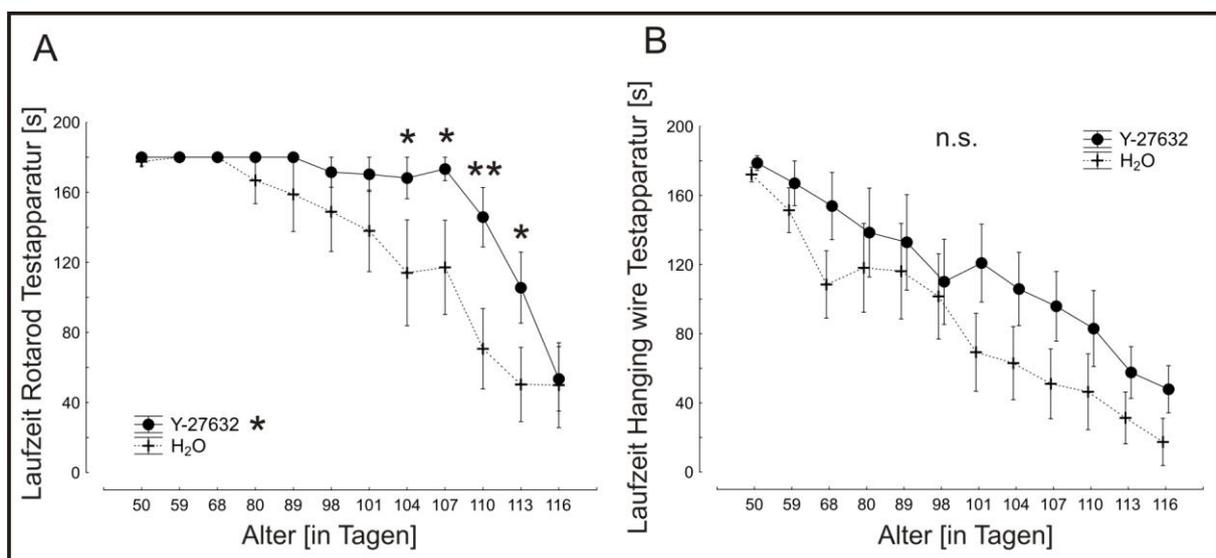


Abbildung 22 Motorische Verhaltensanalyse der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H_2O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwertplots der erreichten Zeiten in den motorischen Testungen *rotarod* (A) und *hanging wire* (B). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei $p < 0,05$ mit (*) und bei $p < 0,01$ mit (**) angegeben. n.s. nicht signifikant

3.2.3 Überlebensanalyse

Das mittlere Überleben der weiblichen Kohorte beträgt in der H₂O-Gruppe 141,2 ± 2,5 Tage und in der Y-27632-Gruppe 143,9 ± 3,4 Tage. In der männlichen Kohorte ergeben sich mittlere Überlebenszeiten von 132 ± 3,5 Tagen in der H₂O-Gruppe und 133,5 ± 2,6 Tage in der Y-27632-Gruppe. Nach statistischer Auswertung ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden weiblichen und auch den beiden männlichen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 23).

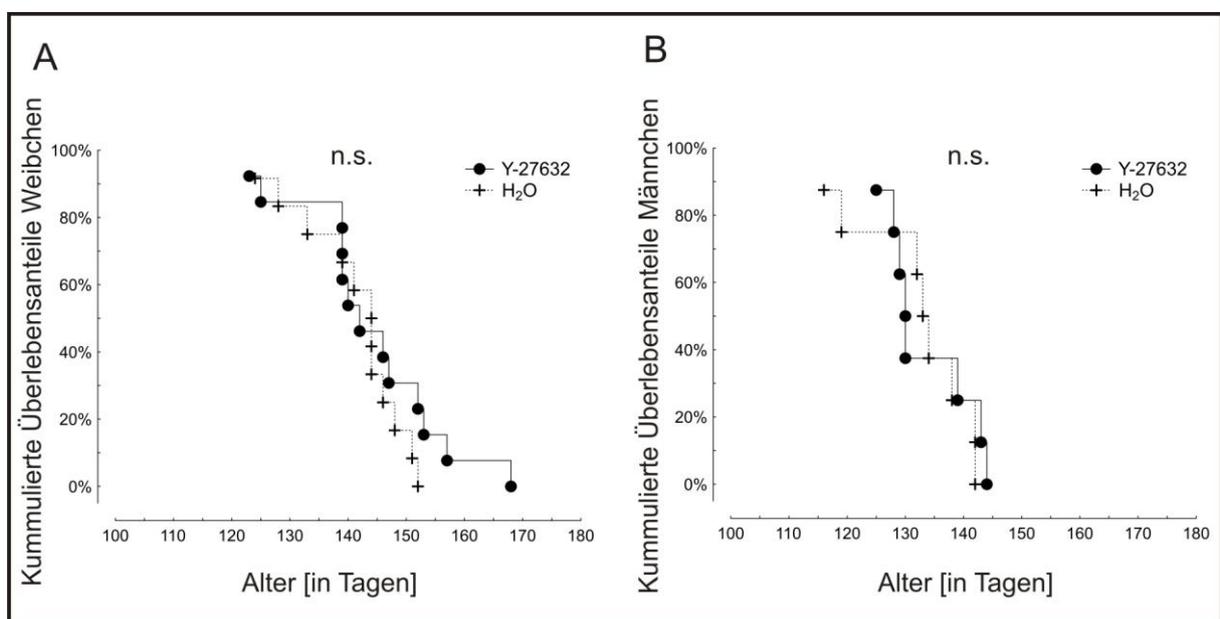


Abbildung 23 Überlebensanalyse in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Kaplan-Meier-Darstellung des Überlebens der weiblichen Kohorte (A) und der männlichen Kohorte (B). n.s. nicht signifikant

3.2.4 Krankheitsverlauf

3.2.4.1 Krankheitsverlauf der Weibchen

Die Mittelwerte des Krankheitsbeginns / Score 3 (H₂O-Gruppe 88,75 ± 3,14 Tage; Y-27632-Gruppe 84,92 ± 2,46 Tage), des Score 2 (H₂O-Gruppe 128,25 ± 1,99 Tage; Y-27632-Gruppe 131,77 ± 2,66 Tage), des Score 1 (H₂O-Gruppe 136,75 ± 2,67 Tage; Y-27632-Gruppe 141 ± 3,29 Tage) und des Score 0 (H₂O-Gruppe 141,17 ± 2,53 Tage, Y-27632-Gruppe 143,85 ± 3,39 Tage) sind nach statistischer Analyse zwischen H₂O- und Y-27632-Gruppe nicht signifikant verschieden (siehe Abbildung 24). Die Krankheitsdauer ist in der H₂O-Gruppe (52,41 ± 3,28 Tage) etwas kürzer als die Krankheitsdauer der Y-27632-Gruppe (58,92 ± 4,31 Tage), jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu erreichen.

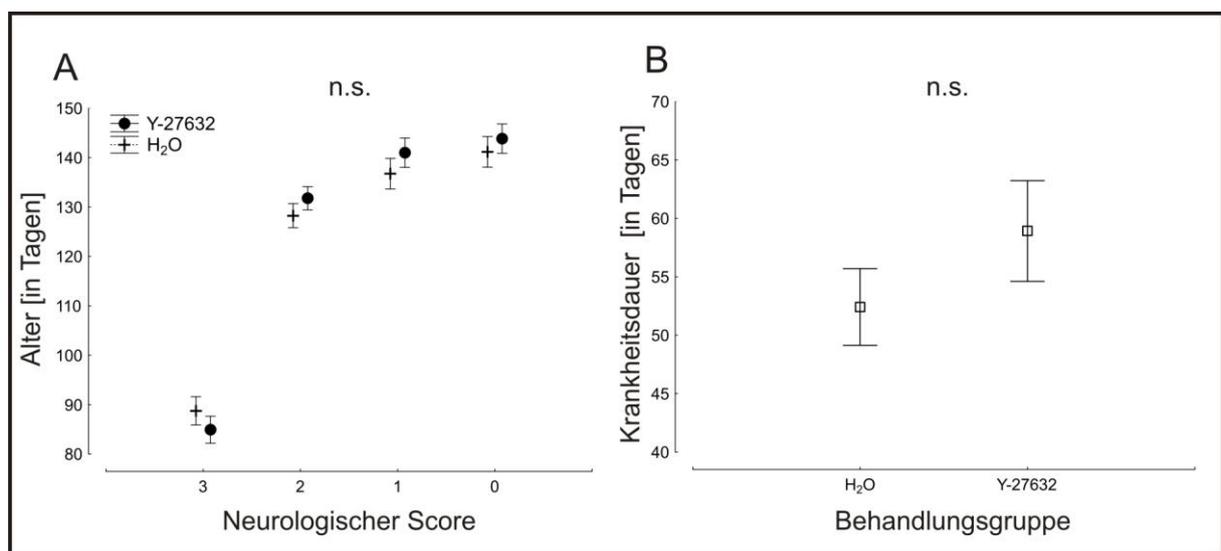


Abbildung 24 Analyse des Krankheitsverlaufes der Weibchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots für den für den neurologischen Score (A) und die Krankheitsdauer (B). n.s. nicht signifikant

3.2.4.2 Krankheitsverlauf der Männchen

Die Mittelwerte des Krankheitsbeginns / Score 3 (H₂O-Gruppe 80,63 ± 4,83 Tage; Y-27632-Gruppe 84,00 ± 4,61 Tage), des Score 2 (H₂O-Gruppe 115,13 ± 2,83 Tage; Y-27632-Gruppe 123,38 ± 2,92 Tage), des Score 1 (H₂O-Gruppe 127,88 ± 3,58 Tage; Y-27632-Gruppe 130,13 ± 2,89 Tage), sowie des Score 0 (H₂O-Gruppe 132 ± 3,45 Tage, Y-27632-Gruppe 133,5 ± 2,59 Tage) liegen in der H₂O-Gruppe vor der Y-27632-Gruppe. Statistisch signifikante Unterschiede werden nicht erreicht (siehe Abbildung 25). In der Krankheitsdauer (H₂O-Gruppe 51,38 ± 7,19 Tage; Y-27632-Gruppe 49,50 ± 6,65 Tage) zeigt sich ebenfalls kein wesentlicher Unterschied zwischen den Gruppen.

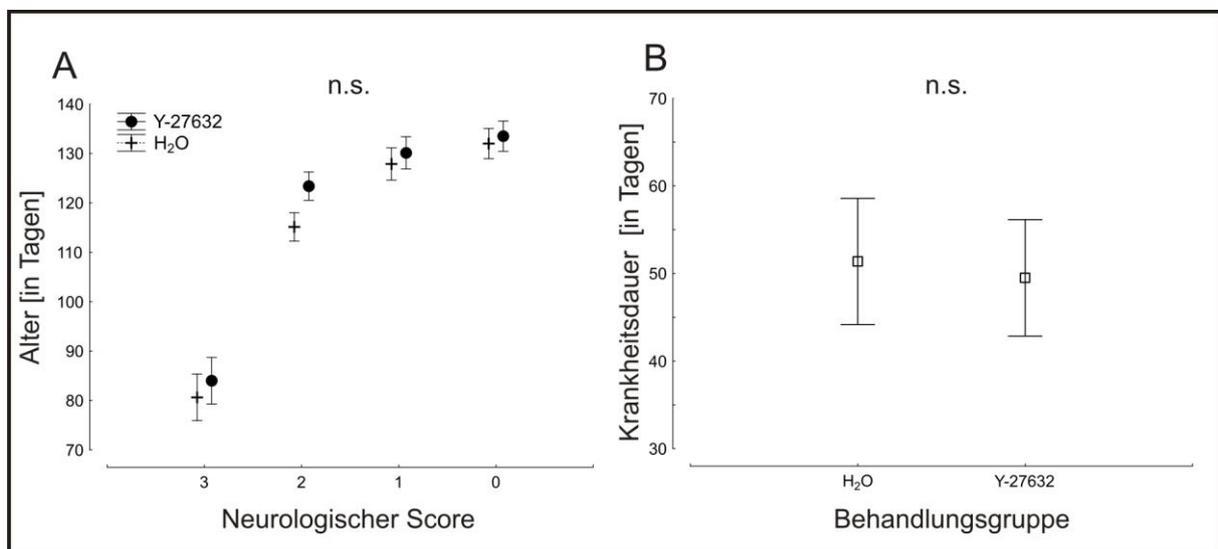


Abbildung 25 Analyse des Krankheitsverlaufes der Männchen in der präsymptomatischen Studie mit Y-27632

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O) und Y-27632 30 mg/kg Körpergewicht (Y-27632) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots für den neurologischen Score (A) und die Krankheitsdauer (B). n.s. nicht signifikant

3.3 Symptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil

Die Evaluation einer symptomatischen Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil soll klären, ob auch zu einem späteren Behandlungsbeginn noch eine Lebensverlängerung und/oder funktionelle motorische Verbesserung erzielt werden kann.

Im Rahmen dieses Experimentes wurden insgesamt 35 männliche und 43 weibliche SOD1-G93A-transgene Mäuse ab dem 80. Lebenstag behandelt und mit den unter Kapitel 2.6 genannten Analysemethoden untersucht. Hiervon wurden 14 weibliche und 12 männliche Tiere mit Trinkwasser (H₂O) behandelt. Eine zweite Gruppe, 14 weibliche und 11 männliche Tiere, wurde mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und eine dritte Gruppe, 15 weibliche und 12 männliche Tiere, mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil in einer höheren Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) über das Trinkwasser behandelt.

3.3.1 Gewichtsanalyse

3.3.1.1 Gewichtsanalyse der Weibchen

Die Analyse des Gewichtsverlaufes wurde für die weiblichen Tiere von Tag 80 bis Tag 119 begrenzt, um alle Tiere einbeziehen zu können. Um den Gewichtsverlust in den letzten Versuchstagen beurteilen zu können, wurde zudem eine Analyse der letzten 10 Messzeitpunkte durchgeführt. In der Analyse der absoluten Messwerte zeigt sich ein mittleres Gewichtsmaximum in der H₂O-Gruppe an Tag 104 ($19,54 \pm 0,42$ g), in der Fas30-Gruppe an Tag 101 ($19,98 \pm 0,42$ g) und in der Fas100-Gruppe an Tag 92 ($19,86 \pm 0,46$ g). Dies entspricht einer mittleren maximalen Gewichtszunahme ab dem Tag 80 in der H₂O-Gruppe von 1,94 %, in der Fas30-Gruppe von 3,24 % und in der Fas100-Gruppe von 3,90 %. In der Auswertung mit Hilfe der ANOVA mit Messwiederholungen ergeben sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (siehe Abbildung 26). Der kontinuierliche Gewichtsverlust beginnt für die H₂O-Gruppe ab Tag 104 und für die beiden anderen Gruppen ab 107 Tagen. Der Verlauf des Gewichtsverlustes ergibt zwischen beiden Gruppen in der ANOVA mit Messwiederholungen sowohl in Bezug auf die absoluten Werte als auch die prozentual zum Ausgangsgewicht ermittelten Werte keine signifikanten Unterschiede.

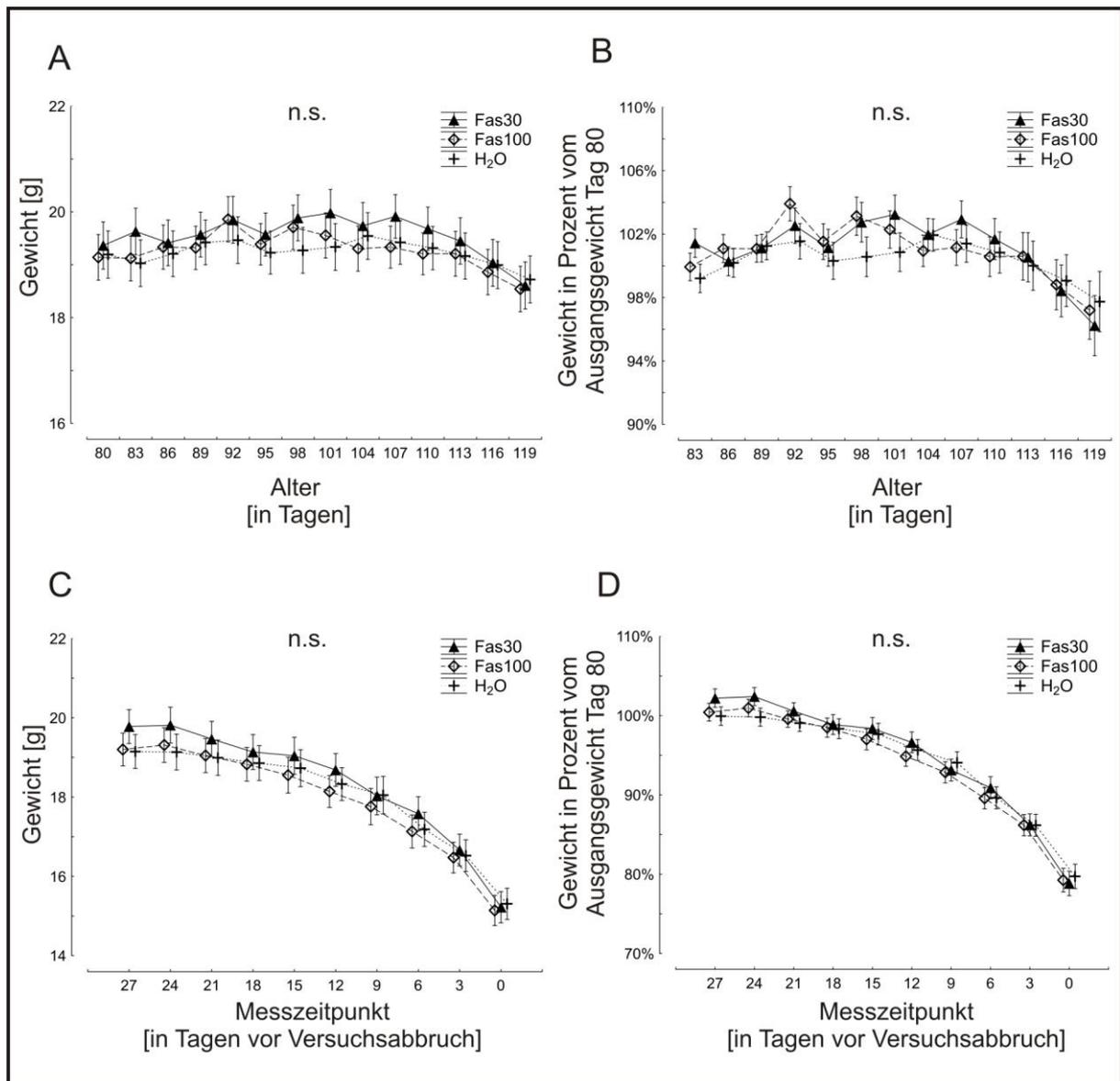


Abbildung 26 Gewichtsanalyse der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots des Gewichtsverlaufs der absoluten Werte (A) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (B); der Gewichtsverlust über die letzten 10 Messzeitpunkte mit den absoluten Werten (C) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (D). n.s. nicht signifikant

3.3.1.2 Gewichtsanalyse der Männchen

Die Analyse des Gewichtsverlaufes wurde für die männlichen Tiere von Tag 80 bis Tag 116 begrenzt, um alle Tiere einbeziehen zu können. Um den Gewichtsverlust in den letzten Versuchstagen beurteilen zu können, wurde zudem eine Analyse der letzten 10 Messzeitpunkte durchgeführt. In der Analyse der absoluten Messwerte zeigt sich ein mittleres Gewichtsmaximum in der H₂O-Gruppe an Tag 92 ($25,26 \pm 0,48$ g), in der Fas30-Gruppe an Tag 101 ($24,89 \pm 0,67$ g) und in der Fas100-Gruppe an Tag 95 ($24,94 \pm 0,43$ g). Dies entspricht einer mittleren maximalen Gewichtszunahme ab dem Tag 80 in der H₂O-Gruppe von 0,41 %, in der Fas30-Gruppe von 2,01 % und in der Fas100-Gruppe von 1,60 %. In der Auswertung mit Hilfe der ANOVA mit Messwiederholungen ergeben sich im Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Die in Abbildung 27 B dargestellten, im Vergleich zu den beiden Fasudil-Behandlungsgruppen niedrigeren Werte in der H₂O-Gruppe zwischen 98 und 110 Tagen, sind jedoch auch nach einer Detailanalyse in einer ANOVA mit Messwiederholungen von 83 bis 110 Tagen nicht signifikant. Der kontinuierliche Gewichtsverlust setzt für die H₂O-Gruppe bereits ab Tag 92 ein. Für die Fas30-Gruppe ist dies erst ab Tag 101 und für die Fas100-Gruppe ab Tag 95 der Fall. Der Verlauf des Gewichtsverlustes ergibt zwischen den Gruppen in der ANOVA mit Messwiederholungen in Bezug auf die absoluten Werte und die prozentualen Werte keine signifikanten Unterschiede.

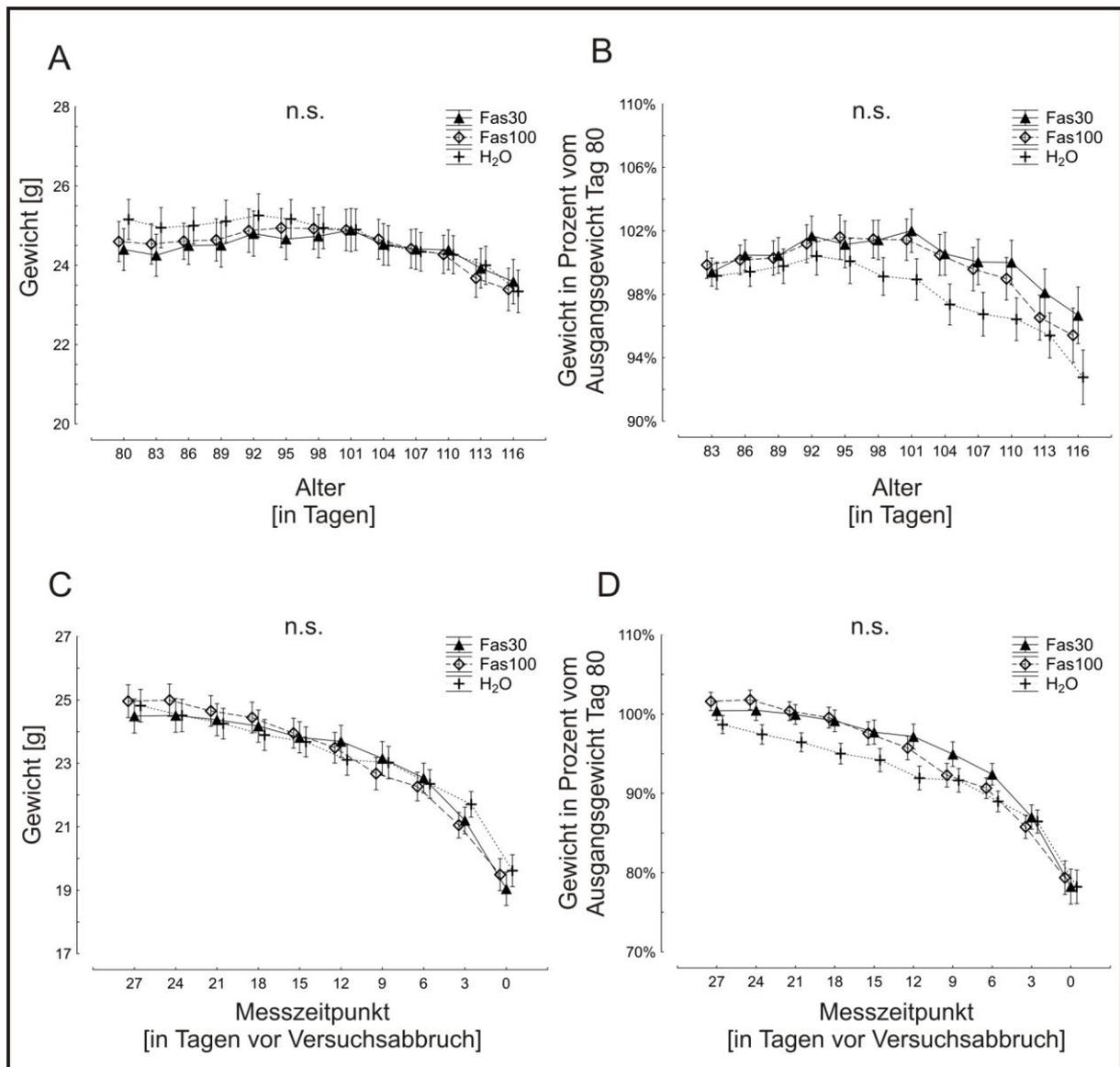


Abbildung 27 Gewichtsanalyse der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots des Gewichtsverlauf der absoluten Werte (A) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (B); der Gewichtsverlust über die letzten 10 Messzeitpunkte mit den absoluten Werten (C) und als prozentuales Verhältnis zum Startgewicht Tag 50 (D). n.s. nicht signifikant

3.3.2 Motorische Verhaltensanalyse

3.3.2.1 Rotarod-Verhaltensanalyse der Weibchen

Es wird eine Begrenzung der Auswertung bis Tag 119 festgelegt, um alle Tiere in die Auswertung einzuschließen. Nach statistischer Auswertung ergeben sich zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 28).

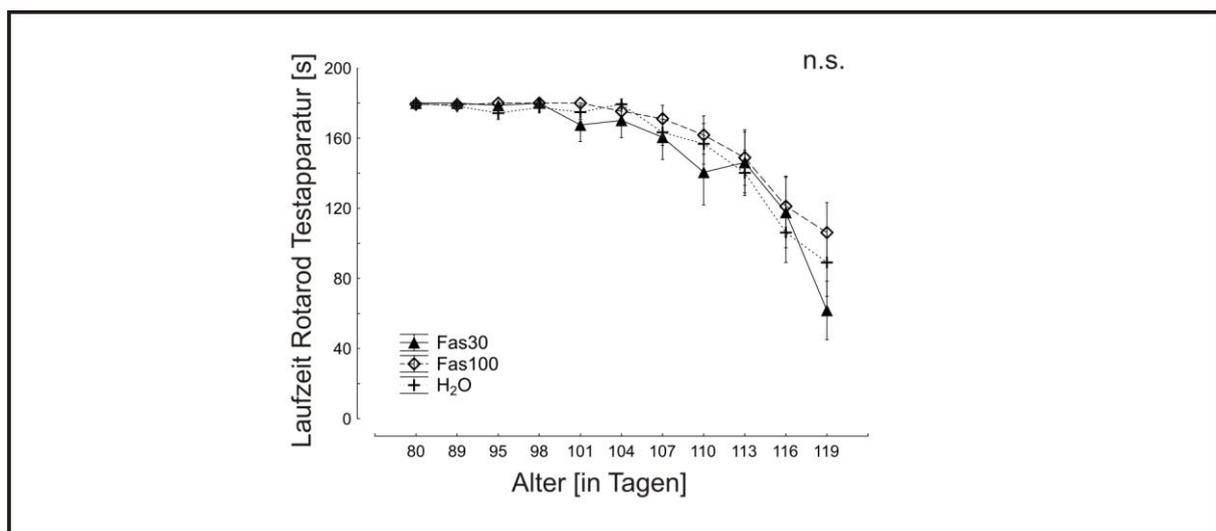


Abbildung 28 Rotarod-Verhaltensanalyse der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots der erreichten Zeiten auf der *rotarod*-Testapparatur. n.s. nicht signifikant

3.3.2.2 Rotarod-Verhaltensanalyse der Männchen

Es wird eine Begrenzung der Auswertung bis Tag 116 festgelegt, um alle Tiere in die Auswertung einzuschließen. Die Mittelwerte der Fas30-Gruppe und Fas100-Gruppe liegen in der männlichen Kohorte teilweise deutlich über denen der H₂O-Gruppe. Die maximale Differenz zwischen den gemittelten *rotarod*-Laufzeiten der Fas30-Gruppe und der H₂O-Gruppe liegt an Tag 107 bei 55 Sekunden. Zwischen der Fas100-Gruppe und der H₂O-Gruppe werden sogar noch größere Laufzeitdifferenzen erreicht. Die maximale mittlere Laufzeitdifferenz wird an Tag 110 mit 72 Sekunden erreicht. In der Detailanalyse von Tag 80 bis 110 werden in der ANOVA mit Messwiederholungen signifikante Differenzen errechnet (siehe Abbildung 29). Mittels Post-hoc-Test ergeben sich signifikant längere Laufzeiten in der Fas100-Gruppe im Vergleich zur H₂O-Gruppe an Tag 101 (H₂O 132,86 ± 20,76 s; Fas 100 175,56 ± 4,45 s), an Tag 107 (H₂O 97,90 ± 23,49 s; Fas100 160,42 ± 15,09 s) und an Tag 110

(H₂O 81,64 ± 22,42 s; Fas100 153,92 ± 15,14 s). Zwischen Fas30-Gruppe und H₂O-Gruppe ergeben sich an Tag 107 (H₂O 97,90 ± 23,49 s; Fas30 153,58 ± 16,04 s) und an Tag 110 (H₂O 81,64 ± 22,42 s; Fas30 133,91 ± 17,28 s) signifikant längere Laufzeiten in der Fas30-Gruppe.

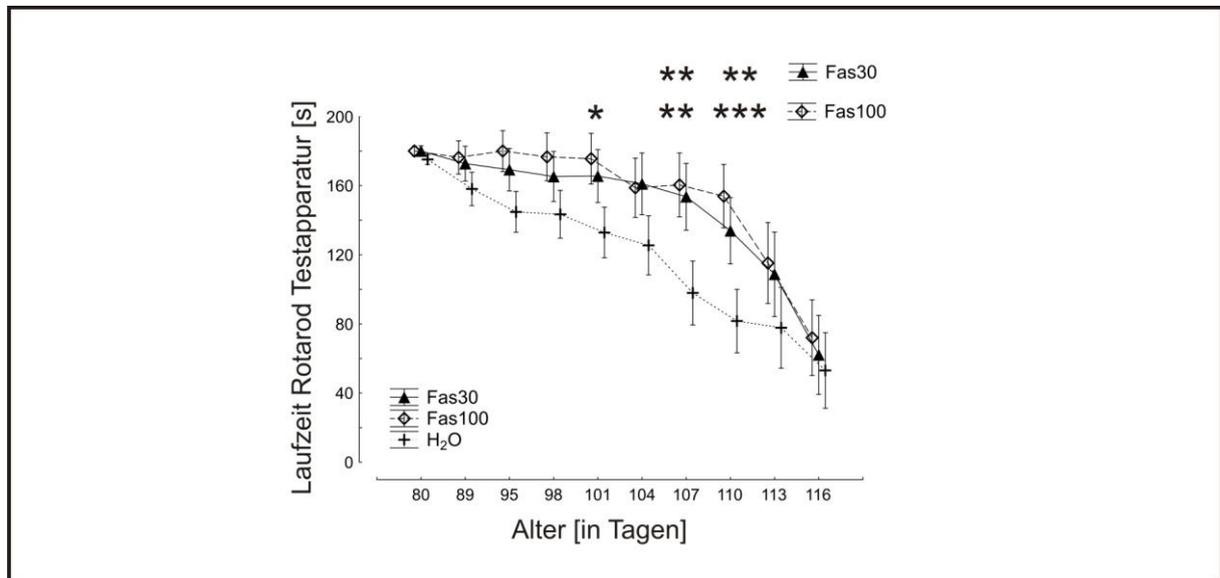


Abbildung 29 Rotarod-Verhaltensanalyse der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots der erreichten Zeiten auf der *rotarod*-Testapparatur. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an den einzelnen Testtagen sind bei $p < 0,05$ mit *, bei $p < 0,01$ mit ** und bei $p < 0,001$ mit *** angegeben.

3.3.3 Überlebensanalyse

Das mittlere Überleben der weiblichen Kohorte beträgt in der H₂O-Gruppe $139,1 \pm 2,7$ Tage, in der Fas30-Gruppe $135,9 \pm 1,8$ Tage und in der Fas100-Gruppe $136,7 \pm 1,7$ Tage. In der männlichen Kohorte ergeben sich mittlere Überlebenszeiten von $131,7 \pm 2,8$ Tagen in der H₂O-Gruppe, $131,9 \pm 1,8$ Tage in der Fas30-Gruppe und $131,9 \pm 2,1$ Tage in der Fas100-Gruppe. Nach statistischer Analyse mit log-Rank-Test ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei weiblichen und auch den drei männlichen Behandlungsgruppen (siehe Abbildung 30).

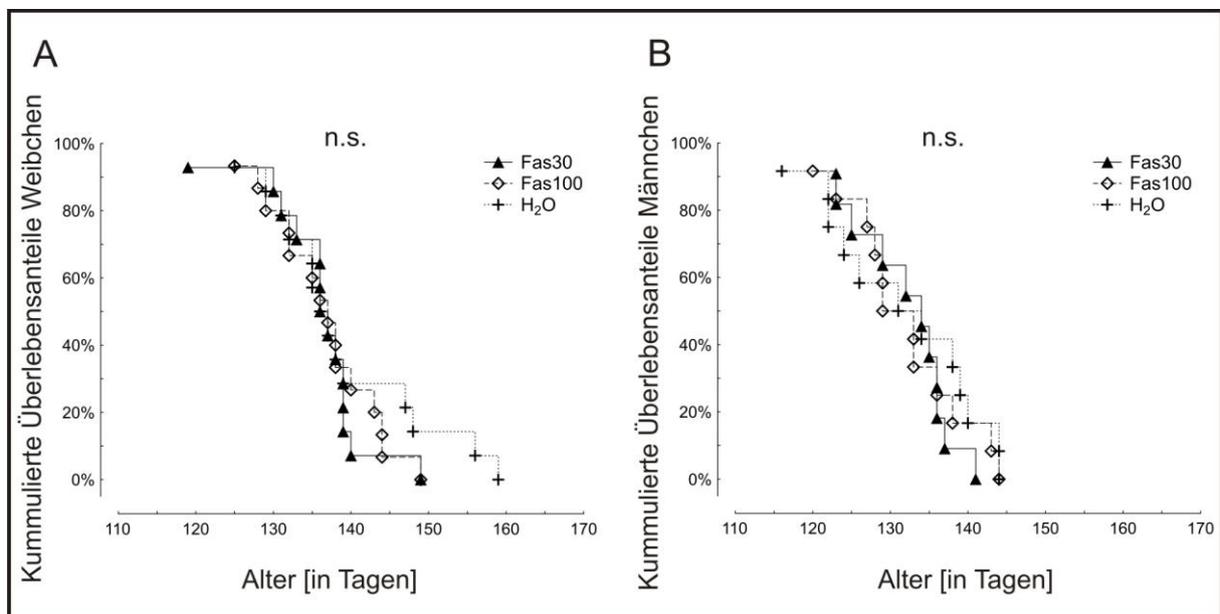


Abbildung 30 Überlebensanalyse in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Kaplan-Meier-Darstellung des Überlebens der weiblichen Kohorte (A) und der männlichen Kohorte (B). n.s. nicht signifikant

3.3.4 Krankheitsverlauf

3.3.4.1 Krankheitsverlauf der Weibchen

Die Mittelwerte des Krankheitsbeginns / Score 3 (H₂O-Gruppe 93,50 ± 1,53 Tage; Fas30-Gruppe 94,29 ± 1,42 Tage; Fas100-Gruppe 95,07 ± 1,95 Tage), des Score 2 (H₂O-Gruppe 125,00 ± 2,05 Tage; Fas30-Gruppe 123,29 ± 1,70 Tage; Fas100-Gruppe 124,60 ± 1,42 Tage), des Score 1 (H₂O-Gruppe 134,79 ± 2,71 Tage; Fas30-Gruppe 130,50 ± 1,89 Tage; Fas100-Gruppe 132,06 ± 1,83 Tage) und des Score 0 (H₂O-Gruppe 139,07 ± 2,66 Tage; Fas30-Gruppe 135,86 ± 1,78 Tage; Fas100-Gruppe 136,67 ± 1,73 Tage) zeigen keine großen Unterschiede und sind auch nach statistischer Prüfung nicht signifikant verschieden (siehe Abbildung 31). Die Krankheitsdauer ist im Mittel in der H₂O-Gruppe (45,57 ± 3,12 Tage) geringfügig länger als die der Fas30-Gruppe (41,57 ± 1,89 Tage) und der Fas100-Gruppe (41,60 ± 1,48 Tage). In der statistischen Prüfung mit einfaktorieller ANOVA erreicht dieser Vergleich jedoch keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

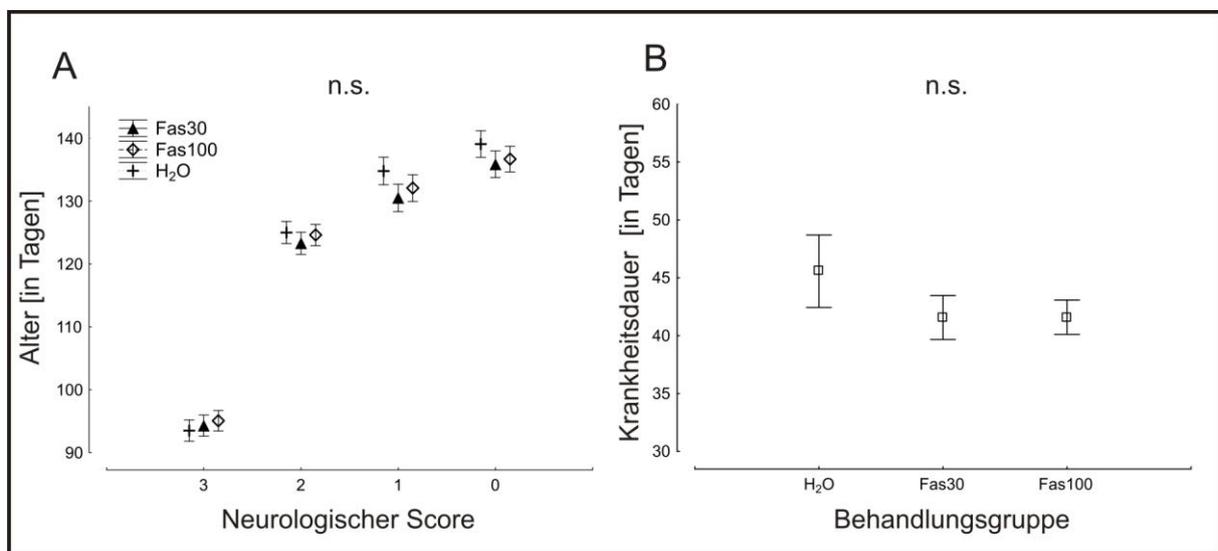


Abbildung 31 Analyse des Krankheitsverlaufes der Weibchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden weibliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots für den neurologischen Score (A) und die Krankheitsdauer (B). n.s. nicht signifikant

3.3.4.2 Krankheitsverlauf der Männchen

Die Mittelwerte des Krankheitsbeginns / Score 3 (H₂O-Gruppe 86,75 ± 2,05 Tage; Fas30-Gruppe 90,27 ± 2,45 Tage; Fas100-Gruppe 88,42 ± 2,09 Tage), des Score 2 (H₂O-Gruppe 113,33 ± 3,66 Tage, Fas30-Gruppe 117,27 ± 2,51 Tage, Fas100-Gruppe 117,42 ± 2,73 Tage), des Score 1 (H₂O-Gruppe 123,92 ± 2,81 Tage, Fas30-Gruppe 125,00 ± 1,90 Tage, Fas100-Gruppe 125,25 ± 2,44 Tage) und des Score 0 (H₂O-Gruppe 131,67 ± 2,75 Tage, Fas30-Gruppe 131,91 ± 1,84 Tage, Fas100-Gruppe 131,92 ± 2,14 Tage) zeigen nach statistischer Prüfung keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 32). Die Krankheitsdauer ist im Mittel in der H₂O-Gruppe (44,92 ± 3,31 Tage) etwas länger als die der Fas30-Gruppe (41,64 ± 3,54 Tage) und der Fas100-Gruppe (43,50 ± 2,64 Tage), nach statistischer Prüfung jedoch nicht signifikant.

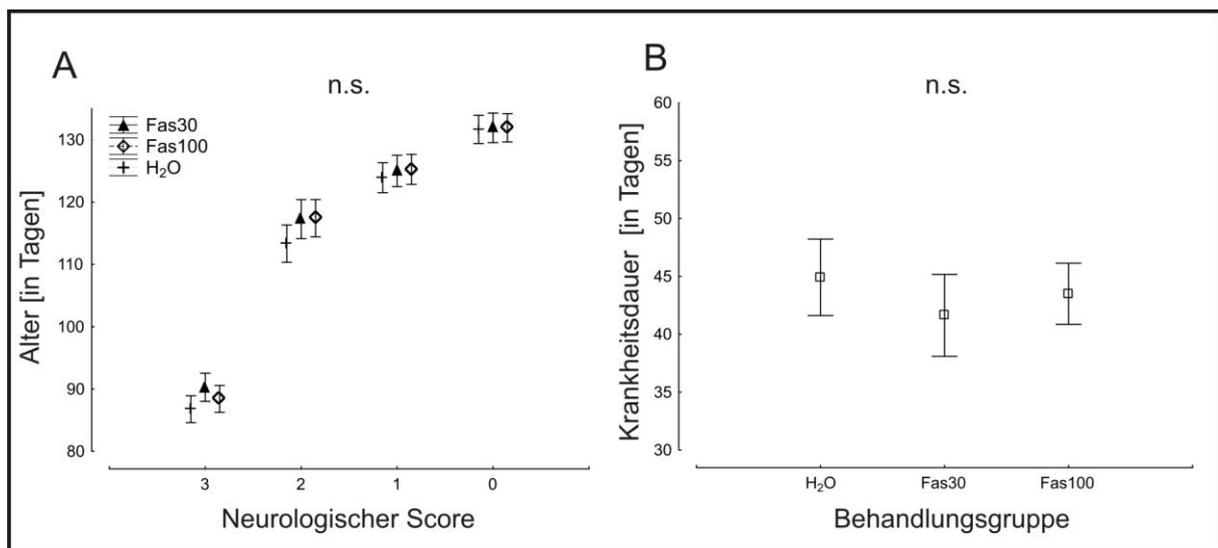


Abbildung 32 Analyse des Krankheitsverlaufes der Männchen in der symptomatischen Studie mit Fasudil

Untersucht wurden männliche SOD1-G93A-transgene Tiere, welche mit Wasser (H₂O), Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht (Fas30) und Fasudil 100 mg/kg Körpergewicht (Fas100) behandelt wurden. Dargestellt sind Mittelwert-Plots für den neurologischen Score (A) und die Krankheitsdauer (B). n.s. nicht signifikant

4 Diskussion

Ziel dieser Promotionsarbeit war zunächst die Analyse der zugrundeliegenden neurobiologischen Effekte der erfolgreichen präsymptomatischen Behandlungsstudie mit Fasudil im SOD1-G93A-Mausmodell. Hierzu wurden die Tiere am Lebenstag 100 immunhistologisch und elektrophysiologisch evaluiert. In weitergehenden Versuchen wurde der alternative ROCK-Inhibitor Y-27632 in einer präsymptomatischen Studie und nachfolgend Fasudil in einer symptomatischen Behandlungsstudie im SOD1-G93A-Mausmodell untersucht.

4.1 Querschnittstudie nach präsymptomatischer Behandlung mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil

Basierend auf dem bekannten zeitlichen Verlauf und dem Ausmaß der histologischen Veränderungen im SOD1-G93A-Mausmodell wurde der Untersuchungszeitpunkt in unserer Querschnittstudie am Lebenstag 100 festgelegt (Fischer et al. 2004). Unterstützend für diese Wahl des Untersuchungszeitpunktes fanden sich in eigenen Analysen in den elektrophysiologischen Voruntersuchungen im Vergleich zum Wildtyp bereits an Lebenstag 70 Veränderungen der mNLG und der MSAP, die sich an Lebenstag 100 noch weiter reduziert darstellten (siehe Abbildung 17). Für die Beurteilung der degenerativen Veränderungen wurden immunhistologisch sowohl die Perikarya der Motoneurone im Rückenmark als auch deren axonale Fortsätze exemplarisch im Nervus ischiadicus sowie die Integrität der motorischen Endplatten im Musculus gastrocnemius untersucht. Ergänzend erfolgte eine elektro-physiologische funktionelle Testung des Nervus ischiadicus.

4.1.1 Milde neuroprotektive Effekte auf Ebene der Motoneurone im ZNS

Die Analyse der gesamten Motoneuronanzahl, die Anzahl in Abhängigkeit der Motoneurongröße und deren kumulative Fläche am Lebenstag 100 sollten klären, ob eine Fasudilbehandlung die Degeneration der Motoneurone beeinflussen kann.

In der immunhistochemischen Analyse der Anzahl ChAT-positiver Zellen stellten sich quantitativ im Vergleich des Wildtyps zum transgenen Tier nur etwas geringere Zellzahlen dar. Im Gegensatz dazu wurde in vorangegangenen Studien am gleichen Mausmodell und am gleichen Lebensstag ein Verlust der Motoneurone um bis zu 50 % beschrieben (Fischer et al. 2004). Der in unserem Versuch gefundene Verlust der Motoneurone im Vergleich zum Wildtyp-Tier fällt mit 21 % jedoch deutlich milder aus (siehe Abbildung 12), so dass eine protektive Wirkung mit signifikanter Verbesserung des motoneuronalen Überlebens unabhängig von der Therapie nur schwer zu erzielen ist. In einer vergleichbaren präsymptomatischen Behandlungsstudie mit Fasudil im SOD1-G93A-Mausmodell wurde ein Verlust an Motoneuronen im Vergleich zum Wildtyp in der 15. Lebenswoche mit circa 35 % angegeben (Takata et al. 2013). Der Motoneuronverlust weicht hier zwar nach wie vor von Fisher et al. (2004) ab, ist jedoch deutlicher ausgeprägt als in unserer Studie. Eine mögliche Ursache für diese Unterschiede der Motoneuronenanzahl im Rückenmark des SOD1-G93A-Mausmodells liegt in der histologischen Detektion der Motoneurone, welche bei Fisher et al (2004) und Takata et al (2013) über eine Motoneuron-unspezifische Nisslfärbung umgesetzt wurde. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Analyse eine spezifischere Färbemethode mittels ChAT-Antikörper angewandt. Dieses Enzym wird im Rückenmark vorwiegend in den Motoneuronen exprimiert und dient daher der Abgrenzung zu anderen neuronalen Zellen. Darüber hinaus zeigt der Vergleich zwischen Fisher et al (2004) und Takata et al (2013) auch, dass selbst die Evaluation der Motoneuronanzahl mit der gleichen Färbemethode bei verschiedenen Experimenten substantiell abweichen kann. In unserem Experiment ist zwar ein Unterschied zu Gunsten der Fasudil-behandelten Gruppe in der Anzahl der Motoneurone im Vergleich zur Wasser-behandelten Gruppe zu erkennen, jedoch bleibt dieser ohne Signifikanz (siehe Abbildung 12). Takata et al. (2013) konnten in einer ebenfalls präsymptomatischen Behandlungsstudie mit Fasudil im SOD1-G93A-Mausmodell, in der die Behandlung jedoch bereits ab der 5. Lebenswoche und nicht wie bei uns ab dem Lebensstag 50 erfolgte, über die Analyse der Motoneuronenanzahl im Rückenmark aufzeigen, dass Fasudil neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Hierbei konnte zum Untersuchungszeitpunkt von 15 Wochen mit oben genannter Färbemethode eine signifikant höhere Anzahl von Motoneuronen in der mit Fasudil behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden (Takata et al. 2013). Bowerman et al. (2012) konnten neben

einer erfolgreichen Therapie mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632 auch mit Fasudil das Überleben im SMA-Mausmodell signifikant verlängern. Trotz eines zuvor dargestellten Zusammenhanges zwischen der SMA-Pathologie und der Induktion der Rho-Rock-Signalkaskade konnte auch hier über die alleinige Auszählung der Motoneuronanzahl keine protektive Wirkung nachgewiesen werden (Bowerman et al. 2010; Bowerman et al. 2012). Im Falle einer weiterführenden Studie an unserem SOD1-G93A-Mausmodell könnte eine Analyse der Motoneurone zu einem späteren Lebenszeitpunkt möglicherweise markantere Unterschiede zwischen Wildtyp und transgenem Tier im Hinblick auf die Beurteilung einer therapeutisch induzierten Protektion liefern. Des Weiteren muss bedacht werden, dass eine immunhistologische Analyse keine Aussage über die physiologische Funktionalität der Motoneurone geben kann. So könnte ein immunhistologisch detektiertes Motoneuron seine normale Zellfunktion bereits verloren haben.

In einer weitergehenden Analyse unserer Studie konnte die Auswertung der Motoneuronanzahl in Abhängigkeit von der Größe und der kumulativen Fläche der Motoneurone zwischen Wildtyp-Tieren und SOD1-G93A-transgenen Tieren zeigen, dass vor allem zuerst die großen Motoneurone vom Krankheitsmechanismus betroffen sind (siehe Abbildung 12). Dies wurde so auch von anderen Autoren beschrieben (Kong und Xu 1998). Motoneurone sind im Allgemeinen ausgesprochen vulnerable Neurone, was zum einen an der Größe ihres Zellkörpers und zum anderen an den mit Abstand längsten Zellfortsätzen im Organismus und damit einer hohen Stoffwechsellistung liegen mag (Shaw und Eggett 2000). Der größenabhängig betonte Verlust der Motoneurone in ALS-Modellen ist mehrfach belegt, die Ursache jedoch nicht endgültig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass die größten Motoneurone zur motorischen Einheit der F-Typ-Muskelfasern (*fast twitch*) gehören und hierdurch eine ausgesprochen hohe Feuerrate an Aktionspotentialen, verbunden mit einer hohen Stoffwechsellistung, aufweisen. Im Gegensatz dazu scheinen die S-Typ-Motoneurone (*slow twitch*) kleinere Zellkörper aufzuweisen und zeigen sich auch resistenter in der Pathogenese der ALS. Erst im Endstadium ist die motorische Einheit vom S-Typ auch betroffen (Cullheim et al. 1987; Pun et al. 2006; Kanning et al. 2010).

Die erweiterte Analyse mit Berechnung der kumulativen Motoneuronfläche stellt in unserer Studie als Surrogatmarker einen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und den mit Wasser behandelten transgenen Kontrolltieren dar. Ziel dieser Auswertung war es, durch die

gleichzeitige Erfassung von Motoneuronanzahl und Motoneurongröße, auch einen milden Unterschied zum Untersuchungszeitpunkt von 100 Lebenstage aufdecken zu können. Hierbei zeigt sich, dass die kumulative Motoneuronfläche in der Fasudil-behandelten Gruppe größer als die der Wasser-behandelten Gruppe ist und zudem nicht signifikant kleiner als die der Wildtyp-Gruppe (siehe Abbildung 12). Daraus lässt sich eine neuroprotektive Funktion von Fasudil postulieren, die sich bereits auch in einem *in vitro* Toxizitätsmodell von Motoneuronzellkulturen gezeigt hatte (Tönges et al. 2014). Diese neuroprotektiven Eigenschaften von Fasudil wurden zuvor ebenfalls in einem anderen neurodegenerativen Modell gezeigt. Die Behandlung mit Fasudil konnte in einem *in vitro* 1-Methyl-4-Phenylpyridin-Zellkulturmodell und in einem subchronischen *in vivo* MPTP-Mausmodell der neurodegenerativen Parkinson-Erkrankung den Untergang der dopaminergen Neurone und deren neuronalen Fortsätze abmildern. Als eine mögliche Ursache der Protektion fand man eine Aktivierung des Akt-Zellsignalweges nach Fasudilbehandlung (Tönges et al. 2012). Auch Takata et al. (2013) führten ihre neuroprotektiven Effekte im SOD1-G93A-Mausmodell auf eine vermehrte Aktivierung von Akt zurück (Takata et al. 2013). Dies kann, wie in Kapitel 1.3.3.1 dargestellt, das neuronale Zellüberleben positiv beeinflussen.

Zusammenfassend wird auch im vorliegenden Experiment die Degeneration der hier betroffenen Motoneurone durch die Behandlung mit Fasudil abgemildert. Um einen noch deutlicheren protektiven Effekt belegen zu können, sollte eine erneute Querschnittanalyse möglichst zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden.

4.1.2 Kein Einfluss auf degenerative Veränderungen im PNS

Nach der *Dying-back- bzw der distal axonopathy*-Theorie ist die Degeneration und Dysfunktion der motorischen Endplatten das erste in Erscheinung tretende pathologische Ereignis in der Pathogenese der ALS (Dadon-Nachum et al. 2011). Möglicherweise ist die Degeneration der motorischen Endplatten und der Axone sogar teilweise unabhängig von der Degeneration der Motoneurone zu sehen (Gould et al. 2006; Fischer und Glass 2007). Eine separate Analyse des peripheren Nervensystems ist daher in einer Behandlungsstudie im SOD1-G93A-Mausmodell zusätzlich erforderlich.

Schon mit 47 Tagen sind nach Analysen von Fischer et al (2004) circa 30 % der Endplatten denerviert, an 100 Tagen ist dies sogar für über 60 % der Fall (Fischer et al. 2004). In den

eigenen Untersuchungen fanden sich ebenfalls in den transgenen Tieren an Lebenstag 100 circa 50 % der Endplatten vollständig denerviert (siehe Abbildung 14). Das Effektororgan, welches durch die funktionell und strukturell geschädigte Motoneuron-Axon-Endplatten-Einheit gesteuert und stimuliert wird, ist der Skelettmuskel. Hier fand sich zu diesem Untersuchungszeitpunkt eine Atrophie des Musculus gastrocnemius im SOD1-G93A-Mausmodell (siehe Abbildung 13). Dieser fällt jedoch mit 12 % bei einem Verlust von 50 % der innervierten Endplatten noch recht moderat aus. Auch zeigen die Tiere zum Zeitpunkt von 100 Lebenstagen nur leichte motorische Leistungseinbußen und gering ausgeprägte klinische Zeichen. Dieses Paradoxon könnte durch regenerative Prozesse wie das *Sprouting* terminaler motorischer Axone zu noch intakten motorischen Endplatten begründet sein (Gurney et al. 1994; Frey et al. 2000).

Im Bereich der axonalen Strukturen des Nervus ischiadicus zeigte sich bezüglich der gesamten Axonanzahl an Lebenstag 100 ein Verlust um circa 15 % im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (siehe Abbildung 16). Dieser auch eher milde Verlust axonaler Strukturen lässt sich darin begründen, dass zunächst nur die großen motorischen Axone des Nervs betroffen sind und dass auch die sensiblen Axone und Axone vegetativer Bahnen, welche im ALS-Modell nicht relevant degenerieren, mitgezählt werden. Zudem berichteten auch Fisher et al (2004) und Kong und Xu (1998) über eine vor allem zunächst die größten Axone betreffende Degeneration im ALS-Mausmodell (Kong und Xu 1998; Fischer et al. 2004). Analog zur Größe der Motoneuronzellkörper ist bekannt, dass diese großen myelinisierten Axone für die Innervation von F-Typ-Muskelfasern, mit schneller Kontraktionsfähigkeit und rascher Ermüdbarkeit zuständig sind (Cullheim et al. 1987; Kanning et al. 2010). Gerade diese sind wahrscheinlich aufgrund der hohen Aktionspotentialfeurrate und der damit verbundenen hohen axonalen Transportleistung mit großer Stoffwechselleistung als vulnerable axonale Strukturen im SOD1-G93A-Mausmodell beschrieben (Pun et al. 2006). In einer detaillierten Analyse der Axone mit ausgeprägten Degenerationszeichen, wie akkumuliertem Neurofilament im Axoplasma, lässt sich zudem ein um circa 8 % höherer Anteil degenerierter Axone in den transgenen Tieren auszählen. Auch die Querschnittfläche des Nervs ist im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle signifikant reduziert. Die elektrophysiologischen Messungen am Nervus ischiadicus verdeutlichen ebenfalls anhand der Reduktion der mNLG und der Verminderung der MSAP die sich histologisch manifestierenden degenerativen Ver-

änderungen mit Verlust der Axonanzahl und Denervation der motorischen Endplatten zwischen Wildtyp und SOD1-G93A-transgenen Tieren (siehe Abbildung 18).

Im Vergleich der transgenen Tiere mit Behandlung durch Fasudil 30 mg/kg Körpergewicht und Wasser konnte keine Verringerung der degenerativen Prozesse der distalen axonalen Strukturen oder der Integrität der motorischen Endplatten gegenüber der Wasser-behandelten transgenen Gruppe beobachtet werden (siehe Abbildung 14 und Abbildung 16). Auch Bowerman et al. (2012) konnten im SMA-Mausmodell mit Fasudil keinen signifikant höheren Anteil an vollständig innervierten Endplatten nachweisen (Bowerman et al. 2012). Dies ist ein überraschender Effekt, da gerade von pathophysiologischer Seite eine axonale Stabilisierung durch ROCK-Inhibition erwartet werden könnte (siehe Kapitel 1.3.3.1). Die hier durchgeführte Analyse des Innervationsprofils der motorischen Endplatten berücksichtigt aufgrund der Methodik keine Kriterien zur Unterscheidung einer Denervation oder Reinnervation motorischer Endplatten. Schaefer et al. (2005) konnten jedoch zeigen, dass im SOD1-G93A-Mausmodell Denervations- und Reinnervationsprozesse parallel und in großem Maße stattfinden (Schaefer et al. 2005). Die Reinnervation der motorischen Endplatten gilt daher als wichtiger Kompensationsmechanismus in der Pathogenese, weshalb trotz frühzeitig nachweisbarer Degenerationsprozesse das klinische Erkrankungsbild erst später in Erscheinung tritt. Da in der vorliegenden Analyse keine regenerativen Prozesse wie das *Sprouting* terminaler Axone untersucht werden konnten, wurden im Anschluss weiterführende Untersuchungen der motorischen Endplatten mit Hilfe spezieller immunhistochemischer Färbungen zur Darstellung von Reinnervationsprozessen durchgeführt. Diese ergab einen signifikant höheren Anteil an GAP43-immunopositiven und vollständig reinnervierten motorischen Endplatten in der Fasudil-behandelten Gruppe im Vergleich zur Wasser-behandelten Gruppe (Tönges et al. 2014). Überraschenderweise sind trotz dieses Effektes keine Verbesserungen in den elektrophysiologischen Messungen wahrzunehmen (siehe Abbildung 18). Möglicherweise ist die Funktionalität der reinnervierten Endplatten eingeschränkt, beziehungsweise gegenüber einer intakten Endplatte verzögert, so dass sich keine Auswirkung auf die Höhe des MSAP darstellen lässt. Das durch Fasudil in dieser Analyse gezeigte Potential zur Steigerung von Reinnervationsprozessen an der motorischen Endplatte könnte eine Erklärung für die bessere motorische Leistungsfähigkeit in der präsymptomatischen Studie mit Fasudil sein.

4.1.3 Modulation von Gliazellen

Die im SOD1-G93A-Mausmodell klinisch nachgewiesene Lebenszeitverlängerung mit Fasudil kann aufgrund des eher milden neuro- und axonoprotektiven Effektes nicht vollständig erklärt werden. Die Rolle der nicht-neuronalen Gliazellen als ein maßgeblicher Faktor in der Entstehung und Progression der SOD1-G93A-bedingten ALS ist hinreichend bekannt (Boillée et al. 2006; Yamanaka et al. 2008a; Yamanaka et al. 2008b). Daher wurde in den Gewebeproben dieser Querschnittanalyse im Anschluss an die in dieser Arbeit dargestellten histologischen Analysen auch eine Modulation der Gliazellen untersucht. Einen modulatorischen Effekt von ROCK-Inhibitoren auf gliale Zellen belegen bereits zahlreiche Publikationen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Fasudil die Expression von EAAT2-Rezeptoren auf kultivierten Astrozyten erhöhen kann (Lau et al. 2011). Wie bereits in Kapitel 1.1.6 erwähnt, wird ein Verlust an EAAT2-Rezeptoren mit konsekutiver Glutamatexzitotoxizität in der Pathogenese der ALS diskutiert. Besonders der Einfluss der Mikroglia in der Pathogenese der ALS ist ein relevantes Thema, da der ROCK-Signalweg auch in Mikrogliazellen ein wesentlicher Regulator der Zellmotilität und damit ihrer Aktivität ist. Eine erst kürzlich erschienene Veröffentlichung konnte in einem MPTP-Modell der Parkinsonerkrankung zeigen, dass durch MPTP eine phagozytierende Aktivierung von Mikroglia induziert wird und dies mit einer Steigerung der ROCK-Aktivität assoziiert ist. Durch Behandlung mit Fasudil konnte die Phagozytose von degenerierenden dopaminergen Neuronen unterdrückt werden (Barcia et al. 2012).

In der an die hier vorliegenden histologischen Untersuchungen in der Querschnittstudie angeschlossene Analyse der Gliazellen zeigte sich eine erhöhte Mikroglia-Zellzahl. Bei Betrachtung der Morphologie fand sich eine für aktivierte Mikroglia typische Form in der Fasudil-behandelten Gruppe. Um die Auswirkung von Fasudil auf den funktionellen Phentyp der Mikroglia zu untersuchen, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt, bei denen sich zeigte, dass Fasudil die Sekretion der für M1-Mikroglia typischen Zytokine reduziert (Tönges et al. 2014). Es ist bekannt, dass aktivierte Mikroglia ein Spektrum verschiedener Funktionalitäten entwickeln kann. Vereinfacht kann gesagt werden, dass die zytotoxische Variante (sog. M1-Mikroglia) Sauerstoffradikale und proinflammatorische Zytokine freisetzt und die protektive Form (sog. M2-Mikroglia) Zellreste entfernt und neuroprotektive Faktoren sezerniert. Insbesondere bei der Pathogenese der ALS wird

postuliert, dass die zu Beginn der Erkrankung protektive Form mit zunehmenden Verlauf zur zytotoxischen Form transformiert (Henkel et al. 2009; Bowerman et al. 2013). Die Ergebnisse unterstützen damit die Hypothese, dass Fasudil möglicherweise die Transformation der protektiven M2-Typ-Mikroglia zu einer zytotoxischen M1-Typ-Mikroglia in weiter fortgeschrittenen Krankheitsstadien der ALS verzögern kann, damit die Krankheitsprogression verlangsamt und so den Überlebensvorteil in der präsymptomatischen Studie mit Fasudil zum Teil mit erklären könnte.

4.2 Präsymptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Y-27632

Ziel dieser präsymptomatischen Behandlungsstudie war es, die im SOD1-G93A-Mausmodell erreichten Effekte in der präsymptomatischen Studie mit Fasudil, durch einen alternativen und selektiveren ROCK-Inhibitor zu untermauern. Hierfür wurde eine orale Behandlung mit 30 mg/kg Körpergewicht Y-27632 mit Beginn des 50. Lebensstages durchgeführt.

4.2.1 Verträglichkeit von Y-27632

Die Analysen aller weiblichen und männlichen Tiere im präsymptomatischen Behandlungsversuch mit Y-27632 zeigen in der Gewichtsentwicklung keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. In der Auswertung der letzten zehn Messzeitpunkte der Weibchen fällt das Gewicht zwar wie in der Kontrollgruppe erwartungsgemäß kontinuierlich ab, jedoch sind die Messungen der Y-27632-Behandlungsgruppe signifikant höher und deuten damit auf eine bessere körperliche Konstitution zum Krankheitsende hin. Im Vergleich der männlichen Kohorte ergeben sich keine Unterschiede im Verlauf der letzten 10 Messzeitpunkte. Insgesamt scheint damit die orale Behandlung mit Y-27632 keinen relevanten Einfluss auf die allgemeine Konstitution der Tiere zu haben.

4.2.2 Präsymptomatische Behandlung mit Y-27632 verlängert den Erhalt der Motor-koordination

In der präsymptomatischen Behandlung mit Y-27632 in einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht ergaben sich keine lebensverlängernden oder die klinischen Erkrankungs-

stadien beeinflussenden Effekte (siehe Abbildung 23, Abbildung 24 und Abbildung 25). Bezüglich der motorischen Funktion konnten in der *rotarod*-Testung der männlichen Kohorte signifikant längere Laufzeiten und damit ein besserer Leistungserhalt im frühen Erkrankungsverlauf erreicht werden (siehe Abbildung 22). In der weiblichen Kohorte zeigte sich ein starker Trend, der jedoch keine Signifikanz erreichte (siehe Abbildung 21). Die Untersuchung der Ausdauer im *hanging wire*-Test ergab sowohl für die Weibchen als auch für die Männchen keinen signifikanten Gewinn durch die Behandlung mit Y-27632. Ein Einfluss auf das Krankheitsgeschehen im SOD1-G93A-Mausmodell durch Y-27632 mit einer Dosierung von 30 mg/kg Körpergewicht ist demnach nur für einen bestimmten Krankheitszeitraum gegeben und es resultiert aus diesem Experiment allein der milde Vorteil im Erhalt von Motorkoordinations- und Balancefähigkeiten.

Bisher konnte Y-27632 zusätzlich ebenfalls erfolgreich in zwei weiteren Tierstudien neurodegenerativer Erkrankungen getestet werden. In einem Chorea-Huntington-Tiermodell zeigte die Behandlung mit Y-27632 verbesserte Leistungen im *rotarod*-Verhaltenstest, aber keine Verlängerung des Überlebens (Li et al. 2009). In einem SMA-Tiermodell konnte die orale Behandlung einen deutlichen Überlebensvorteil erwirken (Bowerman et al. 2010). Im Vergleich zu den beiden genannten Studien mit Y-27632 im Huntington- und SMA-Tiermodell sind methodische Abweichungen zu unserem Experiment in der Applikations- und Dosierungsform zu erkennen. In der Studie von Li et al. (2009) wurde mit einer deutlich höheren Dosis von 100 mg/kg Körpergewicht pro Tag über das Trinkwasser behandelt. Der Behandlungsbeginn lag bei einem Alter von 4 Wochen und endete mit der maximalen Überlebenszeit im Schnitt bei 126 Tagen. Bowerman et al. (2010) arbeiteten mit einer zu uns identischen Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht pro Tag von Lebenstag 3 bis 21, jedoch wurde hierbei die Substanz mit einer Ernährungssonde direkt in den Magen der Tiere einmal täglich verabreicht. Diese Applikationsform ist in Bezug auf die genaue Dosierung möglicherweise die genauere Variante. Andererseits würden durch eine wiederholte Sondeneinführung, vor allem für ein länger andauerndes Experiment wie das vorliegende, deutlich mehr Stress auf die Tiere ausgeübt, möglicherweise auch Verletzungen durch Abwehrbewegungen hervorgerufen und dadurch andere Versuchsfehlerquellen geschaffen. Die in dem vorliegenden Versuch angewandte Methode der Applikation über das Trinkwasser ermöglicht eine stressfreie Aufnahme der Substanz ohne Eingriffe in die

körperliche Unversehrtheit der Tiere. Jedoch kann die Trinkmenge jedes einzelnen Tieres und damit die genaue Dosis der Medikation nur mittelbar kontrolliert werden. Die Ergebnisse von Bowerman et al. (2010) im SMA-Mausmodell können auch deshalb nicht direkt auf das hier vorliegende Experiment übertragen werden, weil die Behandlung bereits kurz nach Geburt der Tiere begonnen wurde. Eine Modulation der Pathogenese noch während der Entwicklung des Tieres ist vermutlich besser beeinflussbar als bei einem bereits 50 Tage alten Tier mit voranschreitendem Krankheitsgeschehen. Hinsichtlich des Beginns der Behandlung und der Behandlungsdauer ist sicherlich ein Vergleich mit dem Experiment von Li et al. (2009) besser geeignet. Li et al. (2009) interpretierten ihre isolierten Effekte auf die *rotarod*-Performance als eine begrenzte Wirkung von Y-27632 durch eine unzureichende Substanzkonzentration und einer kurzen Halbwertszeit im ZNS. Deren Untersuchungen zeigen zwar, dass bereits bei einer intraperitonealen Injektion von 10 mg/kg Körpergewicht die Substanz Y-27632 die Blut-Hirnschranke überwindet. Die erreichte ZNS-Konzentration jedoch lag deutlich unter der, die in Zellkulturen zu einer Reduktion von Huntingtin-Aggregation geführt hatte.

Vergleicht man die Ergebnisse der präsymptomatischen Studie mit Fasudil und der mit Y-27632, ist der Effekt in der Fasudilstudie deutlich größer. Hier konnte sowohl eine signifikante Lebensverlängerung als auch eine Verbesserung des Erhalts der motorischen Leistungsfähigkeit erreicht werden (siehe Abbildung 4). Betrachtet man den Überlebensvorteil in den beiden Studien von Bowerman et al., in denen auch für beide Studien die gleiche Konzentration für Fasudil und Y-27632 getestet wurde, dann kann geschlussfolgert werden, dass auch hier die Fasudilbehandlung mit längeren Überlebenszeiten der Tiere hervorsticht (Bowerman et al. 2010; Bowerman et al. 2012). Gegensätzlich dazu scheint in einer Metaanalyse von ROCK-Inhibition im Tiermodell der Rückenmarksläsion die Behandlung mit Y-27632 tendenziell effektiver zu sein als durch Fasudil (Watzlawick et al. 2013). Molekularbiologisch könnte dies durch eine höhere Selektivität von Y-27632 im Bezug auf ROCK II im Vergleich zu Fasudil erklärt werden (Uehata et al. 1997). Takata et al. (2013) postulieren, dass der mögliche biochemische Signalweg zur Abmilderung des Zelluntergangs der Motoneurone durch ROCK-Inhibition über die Erhöhung der Akt-Konzentration verbunden sein könnte (Takata et al. 2013). Auch in einem Tiermodell der Parkinson'schen Erkrankung konnte unsere Arbeitsgruppe eine Erhöhung von Phospho-Akt als Mechanismus

neuroprotektiver Effekte identifizieren. Hierbei konnte *in vitro* gezeigt werden, dass beide, Fasudil und Y-27632, die Konzentration von Phospho-Akt steigern können, dies aber durch Fasudil effektiver gelang (Tönges et al. 2012). Darüber hinaus konnten Takata et al. (2013) *in vitro* eine Protektion von Motoneuronen durch Behandlung mit beiden Substanzen zeigen. Dabei scheint Fasudil auch hier etwas effektiver zu sein (im Vergleich Grafik 1 und Grafik S3) (Takata et al. 2013).

Möglicherweise könnten im SOD1-G93A-Mausmodell durch relativ höhere orale Dosierung von Y-27632 und damit höhere Wirkspiegel im ZNS stärkere klinische Effekte erzielt werden. Unter Zusammenschau der Daten für Y-27632 ist aber auch bereits bei unserer Behandlungskonzentration von 30 mg/kg ein signifikanter Benefit in der motorischen Leistungsfähigkeit zu erkennen, welcher die Behandlungsstrategie mit ROCK-Inhibitoren in der ALS weiter untermauert.

4.3 Symptomatische Behandlungsstudie mit dem ROCK-Inhibitor Fasudil

In der ersten Therapiestudie mit ROCK-Inhibitoren im SOD1-G93A-Mausmodell unserer Arbeitsgruppe entschieden wir uns für einen präsymptomatischen Behandlungsbeginn an Lebenstag 50 mit Fasudil und konnten hier einen lebensverlängernden Effekt in einer *proof-of-principle* Studie darstellen. In der klinischen Realität begeben sich ALS-Patienten jedoch meist erst in Behandlung, sobald erste klinische Symptome vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt sind degenerative Veränderungen bereits deutlich ausgeprägt und erschweren so den Erfolg jeglicher therapeutischer Maßnahmen. Da dies jedoch die klinische Realität abbildet, entschieden wir uns zur Durchführung einer symptomatischen Therapiestudie mit Fasudil ab dem 80. Lebenstag. Hier kam es im Durchschnitt zur Erstmanifestation klinischer Symptome in unserem SOD1-G93A-Mausmodell.

4.3.1 Verträglichkeit von Fasudil

In der Zusammenschau der Gewichtsentwicklung ist keine negative Beeinflussung des Allgemeinzustandes durch die orale Behandlung mit Fasudil zu beobachten. Wie bereits in den Vorversuchen und in anderen tierexperimentellen und humanen Studien scheint sich die

gute Verträglichkeit von Fasudil auch in diesem Experiment zu bestätigen (Vicari et al. 2005; Zhao et al. 2011).

4.3.2 Symptomatische Fasudilbehandlung verlängert den Erhalt der Motorkoordination in der männlichen Behandlungskohorte

Lebensverlängernde Effekte oder eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs konnten durch die symptomatische Fasudilbehandlung ab Lebenstag 80 nicht erreicht werden (siehe Abbildung 30, Abbildung 31 und Abbildung 32). Allerdings wurden erneut funktionell vorteilhafte Befunde erzielt. Überraschend deutlich zeigte sich ein verlängerter Erhalt der motorischen Fähigkeiten auf der *rotarod*-Testapparatur für beide Dosierungen in der männlichen Behandlungsgruppe. Die weiblichen Tiere hingegen konnten in diesem Experiment keine Verbesserungen der motorischen Leistungsfähigkeiten durch die Fasudilbehandlung erfahren.

Gründe für die nur milden positiven therapeutischen Effekte von Fasudil zum symptomatischen Behandlungsbeginn könnten wiederum in einer suboptimalen Dosierung liegen. Die Behandlung über das Trinkwasser stellt zwar im Vergleich zur Magensondierung und intraperitonealen Injektion eine schonende Form der Applikation dar, andererseits ist sie aber auch schlechter zu kontrollieren. Zudem weiß man bereits aus Experimenten in kultivierten Mittelhirnneuronen, dass Fasudil ein sehr enges therapeutisches Fenster besitzt. Während zu niedrige Konzentrationen sich ohne signifikante Effekte auf die Zellzahl der Neurone auswirkten, führten zu hohe Konzentrationen zu einem signifikanten Zellverlust gegenüber der Kontrollbehandlung (Tönges et al. 2012). Die Problematik einer optimalen Dosis für neuroprotektive Medikamente beschränkt sich nicht nur auf die tierexperimentellen Versuche, sondern ist auch bei der Testung von Substanzen, die bereits für humane klinische Studien zur Behandlung der ALS zugelassen sind, bestens bekannt (Gordon und Meininger 2011).

Darüber hinaus ist wie in der humanen ALS zu Behandlungsbeginn die Pathogenese bereits weit voran geschritten und dementsprechend schlechter modifizierbar, sodass eher ein geringer Behandlungserfolg zu erwarten war. Um grundsätzlich auch kleine Wirksubstanz-erfolge quantifizieren zu können, wird die Behandlung in präklinischen Studien im SOD1-G93A-Mausmodell daher zumeist im Zeitraum von 30 bis 60 Lebenstagen gestartet, lange

bevor sich klinische Symptome manifestieren (Turner und Talbot 2008). Die hier in der symptomatischen Studie begonnene Therapie ab dem 80. Lebensjahr verkürzt damit die Dauer der Wirkungsentfaltung im SOD1-G93A-Mausmodell im Vergleich zur präsymptomatischen Studie erheblich. Um die Wirkung der Fasudilbehandlung vor allem in klinisch fortgeschrittenen Krankheitsstadien zu maximieren, sollten Studien zur Erprobung von Kombinationsbehandlungen mit anderen bereits erfolgreich getesteten neuroprotektiven Substanzen, welche über andere Kaskaden ihre Wirkung entfalten, durchgeführt werden. Da der Wirkstoff Riluzol bereits für den humanen klinischen Gebrauch bei der ALS zugelassen ist, wäre dies die Substanz mit der höchsten Priorität in einer Kombinationsbehandlung. Präklinische Kombinationsbehandlungen im SOD1-G93A-Mausmodell mit Riluzol und Phenylbutyrat oder Rasagiline sind Beispiele für einen synergistischen Therapieerfolg, denn die Kombination konnte deutlich bessere Ergebnisse im Vergleich zur Einzelbehandlung erzielen (Waibel et al. 2004; Del Signore et al. 2009). Des Weiteren könnten auch Kombinationsbehandlungen mit neuen Substanzen, die eine verstärkende Wirkung auf den durch Fasudil-Behandlung aktivierten Akt-Signalweg zeigen, erprobt werden. So wären beispielsweise Antagonisten des *Death-Receptor-6* und Agonisten von DJ-1, einem Onkogen, mögliche Kombinationspartner für eine Verstärkung des Akt-Signalweges zur Protektion von Motoneuronen im SOD1-G93A-Mausmodell (Miyazaki et al. 2008; Bova und Kinney 2013; Huang et al. 2013). Ein weiterer attraktiver Kombinationspartner wäre die Substanz SA4506, ein Sigma-1-Rezeptor Agonist, welcher das Überleben im SOD1-G93A-Mausmodell verlängern konnte und dessen neuroprotektive Wirkung sich auch über die Akt-Aktivierung begründen ließ (Ono et al. 2013).

Der therapeutische Erfolg in der präsymptomatischen Studie mit Fasudil in unseren Experimenten ist bisher nur für die weiblichen SOD1-G93A-transgenen Tiere analysiert worden. Ob auch die männlichen Tiere des SOD1-G93A-Mausmodells von der Therapie profitieren, muss noch untersucht werden. Überraschenderweise begrenzen sich die Effekte in der motorischen Testung der symptomatischen Studie mit Fasudil allerdings auf die der männlichen Kohorte. Auch Cervetto et al. (2013) berichten über geschlechtsspezifische Therapieerfolge im SOD1-G93A-Mausmodell und postulieren ein geschlechtsspezifisches Ansprechen auf Therapeutika in diesem Erkrankungsmodell. Hier erreichte die männliche Behandlungsgruppe bessere Ergebnisse nach Behandlung mit einem Antagonisten des

neurotoxischen P2X7-Receptors (Cervetto et al. 2013). Gegensätzlich dazu erreichten Bame et al. (2012) in ihrem Experiment mit Methionin im SOD1-G93A-Mausmodell größere Erfolge in der weiblichen Behandlungsgruppe. Ovariectomie oder Kastration eliminierten diese Effekte, sodass eine sexualhormonabhängige Komponente belegt werden konnte (Bame et al. 2012). Auch die Krankheitsprogression selbst ist im SOD1-G93A-Mausmodell deutlich verschieden und zu Ungunsten der männlichen Tiere verschoben. Dies könnte auch eine Abhängigkeit des Therapieerfolges vom Zeitpunkt der Krankheitsprogression vermuten lassen und damit auch einen geschlechtsspezifischen funktionellen Gewinn in der symptomatischen Studie mit Fasudil. Epidemiologische Studien der humanen ALS deuten darauf hin, dass die Sexualhormone der Frau einen neuroprotektiven Effekt in der Pathogenese der ALS aufweisen (Chió et al. 1991; Jong et al. 2013). Studien am SOD1-G93A-Mausmodell zeigen, dass der Krankheitsverlauf weiblicher Tiere nach Ovariectomie deutlich beschleunigt wird und nach Gabe von Östrogenen wieder verlangsamt werden kann (Groeneveld et al. 2004). Geschlechtsspezifische Unterschiede sind kein isoliertes Phänomen der ALS, sondern werden beispielsweise auch beim Morbus Parkinson berichtet. Experimente nach Ovariectomie im MPTP-Tiermodell der Parkinsonerkrankung konnten zeigen, dass ohne Östrogenbehandlung der Zellverlust dopaminergener Neurone stark zunimmt und mit Östrogenbehandlung wieder abgemildert werden kann. Interessanterweise ist die ROCK-Aktivität durch Ovariectomie allein im Wildtyp signifikant gesteigert und mit MPTP noch einmal deutlich höher. Östrogengabe vermag diese wieder stark zu senken. Die Behandlung mit einem ROCK-Inhibitor steigert die Zahl der dopaminergen Neurone und die *rotarod*-Performance nach Ovariectomie im MPTP-Modell signifikant (Rodriguez-Perez et al. 2013). Möglicherweise ist im SOD1-G93A-Mausmodell zum Zeitpunkt des symptomatischen Krankheitsstadiums hormonell bedingt die ROCK-Aktivität im männlichen Tier höher als im weiblichen Tier, sodass der Effekt durch ROCK-Inhibition zu diesem Zeitpunkt im männlichen Tier stärkere Wirkung zeigt. Möglicherweise kommt aufgrund der physiologisch vorhandenen kompensatorischen Reduktion der ROCK-Aktivität durch Östrogene daher ein protektiver Effekt durch die Anwendung eines ROCK-Inhibitors bei den Weibchen erst durch eine längere Behandlungsdauer, wie in der präsymptomatischen Studie gezeigt, zum Tragen. Anschließende Experimente zur Untersuchung von alters- und geschlechtsspezifischer Höhe der ROCK-Aktivität im SOD1-G93A-Mausmodell sollten angeschlossen werden.

Insgesamt betrachtet sind die Erfolge zwar moderat und über beide Geschlechterkohorten inkonsistent. Die hierbei gewonnenen Ergebnisse anhand der männlichen Tiere zeigen aber, dass auch ein später Behandlungsbeginn mit Fasudil in einer optimalen Dosierung ein Gewinn für das erkrankte Lebewesen darstellen kann. Eine Modifizierung des Experiments mit Anpassung der Dosierung und der Applikationsform könnte hier weitere Aufschlüsse bringen.

5 Zusammenfassung

Trotz des enormen Zuwachses an wissenschaftlichen Erkenntnissen in der Pathogenese der ALS hat seit der Entwicklung von Riluzol keine der präklinisch erfolgreich getesteten Substanzen einen zufriedenstellenden Einfluss auf die humane ALS-Erkrankung erreichen können (Aggarwal und Cudkowicz 2008). Mit einer lebensverlängernden Wirkung von gerade einmal 2 bis 3 Monaten ist Riluzol keine ausreichende therapeutische Option bei dieser gravierenden und stets tödlich verlaufenden neurodegenerativen Erkrankung. Erforschung und Etablierung neuer Therapiestrategien auf Grundlage der pathophysiologischen Veränderungen sind dringend notwendig. Eine vielversprechende Therapiestrategie stellt die Inhibition von Rho-Kinasen dar und wird in der vorliegenden Arbeit gezielt untersucht. Hierbei handelt es sich um einen der bedeutendsten Signalwege zur Stimulation regenerativer Prozesse und zur Steigerung von Zellüberleben in neuronalen Geweben. In Tiermodellen der neurodegenerativen Erkrankungen SMA, Chorea Huntington und Morbus Parkinson konnten die ROCK-Inhibitoren Fasudil und Y-27632 bereits erfolgreich getestet werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Inhibition der Rho-Kinase-Kaskade im Mausmodell der ALS eingehend zu untersuchen. In unserer Arbeitsgruppe konnte in vorangegangenen Experimenten in einer präsymptomatischen Studie mit oraler Fasudil-Behandlung im SOD1-G93A-Mausmodell bereits eine Verlängerung der Überlebenszeit und eine Verbesserung der motorischen Leistung gezeigt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente sollen Aufschluss über die neurobiologischen Effekte des präsymptomatischen Behandlungserfolges mit Fasudil in einer Querschnittstudie geben, einen weiteren ROCK-Inhibitor (Y-27632) auf dessen Wirksamkeit im SOD1-G93A-Mausmodell in einer präsymptomatischen Studie testen sowie den ROCK-Inhibitor Fasudil in einer symptomatischen Studie zu einem der humanen Erkrankung übertragbaren Behandlungsbeginn untersuchen.

Die untersuchten Gewebe aus der Querschnittstudie zeigen histopathologisch milde neuroprotektive Effekte auf Ebene der Motoneurone, ein Einfluss auf die degenerativen Veränderungen im PNS konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Die orale Behandlung mit Y-27632, einem alternativen ROCK-Inhibitor mit selektiverer Wirksamkeit zur Isoform ROCK II, kann Verbesserungen der motorischen Leistungsfähig-

keiten im SOD1-G93A-Mausmodell erzielen. Eine Verlängerung der Überlebenszeit blieb im Vergleich zur präsymptomatischen Behandlung mit Fasudil jedoch aus.

In der symptomatischen Fasudil-Behandlungsstudie kann ebenfalls eine Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeit beobachtet werden. Eine Verlängerung der Überlebenszeit, wie es bei der präsymptomatischen Studie der Fall war, konnte nicht erzielt werden.

Zusammenfassend betrachtet, konnten in den bisherigen Therapiestudien mit ROCK-Inhibitoren im SOD1-G93A-Mausmodell die besten Ergebnisse durch Fasudil in einer präsymptomatischen Studie erreicht werden. Zu einem späteren Behandlungsbeginn konnten diese Erfolge bisher leider nicht reproduziert werden. Der ROCK-Inhibitor Y-27632 vermochte trotz Verbesserung der motorischen Leistungsfähigkeiten ebenfalls keinen vergleichbar erfolgreichen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen im SOD1-G93A-Mausmodell zu nehmen. Hypothetisch könnten sich dennoch die hier präsentierten milden Effekte im ALS-Mausmodell durch eine vergleichsweise längere Wirkungszeit im Menschen positiv verstärken.

Weiterführende histologische Untersuchungen in der Querschnittstudie mit Fasudil konnten eine starke Modulation der Gliazellen und verstärkte regenerative Prozesse auf Ebene der motorischen Endplatten belegen. In Zusammenschau mit den *in-vitro*-Versuchen auf Mikroglia- und Motoneuronzellkulturen konnte durch ROCK-Inhibition mit Fasudil einerseits eine ausgeprägte Modulation der Mikroglia und andererseits eine Neuroprotektion der Motoneurone als neurobiologische Erklärung für die klinischen Verbesserungen im ALS-Mausmodell gefunden werden (Tönges et al. 2014).

Die ROCK-Inhibitions-Therapiestrategie, insbesondere Fasudil, stellt damit eine vielversprechende Option im Kampf gegen die bisher unzureichend behandelbare Amyotrophe Lateralsklerose dar.

6 Literaturverzeichnis

Aggarwal S, Cudkowicz M (2008): ALS drug development: reflections from the past and a way forward. *NeuroRx* 5, 516–527

Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJD, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, Martins RS, Maximino JR, Chadi G (2011): Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* 1394, 90–104

Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K (1996): Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* 271, 20246–20249

Andersen PM, Borasio GD, Dengler R, Hardiman O, Kollewe K, Leigh PN, Pradat P, Silani V, Tomik B (2007): Good practice in the management of amyotrophic lateral sclerosis: clinical guidelines. An evidence-based review with good practice points. EALSC Working Group. *Amyotroph Lateral Scler* 8, 195–213

Bame M, Pentiak PA, Needleman R, Brusilow WSA (2012): Effect of sex on lifespan, disease progression, and the response to methionine sulfoximine in the SOD1 G93A mouse model for ALS. *Gend Med* 9, 524–535

Barcia C, Ros CM, Annese V, Sauvage MAC, Ros-Bernal F, Gómez A, Yuste JE, Campuzano CM, Pablos V de, Fernandez-Villalba E et al. (2012): ROCK/Cdc42-mediated microglial motility and gliapse formation lead to phagocytosis of degenerating dopaminergic neurons in vivo. *Sci Rep* 2, 1–13

Bauer PO, Wong HK, Oyama F, Goswami A, Okuno M, Kino Y, Miyazaki H, Nukina N (2009): Inhibition of Rho kinases enhances the degradation of mutant huntingtin. *J Biol Chem* 284, 13153–13164

Beers DR, Henkel JS, Xiao Q, Zhao W, Wang J, Yen AA, Siklos L, McKercher SR, Appel SH (2006): Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 16021–16026

Bendotti C, Marino M, Cheroni C, Fontana E, Crippa V, Poletti A, Biasi S de (2012): Dysfunction of constitutive and inducible ubiquitin-proteasome system in amyotrophic lateral sclerosis: Implication for protein aggregation and immune response. *Prog Neurobiol* 97, 101–126

Bermel C, Tönges L, Planchamp V, Gillardon F, Weishaupt JH, Dietz GP, Bähr M, Lingor P (2009): Combined inhibition of Cdk5 and ROCK additively increase cell survival, but not the regenerative response in regenerating retinal ganglion cells. *Mol Cell Neurosci* 42, 427–437

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

Bova MP, Kinney GG (2013): Emerging drug targets in amyotrophic lateral sclerosis. *Expert Opin Orphan Drugs* 1, 5–20

Bowerman M, Shafey D, Kothary R (2007): Smn depletion alters profilin II expression and leads to upregulation of the RhoA/ROCK pathway and defects in neuronal integrity. *J Mol Neurosci* 32, 120–131

Bowerman M, Beauvais A, Anderson CL, Kothary R (2010): Rho-kinase inactivation prolongs survival of an intermediate SMA mouse model. *Hum Mol Genet* 19, 1468–1478

Bowerman M, Murray LM, Boyer JG, Anderson CL, Kothary R (2012): Fasudil improves survival and promotes skeletal muscle development in a mouse model of spinal muscular atrophy. *BMC Med* 10, 24

Bowerman M, Vincent T, Scamps F, Perrin FE, Camu W, Raoul C (2013): Neuroimmunity dynamics and the development of therapeutic strategies for amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* 7, 1–10

Brooks BR (1994): El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *J Neurol Sci* 124, 96–107

Brooks BR, Miller RG, Swash M, Munsat TL (2000): El Escorial revisited: revised criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 293–299

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

Carvalho M de, Dengler R, Eisen A, England JD, Kaji R, Kimura J, Mills K, Mitsumoto H, Nodera H, Shefner J et al. (2008): Electrodiagnostic criteria for diagnosis of ALS. *Clin Neurophysiol* 119, 497–503

Cervetto C, Frattaroli D, Maura G, Marcoli M (2013): Motor neuron dysfunction in a mouse model of ALS: gender-dependent effect of P2X7 antagonism. *Toxicology* 311, 69–77

Charcot JM, Joffroy A (1869): Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lesions de la substance grise et des faisceaux antero-lateraux de la moelle epiniere. *Arch Physiol Neurol Pathol* 2, 744–754

Chió A, Meineri P, Tribolo A, Schiffer D (1991): Risk factors in motor neuron disease: a case-control study. *Neuroepidemiology* 10, 174–184

Chiò A, Logroscino G, Hardiman O, Swingler R, Mitchell D, Beghi E, Traynor BG (2009): Prognostic factors in ALS: A critical review. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 310–323

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

Cifra A, Mazzone GL, Nistri A (2013): Riluzole: what it does to spinal and brainstem neurons and how it does it. *Neuroscientist* 19, 137–144

Clement AM, Nguyen MD, Roberts EA, Garcia ML, Boillée S, Rule M, McMahon AP, Doucette W, Siwek D, Ferrante RJ et al. (2003): Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. *Science* 302, 113–117

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

Corcia P, Gordon PH (2012): Amyotrophic lateral sclerosis and the clinical potential of dexamipexole. *Ther Clin Risk Manag* 8, 359–366

Costa J, Swash M, Carvalho M de (2012): Awaji Criteria for the Diagnosis of Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Systematic Review. *Arch Neurol* 69, 1–7

Cudkovicz ME, van den Berg LH, Shefner JM, Mitsumoto H, Mora JS, Ludolph A, Hardiman O, Bozik ME, Ingersoll EW, Archibald D et al. (2013): Dexamipexole versus placebo for patients with amyotrophic lateral sclerosis (EMPOWER): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet neurology* 12, 1059–1067

Cullheim S, Fleshman JW, Glenn LL, Burke RE (1987): Membrane area and dendritic structure in type-identified triceps surae alpha motoneurons. *J Comp Neurol* 255, 68–81

Dadon-Nachum M, Melamed E, Offen D (2011): The "dying-back" phenomenon of motor neurons in ALS. *J Mol Neurosci* 43, 470–477

Danzeisen R, Schwalenstoecker B, Gillardon F, Buerger E, Krzykalla V, Klinder K, Schild L, Hengerer B, Ludolph AC, Dorner-Ciossek C et al. (2006): Targeted antioxidative and neuroprotective properties of the dopamine agonist pramipexole and its nondopaminergic enantiomer SND919CL2x [(+)-2-amino-4,5,6,7-tetrahydro-6-L-propylamino-benzothiazole dihydrochloride]. *J Pharmacol Exp Ther* 316, 189–199

DeJesus-Hernandez M, Mackenzie IR, Boeve BF, Boxer AL, Baker M, Rutherford NJ, Nicholson AM, Finch NA, Flynn H, Adamson J et al. (2011): Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron* 72, 245–256

Del Signore SJ, Amante DJ, Kim J, Stack EC, Goodrich S, Cormier K, Smith K, Cudkovic ME, Ferrante RJ (2009): Combined riluzole and sodium phenylbutyrate therapy in transgenic amyotrophic lateral sclerosis mice. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 85–94

Deng H, Chen W, Hong S, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H et al. (2011): Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477, 211–215

Dergham P, Ellezam B, Essagian C, Avedissian H, Lubell WD, McKerracher L (2002): Rho signaling pathway targeted to promote spinal cord repair. *J Neurosci* 22, 6570–6577

Duffy P, Schmandke A, Schmandke A, Sigworth J, Narumiya S, Cafferty WBJ, Strittmatter SM (2009): Rho-associated kinase II (ROCKII) limits axonal growth after trauma within the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 29, 15266–15276

Dupuis L, Gonzalez de Aguilar J, Di Scala F, Rene F, Tapia M de, Pradat P, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS et al. (2002): Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 10, 358–365

Fischer LR, Glass JD (2007): Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* 4, 431–442

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

Forman MS, Trojanowski JQ, Lee VM (2004): Neurodegenerative diseases: a decade of discoveries paves the way for therapeutic breakthroughs. *Nat Med* 10, 1055–1063

Fournier AE, GrandPre T, Strittmatter SM (2001): Identification of a receptor mediating Nogo-66 inhibition of axonal regeneration. *Nature* 409, 341–346

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

Gong YH, Parsadanian AS, Andreeva A, Snider WD, Elliott JL (2000): Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. *J Neurosci* 20, 660–665

Gordon PH, Meininger V (2011): How can we improve clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis? *Nat Rev Neurol* 7, 650–654

Gould TW, Buss RR, Vinsant S, Prevette D, Sun W, Knudson CM, Milligan CE, Oppenheim RW (2006): Complete dissociation of motor neuron death from motor dysfunction by Bax deletion in a mouse model of ALS. *J Neurosci* 26, 8774–8786

Groeneveld GJ, van Muiswinkel FL, Sturkenboom JM, Wokke JHJ, Bär PR, van den Berg LH (2004): Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate disease progression of a mouse model of ALS. *Brain Res* 1021, 128–131

Günther R, Suhr M, Koch JC, Bähr M, Lingor P, Tönges L (2012): Clinical Testing and Spinal Cord Removal in a Mouse Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). *J Vis Exp* 61, 1–4

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

Hall ED, Oostveen JA, Gurney ME (1998): Relationship of microglial and astrocytic activation to disease onset and progression in a transgenic model of familial ALS. *Glia* 23, 249–256

Hara M, Takayasu M, Watanabe K, Noda A, Takagi T, Suzuki Y, Yoshida J (2000): Protein kinase inhibition by fasudil hydrochloride promotes neurological recovery after spinal cord injury in rats. *J Neurosurg* 93, 94–101

Hardiman O, van den Berg LH, Kiernan MC (2011): Clinical diagnosis and management of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurol* 7, 639–649

Hashimoto R, Nakamura Y, Kosako H, Amano M, Kaibuchi K, Inagaki M, Takeda M (1999): Distribution of Rho-kinase in the bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 263, 575–579

Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, Hiroki J, Mukai Y, Tsutsui H, Kaibuchi K, Takeshita A (2004): Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation* 109, 2234–2239

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

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

Henkel JS, Beers DR, Zhao W, Appel SH (2009): Microglia in ALS: The Good, The Bad, and The Resting. *J Neuroimmune Pharmacol* 4, 389–398

Huang G, Lee X, Bian Y, Shao Z, Sheng G, Pepinsky RB, Mi S (2013): Death receptor 6 (DR6) antagonist antibody is neuroprotective in the mouse SOD1G93A model of amyotrophic lateral sclerosis. *Cell Death Dis* 4, 1–11

Ince PG, Lowe J, Shaw PJ (1998): Amyotrophic lateral sclerosis: current issues in classification, pathogenesis and molecular pathology. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 104–117

Ince PG, Highley JR, Kirby J, Wharton SB, Takahashi H, Strong MJ, Shaw PJ (2011): Molecular pathology and genetic advances in amyotrophic lateral sclerosis: an emerging molecular pathway and the significance of glial pathology. *Acta Neuropathol* 122, 657–671

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000): Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Mol Pharmacol* 57, 976–983

Jacobs M, Hayakawa K, Swenson L, Bellon S, Fleming M, Taslimi P, Doran J (2006): The structure of dimeric ROCK I reveals the mechanism for ligand selectivity. *J Biol Chem* 281, 260–268

Jaffe AB, Hall A (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247–269

Jokic N, Gonzalez de Aguilar J, Pradat P, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw J, Loeffler J et al. (2005): Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann Neurol* 57, 553–556

Jokic N, Gonzalez de Aguilar J, Dimou L, Lin S, Fergani A, Ruegg MA, Schwab ME, Dupuis L, Loeffler J (2006): The neurite outgrowth inhibitor Nogo-A promotes denervation in an amyotrophic lateral sclerosis model. *EMBO Rep* 7, 1162–1167

Jong S de, Huisman M, Sutedja N, van der Kooi A, Visser M de, Schelhaas J, van der Schouw Y, Veldink J, van den Berg L (2013): Endogenous female reproductive hormones and the risk of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 260, 507–512

Kabashi E, Agar JN, Taylor DM, Minotti S, Durham HD (2004): Focal dysfunction of the proteasome: a pathogenic factor in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 89, 1325–1335

Kabuta T, Suzuki Y, Wada K (2006): Degradation of Amyotrophic Lateral Sclerosis-linked Mutant Cu,Zn-Superoxide Dismutase Proteins by Macroautophagy and the Proteasome. *J Biol Chem* 281, 30524–30533

Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE (2010): Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 33, 409–440

Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, Burrell JR, Zoing MC (2011): Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 377, 942–955

Kimura K (1998): Regulation of the Association of Adducin with Actin Filaments by Rho-associated Kinase (Rho-kinase) and Myosin Phosphatase. *J Biol Chem* 273, 5542–5548

Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K et al. (1996): Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). *Science* 273, 245–248

Kjoller L, Hall A (1999): Signaling to Rho GTPases. *Exp. Cell Res.* 253, 166–179

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

Körner S, Dengler R, Petri S (2011a): Diagnostik der Amyotrophen Lateralsklerose. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 12, 124–128

Körner S, Petri S, Dengler R, Kollwe K (2011b): Amyotrophe Lateralsklerose. *Nervenheilkunde* 30, 755–763

Kubo T, Yamaguchi A, Iwata N, Yamashita T (2008): The therapeutic effects of Rho-ROCK inhibitors on CNS disorders. *Ther Clin Risk Manag* 4, 605–615

Kwiatkowski TJ, Bosco DA, LeClerc AL, Tamrazian E, Vanderburg CR, Russ C, Davis A, Gilchrist J, Kasarskis EJ, Munsat T et al. (2009): Mutations in the FUS/TLS Gene on Chromosome 16 Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Science* 323, 1205–1208

Lau CL, O'Shea RD, Broberg BV, Bischof L, Beart PM (2011): The Rho kinase inhibitor Fasudil up-regulates astrocytic glutamate transport subsequent to actin remodelling in murine cultured astrocytes. *Br J Pharmacol* 163, 533–545

Lee SE (2011): Guam dementia syndrome revisited in 2011. *Curr. Opin. Neurol* 24, 517–524

Leigh PN, Whitwell H, Garofalo O, Buller J, Swash M, Martin J, Gallo J, Weller R, Anderton B (1991): Ubiquitin-immunoreactive intraneuronal inclusions in amyotrophic lateral sclerosis. *Brain* 114, 775–788

Lewinski F von, Keller BU (2005): Ca²⁺, mitochondria and selective motoneuron vulnerability: implications for ALS. *Trends Neurosci* 28, 494–500

Li M, Huang Y, Ma AAK, Lin E, Diamond MI (2009): Y-27632 improves rotarod performance and reduces huntingtin levels in R6/2 mice. *Neurobiol Dis* 36, 413–420

Li M, Yasumura D, Ma AAK, Matthes MT, Yang H, Nielson G, Huang Y, Szoka FC, LaVail MM, Diamond MI et al. (2013): Intravitreal Administration of HA-1077, a ROCK Inhibitor, Improves Retinal Function in a Mouse Model of Huntington Disease. *PLoS ONE* 8, 1–8

Li Z, Dong X, Wang Z, Liu W, Deng N, Ding Y, Tang L, Hla T, Zeng R et al. (2005): Regulation of PTEN by Rho small GTPases. *Nat Cell Biol* 7, 399–404

Lingor P, Teusch N, Schwarz K, Mueller R, Mack H, Bähr M, Mueller BK (2007): Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* 103, 181–189

Logrosino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' A, Couratier P, Mitchell JD, Swingler RJ, Beghi E (2008): Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 79, 6–11

Logrosino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chiò A, Mitchell D, Swingler RJ, Millul A, Benn E, Beghi E (2010): Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 81, 385–390

Lücking CH, Hufschmidt A: *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis*, 4. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart [u.a.] 2006

Ludolph AC: Amyotrophe Lateralsklerose (Motoneuronenerkrankungen). In: *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der Deutschen Gesellschaft für Neurologie*. 5. Auflage; hrsg. v. Diener HC, Weimar C unter Mitarbeit namhafter Autoren; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2012

Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler J, Mead R, Niessen HG, Petri S, Pradat P et al. (2010): Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotroph Lateral Scler* 11, 38–45

Mackenzie IRA, Bigio EH, Ince PG, Geser F, Neumann M, Cairns NJ, Kwong LK, Forman MS, Ravits J, Stewart H et al. (2007): Pathological TDP-43 distinguishes sporadic amyotrophic lateral sclerosis from amyotrophic lateral sclerosis with SOD1 mutations. *Ann Neurol* 61, 427–434

Mackenzie IRA, Rademakers R, Neumann M (2010): TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Lancet Neurol* 9, 995–1007

Maekawa M (1999): Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* 285, 895–898

Matsui T, Amano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, Ito M, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K (1996): Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15, 2208–2216

Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, Kaibuchi K, Tsukita S (1998): Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol* 140, 647–657

Meili R, Sasaki AT, Firtel RA (2005): Rho Rocks PTEN. *Nat. Cell Biol.* 7, 334–335

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

Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH (2007): Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* 3, 1–34

Miyazaki S, Yanagida T, Nunome K, Ishikawa S, Inden M, Kitamura Y, Nakagawa S, Taira T, Hirota K, Niwa M et al. (2008): DJ-1-binding compounds prevent oxidative stress-induced cell death and movement defect in Parkinson's disease model rats. *J Neurochem* 105, 2418–2434

Moher D, Hopewell S, Schulz KF, Montori V, Gøtzsche PC, Devereaux PJ, Elbourne D, Egger M, Altman DG (2010): CONSORT 2010 Explanation and Elaboration: Updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *J Clin Epidemiol* 63, 1–37

Mueller BK, Mack H, Teusch N (2005): Rho kinase, a promising drug target for neurological disorders. *Nat Rev Drug Discov* 4, 387–398

Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, Narumiya S (1996): ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett* 392, 189–193

Nawa M, Kage-Nakadai E, Aiso S, Okamoto K, Mitani S, Matsuoka M (2012): Reduced expression of BTBD10, an Akt activator, leads to motor neuron death. *Cell Death Differ* 19, 1398–1407

Neumann M, Sampathu DM, Kwong LK, Truax AC, Micsenyi MC, Chou TT, Bruce J, Schuck T, Grossman M, Clark CM et al. (2006): Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133

Ng J, Luo L (2004): Rho GTPases regulate axon growth through convergent and divergent signaling pathways. *Neuron* 44, 779–793

Nolle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tonges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D et al. (2011): The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the rho-kinase pathway via profilin. *Human Molecular Genetics* 20, 4865–4878

Ono Y, Tanaka H, Takata M, Nagahara Y, Noda Y, Tsuruma K, Shimazawa M, Hozumi I, Hara H (2013): SA4503, a sigma-1 receptor agonist, suppresses motor neuron damage in in-vitro and in vivo amyotrophic lateral sclerosis models. *Neurosci Lett* 559, 174–178

Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, Cai B, Xu B, Connolly L, Kramvis I, Sahin M et al. (2008): Promoting Axon Regeneration in the Adult CNS by Modulation of the PTEN/mTOR Pathway. *Science* 322, 963–966

Park KK, Liu K, Hu Y, Kanter JL, He Z (2010): PTEN/mTOR and axon regeneration. *Exp Neurol* 223, 45–50

Pasinelli P, Brown RH (2006): Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7, 710–723

Pearce LR, Komander D, Alessi DR (2010): The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9–22

Pernet V, Schwab ME (2012): The role of Nogo-A in axonal plasticity, regrowth and repair. *Cell Tissue Res* 349, 97–104

Philips T, Robberecht W (2011): Neuroinflammation in amyotrophic lateral sclerosis: role of glial activation in motor neuron disease. *Lancet Neurol* 10, 253–263

Pollitt SK, Pallos J, Shao J, Desai UA, Ma AAK, Thompson LM, Marsh JL, Diamond MI (2003): A rapid cellular FRET assay of polyglutamine aggregation identifies a novel inhibitor. *Neuron* 40, 685–694

Pramatarova A, Laganière J, Roussel J, Brisebois K, Rouleau GA (2001): Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. *J Neurosci* 21, 3369–3374

Prinjha R, Moore SE, Vinson M, Blake S, Morrow R, Christie G, Michalovich D, Simmons DL, Walsh FS (2000): Inhibitor of neurite outgrowth in humans. *Nature* 403, 383–384

Pun S, Santos AF, Saxena S, Xu L, Caroni P (2006): Selective vulnerability and pruning of phasic motoneuron axons in motoneuron disease alleviated by CNTF. *Nat Neurosci* 9, 408–419

Rassow J, Karin Hauser, Roland Netzker, Rainer Deutzmann: *Biochemie*, 1. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006

Renton AE, Majounie E, Waite A, Simón-Sánchez J, Rollinson S, Gibbs JR, Schymick JC, Laaksovirta H, van Swieten JC, Myllykangas L et al. (2011): A Hexanucleotide Repeat Expansion in C9ORF72 Is the Cause of Chromosome 9p21-Linked ALS-FTD. *Neuron* 72, 257–268

Riento K, Ridley AJ (2003): Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 446–456

Robberecht W, Philips T (2013): The changing scene of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Rev Neurosci* 14, 248–264

Rodriguez-Perez AI, Dominguez-Meijide A, Lanciego JL, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2013): Inhibition of Rho kinase mediates the neuroprotective effects of estrogen in the MPTP model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 58, 209–219

Rosen DR (1993): Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362, 59–62

Rossman KL, Der CJ, Sondek J (2005): GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167–180

Rothstein JD (2009): Current hypotheses for the underlying biology of amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 65, 3–9

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

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

Sahai E, Marshall CJ (2002): RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 133–142

Schaefer AM, Sanes JR, Lichtman JW (2005): A compensatory subpopulation of motor neurons in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Comp Neurol* 490, 209–219

Schmandke A, Schmandke A, Strittmatter SM (2007): ROCK and Rho: biochemistry and neuronal functions of Rho-associated protein kinases. *Neuroscientist* 13, 454–469

Shao J, Welch WJ, Diamond MI (2008a): ROCK and PRK-2 mediate the inhibitory effect of Y-27632 on polyglutamine aggregation. *FEBS Letters* 582, 1637–1642

Shao J, Welch WJ, DiProspero NA, Diamond MI (2008b): Phosphorylation of profilin by ROCK1 regulates polyglutamine aggregation. *Mol Cell Biol* 28, 5196–5208

Shaw PJ, Eggett CJ (2000): Molecular factors underlying selective vulnerability of motor neurons to neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol* 247, 17–27

Shi J, Wei L (2007): Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp* 55, 61–75

Shin HK, Salomone S, Ayata C (2008): Targeting cerebrovascular Rho-kinase in stroke. *Expert Opin Ther Targets* 12, 1547–1564

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

Strong MJ (2008): The syndromes of frontotemporal dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 9, 323–338

Strong MJ, Grace GM, Freedman M, Lomen-Hoerth C, Woolley S, Goldstein LH, Murphy J, Shoesmith C, Rosenfeld J, Leigh PN et al. (2009): Consensus criteria for the diagnosis of frontotemporal cognitive and behavioural syndromes in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler* 10, 131–146

Suetsugu S (1998): The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *EMBO J* 17, 6516–6526

Sung JK, Miao L, Calvert JW, Huang L, Louis Harkey H, Zhang JH (2003): A possible role of RhoA/Rho-kinase in experimental spinal cord injury in rat. *Brain Res* 959, 29–38

Swash M, Desai J (2000): Motor neuron disease: classification and nomenclature. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 1, 105–112

Synofzik M, Fernández-Santiago R, Maetzler W, Schöls L, Andersen PM (2010): The human G93A SOD1 phenotype closely resembles sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 81, 764–767

Takata M, Tanaka H, Kimura M, Nagahara Y, Tanaka K, Kawasaki K, Seto M, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H (2013): Fasudil, a rho kinase inhibitor, limits motor neuron loss in experimental models of amyotrophic lateral sclerosis. *Br J Pharmacol* 170, 341–351

Takeuchi H, Kobayashi Y, Yoshihara T, Niwa J, Doyu M, Ohtsuka K, Sobue G (2002): Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res* 949, 11–22

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

Tan H, Zhong Y, Cheng Y, Shen X (2011): Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage. *Int J Ophthalmol* 4, 652–657

Tönges L, Koch J, Bähr M, Lingor P (2011): ROCKing Regeneration: Rho Kinase Inhibition as Molecular Target for Neurorestoration. *Front Mol Neurosci* 4, 1–11

Tönges L, Frank T, Tatenhorst L, Saal KA, Koch JC, Szego EM, Bähr M, Weishaupt JH, Lingor P (2012): Inhibition of rho kinase enhances survival of dopaminergic neurons and attenuates axonal loss in a mouse model of Parkinson's disease. *Brain* 135, 3355–3370

Tönges L, Günther R, Suhr M, Jansen J, Balck A, Saal K, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch J et al. (2014): Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62, 217–232

Tu PH, Raju P, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VM (1996): Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 3155–3160

Turner BJ, Talbot K (2008): Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* 85, 94–134

Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M et al. (1997): Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389, 990–994

van Damme P, Robberecht W (2013): Clinical implications of recent breakthroughs in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 26, 466–472

Vance C, Rogelj B, Hortobagyi T, Vos KJ de, Nishimura AL, Sreedharan J, Hu X, Smith B, Ruddy D, Wright P et al. (2009): Mutations in FUS, an RNA Processing Protein, Cause Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis Type 6. *Science* 323, 1208–1211

Vicari RM, Chaitman B, Keefe D, Smith WB, Chrysant SG, Tonkon MJ, Bittar N, Weiss RJ, Morales-Ballejo H, Thadani U (2005): Efficacy and safety of fasudil in patients with stable angina: a double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *J Am Coll Cardiol* 46, 1803–1811

Waibel S, Reuter A, Malessa S, Blaugrund E, Ludolph AC (2004): Rasagiline alone and in combination with riluzole prolongs survival in an ALS mouse model. *J Neurol* 251, 1080–1084

Ward Y (2002): The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol* 157, 291–302

Watzlawick R, Sena ES, Dirnagl U, Brommer B, Kopp MA, Macleod MR, Howells DW, Schwab JM (2013): Effect and Reporting Bias of RhoA/ROCK-Blockade Intervention on Locomotor Recovery After Spinal Cord Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol* 71, 91–99

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

Wills Z, Marr L, Zinn K, Goodman CS, van Vactor D (1999): Profilin and the Abl tyrosine kinase are required for motor axon outgrowth in the *Drosophila* embryo. *Neuron* 22, 291–299

Wu C, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM et al. (2012): Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 488, 499–503

Yamanaka K, Boillee S, Roberts EA, Garcia ML, McAlonis-Downes M, Mikse OR, Cleveland DW, Goldstein LSB (2008a): Mutant SOD1 in cell types other than motor neurons and oligodendrocytes accelerates onset of disease in ALS mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7594–7599

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW (2008b): Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 11, 251–253

Yin F, Ye F, Tan L, Liu K, Xuan Z, Zhang J, Wang W, Zhang Y, Jiang X, Zhang DY (2012): Alterations of signaling pathways in muscle tissues of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 46, 856–860

Yoshida S, Mulder DW, Kurland LT, Chu CP, Okazaki H (1986): Follow-up study on amyotrophic lateral sclerosis in Rochester, Minn., 1925 through 1984. *Neuroepidemiology* 5, 61–70

Zhao J, Zhou D, Guo J, Ren Z, Zhou L, Wang S, Xu B, Wang R (2006): Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 46, 421–428

Zhao J, Zhou D, Guo J, Ren Z, Zhou L, Wang S, Zhang Y, Xu B, Zhao K, Wang R et al. (2011): Efficacy and safety of fasudil in patients with subarachnoid hemorrhage: final results of a randomized trial of fasudil versus nimodipine. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 51, 679–683

Aus der Arbeit hervorgegangene Publikationen

Tönges L, **Günther R**, Suhr M, Jansen J, Balck A, Saal KA, Barski E, Nientied T, Götz AA, Koch JC, Mueller BK, Weishaupt JH, Sereda MW, Hanisch UK, Bähr M, Lingor P (2014): Rho kinase inhibition modulates microglia activation and improves survival in a model of amyotrophic lateral sclerosis. *Glia* 62, 217-232. doi: 10.1002/glia.22601.

Günther R, Suhr M, Koch JC, Bähr M, Lingor P, Tönges L (2012): Clinical testing and spinal cord removal in a mouse model for amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J Vis Exp* 61, 1-4. doi: 10.3791/3936.

Günther R, Tönges L, Suhr M, Bönigk B, Barski E, Saal K, Nientiedt M, Bähr M, Sereda M, Lingor P (2011): A comprehensive correlation analysis of functional and histological alterations in the SOD1(G93A)mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. Posterpräsentation Society for Neuroscience(SfN)-Meeting.

Danksagung

Ich richte meinen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Paul Lingor und Herrn PD Dr. med. Lars Tönges. Durch ihr außerordentliches Engagement und eine großartige Betreuung wurde der Entwicklungsprozess dieser Dissertation maßgeblich beeinflusst und stets angetrieben. Zudem hätte ohne die Einwerbung finanzieller Mittel durch Arbeitsgruppenleiter Herrn Prof. Dr. med. Paul Lingor ein kostenintensives Projekt wie dieses nicht stattfinden können.

Darüber hinaus möchte ich Frau Elisa Barski vielmals danken. Sie stand mir bei der Umsetzung und der Etablierung von immunhistochemischen Färbungen immer mit gutem Rat zur Seite.

Ich bedanke mich bei Tobias Nientiedt und Prof. Dr. Michael Sereda (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) für die Kooperation bei der Durchführung der elektrophysiologischen Untersuchungen.

Frau Bianka Bönigk danke ich für die Anfertigung der Nervengewebeschnitte.

Nicht zuletzt bedanke ich mich vielmals für das Stipendium Gö4med der Universitätsmedizin Göttingen.